



DELEGATURA PROPIEDAD INDI
División de Nuevas Creacioi

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-130832- -00000-0000
Fecha: 2011-10-04 17:17:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259
Act. 411 PRESENTACION Folios: 222

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

ANTICUERPOS ANTI-HER

54. TITULO _____

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____
GENENTECH, INC.

71. SOLICITANTE _____

DOMICILIO _____
SOUTH SAN FRANCISCO, CA. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO _____
JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. BOGOTÁ, D.C. _____

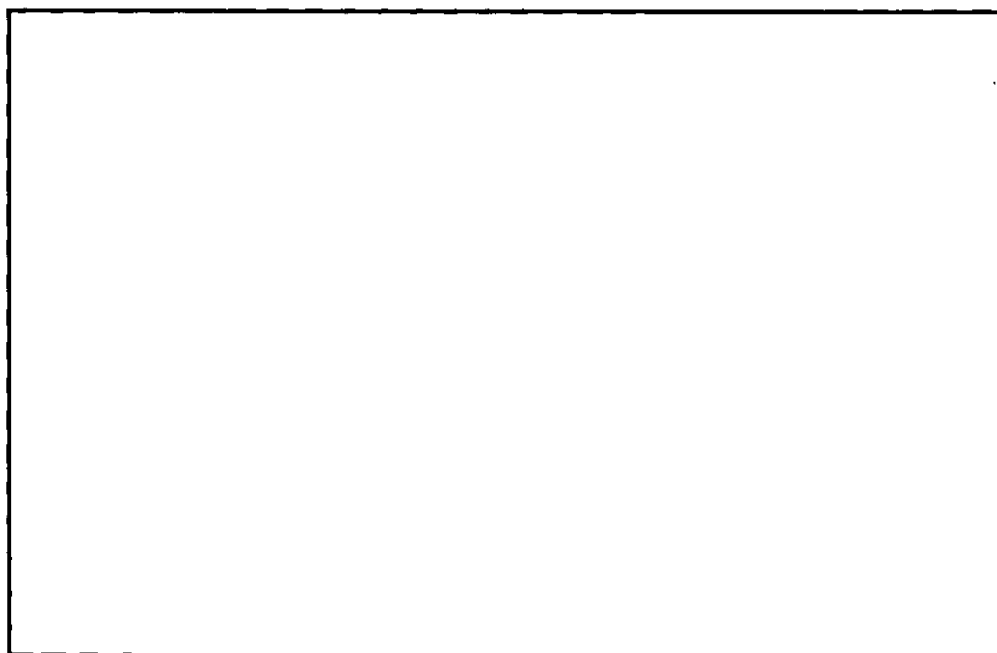
AS: 117.958	PETITOR	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 11-130832- -00000-0000 Fecha: 2011-10-04 17:17:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 259 Act. 411 PRESENTACION Folios: 282
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		
FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL		
1 SOLICITUD DE:		
☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.		
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.		
2 SOLICITANTE	Nombre: GENENTECH, INC. Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América Lugar de Constitución: Estados Unidos de América Teléfono: Fax: E-mail:	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual Número:
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Calle 70 A #4-41, Bogotá, Colombia. Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200 E-mail:	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual Número: <u>80.410.337</u> TP <u>57492</u>
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de radicación (del poder).		
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: FUH, Germaine; SCHAEFER, Gabriele; HABER, Lauric; SLIWKOWSKI, Mark, X. Dirección: 149 Amapola Avenue, Pacifica, California 94044, Estados Unidos de América; 1307 Birch Avenue, San Mateo, California 94402, Estados Unidos de América; 3332 La Mesa Drive, Apt. 2, San Carlos, California 94070, Estados Unidos de América; 42 Oak Creek Lane, San Carlos, California 94070, Estados Unidos de América; respectivamente. Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América, respectivamente.	
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2010/028023</u> Fecha <u>19.03.2010</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2010/108127</u> A1 Fecha <u>23.09.2010</u>		
6 Título (54): <u>ANTICUERPOS ANTI-HER</u>		
7 Clasificación Internacional (51):		
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>US</u>	(32) Fecha <u>20.03.2009</u>
	(31) Número de Solicitud <u>61/210,562</u>	
9 Comprobante de pago No. <u>11-75315, 11-81021, 11-75360, 11-75354</u>		
Fecha <u>30-09-2011</u>		
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.		

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 571.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no esté inscrita en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Fotocopia autenticada.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Fotocopia autenticada.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al español (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional bajo el Art. 19.
- ☒ Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales \$ 729.000 (27*\$27.000).

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTOFIRMA: *Juan Pablo Cadena Sarmiento*

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

117958³

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0075315

Bogotá D.C., Agosto 05 de 2011 - 07:00:02

RECIBIDO DE : BRIGARD NI 800.134.536

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391765953	04/08/2011	36.912.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	571.000.00	571.000.00
			\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-130832- -00000-0000

Fecha: 2011-10-04 17:17:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259

Act. 411 PRESENTACION Folios: 232

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Agosto 5 de 2011 - 07:00:12

117958⁴

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0081021

Bogotá D.C., Agosto 22 de 2011 - 16:46:30

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411762584	22/08/2011	16.738.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
20	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	540.000.00
				\$540.000.00

SON: **QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-130832-00000-0000
Fecha: 2011-10-04 17:17:36 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259
Act. 411 PRESENTACION Folios: 232

117958

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0075360

Bogotá D.C., Agosto 05 de 2011 - 07:00:02

RECIBIDO DE : BRIGARD

NI 800.134.536

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391765953	04/08/2011	36.912.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	135.000.00	135.000.00
				\$135.000.00

SON: **CIENTO TREINTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-130832-00000-0000
Fecha: 2011-10-04 17:17:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259
Act. 411 PRESENTACION Folios: 232

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Agosto 5 de 2011 - 07:00:14

1179586

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0075354

Bogotá D.C., Agosto 05 de 2011 - 07:00:02

RECIBIDO DE : BRIGARD

NI 800.134.536

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391765953	04/08/2011	36.912.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	54.000.00	54.000.00
				\$54.000.00

SON: **CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-130832-00000-0000
Fecha: 2011-10-04 17:17:36
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION
Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 259
Folios: 262

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Agosto 5 de 2011 - 07:00:14

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/028023

(22) International Filing Date:
19 March 2010 (19.03.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/210,562 20 March 2009 (20.03.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
GENENTECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): FUH, Germaine [US/US]; 149 Amapola Avenue, Pacifica, California 94044 (US). SCHAEFER, Gabriele [DE/US]; 1307 Birch Avenue, San Mateo, California 94402 (US). HABER, Laurie [FR/US]; 3332 La Mesa Drive, Apt. 2, San Carlos, California 94070 (US). SLIWKOWSKI, Mark, X. [US/US]; 42 Oak Creek Lane, San Carlos, California 94070 (US).

(74) Agents: ROPP, Traci, H. et al.; Genentech, Inc., 1 DNA Way, MS-49, South San Francisco, California 94080 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report (Art. 21(3))

[Continued on next page]

(54) Title: BISPECIFIC ANTI-HER ANTIBODIES

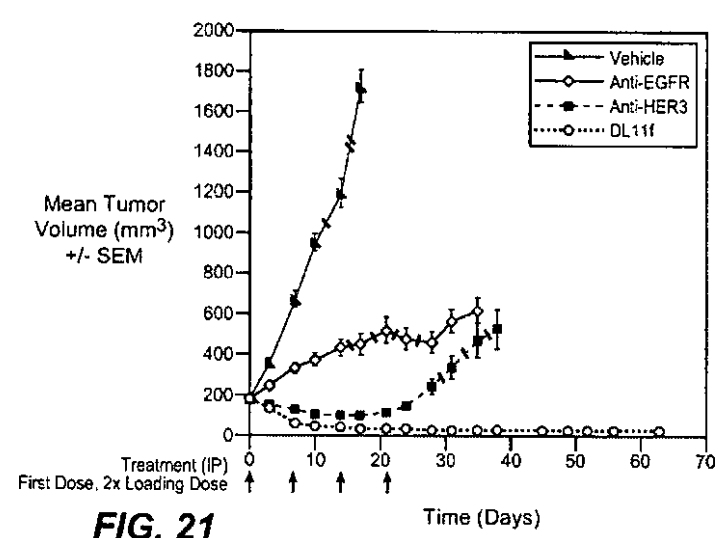


FIG. 21

(57) Abstract: The invention provides anti-HER antibodies, including multispecific anti-HER antibodies, compositions comprising and methods of using these antibodies. Also provided herein are EGFR/HER3 multispecific antibodies that are less toxic than traditional EGFR antagonists.

WO 2010/108127 A1

WO 2010/108127 A1

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

ANTICUERPOS ANTI-HER

MEMORIA DESCRIPTIVA

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad bajo 35 USC 119(e) de la solicitud provisional norteamericana número U.S. 61/210562, presentada el 20 de marzo de 2009, cuya descripción se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-HER, incluyendo anticuerpos anti-HER multiespecíficos con especificidad de unión para al menos dos receptores HER diferentes, y al uso de los anticuerpos para tratar enfermedades o trastornos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los receptores tirosina quinasas de la familia HER son importantes mediadores del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. La familia de receptores incluye cuatro miembros definidos que incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1 o HER1), HER2 (ErbB2 o p185^{neu}), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2).

EGFR, codificado por el gen *erbB1*, ha sido implicado causalmente en malignidades humanas. En particular, una expresión aumentada de EGFR ha sido observada en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y estómago, y también en glioblastomas. La expresión aumentada del receptor EGFR frecuentemente está asociada con una producción aumentada del ligando de EGFR, el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), por las mismas células tumorales, dando como resultado la activación del receptor por una ruta de estimulación autocrina. Baselga y Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994). Anticuerpos monoclonales dirigidos contra EGFR o sus ligandos, TGF- α y EGF, han sido evaluados como agentes terapéuticos en el tratamiento de tales malignidades. Véase, por ejemplo, Baselga y Mendelsohn., *supra*; Masui *et al. Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); y Wu *et al. J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995).

El segundo miembro de la familia HER, HER2 (p185^{neu}), fue identificado originalmente como el producto del gen transformante de neuroblastomas de ratas tratadas químicamente. La forma activada del proto-oncogen *neu* es el resultado de una mutación de punto (valina a ácido glutámico) en la región transmembrana de la proteína codificada. La amplificación del homólogo humano de *neu* se observa en cánceres de mama y de ovario y se correlaciona con un mal pronóstico (Slamon *et al.*, *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon *et al.*, *Science*, 244:707-712 (1989); y patente norteamericana US N° 4.968.603). La sobre-expresión de HER2 (con frecuencia pero no uniformemente debida a la amplificación del gen) también ha sido observada en otros carcinomas, incluyendo carcinomas del estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. Véanse, entre otros, King *et al.*, *Science*, 229:974 (1985); Yokota *et al.*, *Lancet*, 1:765-767 (1986); Fukushige *et al.*, *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Guerin *et al.*, *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen *et al.*, *Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura *et al.*, *Cancer Res.*, 51:1034 (1991); Borst *et al.*, *Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990); Weiner *et al.*, *Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern *et al.*, *Cancer Res.*, 50:5184 (1990); Park *et al.*, *Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau *et al.*, *Mol. Carcinog.*, 3:254-257 (1990); Aasland *et al.*, *Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988); Williams *et al.*, *Pathobiology* 59:46-52 (1991); y McCann *et al.*, *Cancer*, 65:88-92 (1990). HER2 puede estar sobre-expresado en el cáncer de próstata (Gu *et al.*, *Cancer Lett.* 99:185-9 (1996); Ross *et al.*, *Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997); Ross *et al.*, *Cancer* 79:2162-70 (1997); y Sadasivan *et al.*, *J. Urol.* 150:126-31 (1993)).

Se han descrito anticuerpos dirigidos contra los productos proteicos p185^{neu} de rata y HER2 humano. Drebin y colaboradores han preparado anticuerpos contra el producto génico *neu* de rata, p185^{neu}. Véase, por ejemplo, Drebin *et al.*, *Cell* 41:695-706 (1985); Myers *et al.*, *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991) y patente WO 94/22478. Drebin *et al.*, *Oncogene* 2:273-277 (1988) informan que mezclas de anticuerpos reactivas con dos regiones distintas de p185^{neu} dan como resultado efectos antitumorales sinérgicos en células NIH-3T3 transformadas con *neu* e implantadas en ratones desnudos. Véase también la patente norteamericana US 5.824.311 otorgada el 20 de octubre de 1998.

Hudziak *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989) describen la generación de un panel de anticuerpos contra HER2 que fueron caracterizados usando la línea celular de tumor de mama humano SK-BR-3. La proliferación celular relativa de las células SK-BR-3 después de la exposición a los anticuerpos

se determinó por tinción con cristal violeta de las monocapas después de 72 horas. Usando este ensayo, la inhibición máxima se obtuvo con el anticuerpo denominado 4D5 que inhibió la proliferación celular en un 56%. Otros anticuerpos del panel redujeron la proliferación celular en menor grado en este ensayo. Se encontró además que el anticuerpo 4D5 sensibiliza las líneas celulares de tumor de mama que sobre-expresan HER2 a los efectos citotóxicos de TNF- α . Véase también la patente norteamericana U.S. N° 5.677.171 emitida el 14 de octubre de 1997. Los anticuerpos contra HER2 discutidos en Hudziak *et al.* están caracterizados además en Fendly *et al.* *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts *et al.* *In Vitro* 26(3):59A (1990); Sarup *et al.* *Growth Regulación* 1:72-82 (1991); Shepard *et al.* *J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127 (1991); Kumar *et al.* *Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986 (1991); Lewis *et al.* *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras *et al.* *Oncogene* 9:1829-1838 (1994); Vitetta *et al.* *Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski *et al.* *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994); Scott *et al.* *J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991); D'souza *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994); Lewis *et al.* *Cancer Research* 56:1457-1465 (1996); y Schaefer *et al.* *Oncogene* 15:1385-1394 (1997).

Una versión humanizada recombinante del anticuerpo contra HER2 de murino 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, trastuzumab o HERCEPTIN®; patente norteamericana U.S. N° 5.821.337) es clínicamente activa en pacientes con cánceres de mama metastásicos que sobre-expresan HER2 que han recibido terapia anti-cáncer anterior extensa (Baselga *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996)). Trastuzumab recibió la aprobación para ser comercializado de la Food and Drug Administration el 25 de septiembre de 1998, para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobre-expresan la proteína HER2.

Otros anticuerpos contra HER2 con diversas propiedades han sido descritos en Tagliabue *et al.* *Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991); McKenzie *et al.* *Oncogene* 4:543-548 (1989); Maier *et al.* *Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991); Bacus *et al.* *Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990); Stancovski *et al.* *PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991); Bacus *et al.* *Cancer Research* 52:2580-2589 (1992); Xu *et al.* *Int. J. Cancer* 53:401-408 (1993); patente WO 94/00136; Kasprzyk *et al.* *Cancer Research* 52:2771-2776 (1992); Hancock *et al.* *Cancer Res.* 51:4575-4580 (1991); Shawver *et al.* *Cancer Res.* 54:1367-1373 (1994); Arteaga *et al.* *Cancer Res.* 54:3758-3765 (1994); Harwerth *et al.* *J. Biol. Chem.* 267:15160-15167 (1992);

patente norteamericana U.S. N° 5.783.186; y Klapper *et al.* *Oncogene* 14:2099-2109 (1997).

Un sondeo de homología dio como resultado la identificación de otros dos miembros de la familia de receptores HER: HER3 (patentes norteamericanas US números 5.968.511, 5.183.884 y 5.480.968 y también Kraus *et al.* *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)) y HER4 (solicitud de patente europea EP N° 599 274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); y Plowman *et al.*, *Nature*, 366:473-475 (1993)). Estos dos receptores presentan expresión aumentada en al menos algunas líneas celulares de cáncer de mama.

Los receptores HER se encuentran generalmente en diversas combinaciones en las células, y se piensa que la heterodimerización aumenta la diversidad de las respuestas celulares a una variedad de ligandos de HER (Earp *et al.* *Breast Cancer Research and Treatment* 35: 115-132 (1995)). EGFR se une a seis ligandos diferentes: factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), anfirregulina, factor de crecimiento epidérmico que se une a heparina (HB-EGF), betacelulina y epirregulina (Groenen *et al.* *Growth Factors* 11:235-257 (1994)). Una familia de proteínas herregulinas resultantes del corte y empalme ("splicing") alternativo de un gen único, son ligandos para HER3 y HER4. La familia de las herregulinas incluye las herregulinas alfa, beta y gamma (Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205-1210 (1992); patente norteamericana U.S. N° 5.641.869; y Schaefer *et al.* *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)); factores de diferenciación neu (NDFs), factores de crecimiento gliales (GGFs); inductor de actividad del receptor de acetilcolina (ARIA); y factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF). Para una revisión, véase Groenen *et al.* *Growth Factors* 11:235-257 (1994); Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247-262 (1996) y Lee *et al.* *Pharm. Rev.* 47:51-85 (1995). Se han identificado tres ligandos de HER adicionales: neurregulina-2 (NRG-2) del cual se informa que se une ya sea a HER3 o a HER4 (Chang *et al.* *Nature* 387: 509-512 (1997); y Carraway *et al.* *Nature* 387:512-516 (1997)); neurregulina-3 que se une a HER4 (Zhang *et al.* *PNAS (USA)* 94(18):9562-7 (1997)); y neurregulina-4 que se une a HER4 (Harari *et al.* *Oncogene* 18:2681-89 (1999)). HB-EGF, betacelulina y epirregulina también se unen a HER4.

A pesar de que EGF y TGF α no se unen a HER2, EGF estimula a EGFR y HER2 para que formen un heterodímero, que activa a EGFR y da como resultado la transfosforilación de HER2 en el heterodímero. La dimerización y/o transfosforilación parecen activar a la tirosina quinasa HER2. Véase Earp *et al.*,

supra. Igualmente, cuando HER3 es co-expresado con HER2, se forma un complejo de señalización activo y los anticuerpos dirigidos contra HER2 son capaces de romper este complejo (Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)). Adicionalmente, la afinidad de HER3 por la herregulina (HRG) aumenta a un estado de mayor afinidad cuando es co-expresada con HER2. Véase también, Levi *et al.*, *Journal of Neuroscience* 15: 1329-1340 (1995); Morrissey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1431-1435 (1995); y Lewis *et al.*, *Cancer Res.*, 56:1457-1465 (1996) con respecto al complejo de proteínas HER2-HER3. HER4, al igual que HER3, forma un complejo de señalización activo con HER2 (Carraway y Cantley, *Cell* 78:5-8 (1994)).

Agentes terapéuticos que apuntan a la ruta de HER están actualmente en uso para tratar enfermedades tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello y cáncer pancreático. A pesar de que estos agentes terapéuticos han tenido algún éxito, persisten problemas relacionados con la resistencia nativa e inducida y la toxicidad. Arteaga CL. *J Clin Oncol* 21:289-91s (2003); Hoshi S, *et al.*, *Gan To Kagaku Ryoho* 31:1209-13 (2004); Vilorio-Petit AM, y Kerbel RS. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58:914-26 (2004); Bianco R., *et al.*, *Endocr Relat Cancer* 12:S159-71 (2005); Engelman JA, y Janne PA., *Clin Cancer Res* 14:2895-9 (2008); Davoli A, *et al.*, *Cancer Chemother Pharmacol.* 65(4):611-23 (2010); Pohlmann PR, *et al.*, *Clin Cancer Res.* 15(24):7479-7491 (2009). En particular, los agentes terapéuticos que apuntan a HER1 (EGFR) frecuentemente están asociados con efectos secundarios indeseables, tales como niveles significativos de toxicidad cutánea. Robert, *et al.* *Lancet Oncology* 6:491-500 (2005).

En consecuencia, existe una necesidad de desarrollar agentes terapéuticos mejorados que apunten a la ruta de HER.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona anticuerpos multiespecíficos que comprenden un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a al menos dos receptores HER seleccionados del grupo consistente en (a) EGFR y HER2, (b) EGFR y HER3, y (c) EGFR y HER4. El anticuerpo inhibe una actividad biológica de al menos uno de los receptores HER. En modalidades particulares, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a sus receptores HER blanco y no se une específicamente a los receptores HER que no son blanco. En consecuencia, en una modalidad, el anticuerpo se une específicamente a EGFR y

a HER3, pero no se une específicamente a HER2 ni a HER4. En otra modalidad, el anticuerpo se une específicamente a EGFR y a HER2, pero no se une específicamente a HER3 ni a HER4. En otra modalidad, el anticuerpo se une específicamente a EGFR y a HER4, pero no se une específicamente a HER2 ni a HER3. La invención también proporciona anticuerpos monoespecíficos que se unen específicamente a un receptor HER blanco.

Un aspecto de la invención proporciona anticuerpos multiespecíficos que son capaces de unirse específicamente a EGFR y a otro receptor HER, y que son menos tóxicos que los antagonistas de EGFR tradicionales, tal como cetuximab. En una modalidad, la toxicidad es toxicidad dermatológica. En una modalidad, el anticuerpo contra HER multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico es menos tóxico que los antagonistas de EGFR. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico inhibe una actividad biológica de al menos uno de EGFR y HER3. En una modalidad, el anticuerpo inhibe la unión de EGF a EGFR. En otra modalidad, el anticuerpo inhibe la fosforilación de EGFR inducida por TGF- α . En algunas modalidades, el anticuerpo inhibe el crecimiento de las células tumorales. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a EGFR y a HER3, pero no se une específicamente a HER2 ni a HER4.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3 con una Kd de menos de 10^{-6} M. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR con una Kd de menos de 10^{-6} M, y se une específicamente a HER3 con una Kd de menos de 10^{-7} M.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3 comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de amino ácidos de LSGDWIH (SEQ ID NO: 48); (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de amino ácidos de VGEISAAGGYTD (SEQ ID NO: 51); y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de amino ácidos de ARESRVSFEEAMDY (SEQ ID NO: 53); y (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de amino ácidos de NIATDVA (SEQ ID NO: 55);

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de amino ácidos de SASF (SEQ ID NO: 56); y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de amino ácidos de SEPEPYT (SEQ ID NO: 57).

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3 comprende (a) un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 30; (b) un dominio variable de cadena liviana que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29; o (c) una secuencia de dominio variable de cadena pesada como en (a) y una secuencia de dominio variable de cadena liviana como en (b). En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3 comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 30. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3 comprende una secuencia de dominio variable de cadena liviana de SEQ ID NO: 29. En otra modalidad, el anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3 comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 30 y una secuencia de dominio variable de cadena liviana de SEQ ID NO: 29.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3 es un anticuerpo IgG1 de longitud completa.

Un aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica los anticuerpos contra HER multiespecíficos. Otro aspecto proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico que codifica los anticuerpos contra HER multiespecíficos. Otro aspecto proporciona un método para producir un anticuerpo contra HER multiespecífico, que comprende cultivar la célula huésped que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo contra HER multiespecífico, de manera tal que el anticuerpo sea producido.

Un aspecto de la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo contra HER multiespecífico y un agente citotóxico. Otro aspecto proporciona una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo contra HER multiespecífico y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto de la invención proporciona un método para tratar a un individuo que tiene cáncer, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo contra HER multiespecífico. En una modalidad, el anticuerpo contra HER multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3. En una modalidad, el cáncer tratado por el anticuerpo contra HER multiespecífico comprende células que expresan EGFR y HER3. En una modalidad, el cáncer tratado por el anticuerpo contra HER multiespecífico es cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata o cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para inhibir una actividad biológica de un receptor HER en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo contra HER multiespecífico. En una modalidad, el anticuerpo contra HER multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3.

Un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo contra HER multiespecífico para el uso como un medicamento. Otro aspecto proporciona un anticuerpo contra HER multiespecífico para el uso para tratar un cáncer, tal como cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata o cáncer de pulmón de células no pequeñas. Otro aspecto proporciona un anticuerpo contra HER multiespecífico para el uso para inhibir una actividad biológica de un receptor HER. En una modalidad, el anticuerpo contra HER multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3.

Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo contra HER multiespecífico para el uso en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede usarse, en una modalidad, para tratar un cáncer, tal como cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata o cáncer de pulmón de células no pequeñas. En una modalidad, el medicamento es para inhibir una actividad biológica de un receptor HER. En una modalidad, el anticuerpo contra HER multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3. En una modalidad, el anticuerpo contra HER multiespecífico es menos tóxico que los antagonistas de EGFR tradicionales, tal como cetuximab.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la inhibición del crecimiento tumoral por el anticuerpo anti-EGFR D1.5 en un modelo de xenoinjerto de A431.

La Figura 2 muestra la especificidad de unión de clones con especificidad doble.

La Figura 3 muestra la inhibición de la fosforilación de EGFR inducida por TGF- α usando anticuerpos seleccionados que tienen especificidad doble (anticuerpos anti-EGFR/HER3 y anti-EGFR/HER2).

La Figura 4 muestra que los anticuerpos anti-EGFR/HER3 bloquean la unión de herregulina a HER3-ECD-Fc.

La Figura 5 muestra la inhibición de la fosforilación del receptor inducida por HRG en células MCF7 por anticuerpos biespecíficos anti-EGFR/HER3.

La Figura 6 muestra la inhibición de la proliferación celular de células MDA-175 por anticuerpos anti-EGFR/HER3.

La Figura 7 es una imagen que muestra los puntos calientes de D1.5-100 mapeados en una estructura de 4D5-Fv.

La Figura 8 representa una estrategia para la maduración de afinidad del anticuerpo contra EGFR-HER3 D1.5-100, usando bibliotecas "shotgun".

La Figura 9 muestra que dos anticuerpos con la afinidad madurada seleccionados (DL7 y DL11) son específicos para ambos EGFR y HER3.

La Figura 10: A) Muestra la comparación de la función inhibidora de los anticuerpos con la afinidad madurada DL7 y DL11 y el anticuerpo parental D1.5 sobre EGFR. B) Muestra la comparación de la función inhibidora de los anticuerpos con la afinidad madurada DL7 y DL11 y el anticuerpo anti-HER3 monoespecífico DL3.6 sobre la transactivación de HER3.

La Figura 11A) proporciona gráficos que muestran la comparación de la función inhibidora del crecimiento de DL11 comparada con pertuzumab, un anticuerpo anti-EGFR y un anticuerpo anti-HER3, o DL3.6, D1.5 o la combinación de D1.5 más DL3.6 sobre células H1666, una línea celular de NSCLC que expresa HER2, HER3, EGFR y ligandos EGFR, estimuladas en su crecimiento con HRG. B) Proporciona gráficos que muestran la comparación de la función inhibidora del crecimiento de DL11 comparada con pertuzumab, un anticuerpo anti-EGFR y un anticuerpo anti-HER3, o DL3.6, D1.5 o la combinación de D1.5 más DL3.6 sobre la línea de NSCLC H1666 estimulada en su crecimiento con HRG y TGF α .

La Figura 12A) proporciona gráficos que muestran la inhibición de la proliferación de células HCA-7, una línea celular de cáncer colorrectal que expresa HER2, HER3 y EGFR, por DL11 en comparación con pMab, un anticuerpo anti-EGFR y un anticuerpo anti-HER3. El crecimiento celular fue estimulado con HRG. B) Proporciona gráficos que muestran la inhibición del crecimiento de las células HCA-7 como en la Figura 12A, excepto que el crecimiento celular fue estimulado con HRG más TGF α .

La Figura 13 muestra la inhibición de la proliferación de células Calu-3, una línea de NSCLC que sobre-expresa HER2 y tiene niveles normales de HER3 y EGFR. El crecimiento celular fue estimulado con HRG y los anticuerpos fueron analizados de una manera dependiente de la dosis.

La Figura 14 representa una estrategia de clasificación para la maduración de la afinidad de D1.5-201.

La Figura 15 muestra la inhibición de la proliferación de células MDA-175 por DL11, DL11b y DL11f.

La Figura 16 muestra que DL11f inhibe la fosforilación de HER3 inducida por herregulina y la fosforilación de EGFR inducida por TGF β .

La Figura 17 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de trasplante de tumor HCA-7 por DL11 y DL11f.

La Figura 18 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de NSCLC H358 por DL11f.

La Figura 19 muestra la inhibición de la fosforilación de HER3 inducida por HRG por DL3-11b, DL3.6b y DL3.6.

Figura 20: Inhibición de la proliferación de células MDA-175 por DL3-11b, DL3.6b y DL3.6.

La Figura 21 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer FaDu por DL11f.

La Figura 22 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer pancreático BxPC3 por DL11f.

La Figura 23 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas Calu-3 por DL11f.

La Figura 24 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer epidérmico A431 por DL11f.

La Figura 25 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de mama MAXF44 por DL11f.

La Figura 26 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de próstata DU145 por DL11f.

La Figura 27 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de ovario OVXF550 por DL11f.

La Figura 28 muestra que DL11f induce ADCC en varias líneas celulares.

La Figura 29 muestra que DL11f-N297A carece de actividad de ADCC.

La Figura 30 muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer NSCLC H292 por DL11f y DL11f-N297A.

La Figura 31A-C es una tabla que proporciona información sobre las toxicidades no clínicas y clínicas observadas para terapias con antagonistas de EGFR.

La Figura 32 es una tabla que proporciona información sobre la calificación para sarpullido/descamación y acné/sarpullido acneiforme.

La Figura 33 proporciona un alineamiento de amino ácidos del dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena liviana de varios anticuerpos anti-HER con numeración de Kabat. La Figura 33A muestra el dominio variable de la cadena liviana de los siguientes anticuerpos: D1 (SEQ ID NO: 58); D1.5 (SEQ ID NO: 24); D1.5-100 (SEQ ID NO: 40); DL11 (SEQ ID NO: 27); DL11b (SEQ ID NO: 29); DL11f (SEQ ID NO: 29). La Figura 33B muestra el dominio variable de la cadena pesada de los siguientes anticuerpos: D1 (SEQ ID NO: 25); D1.5 (SEQ ID NO: 25); D1.5-100 (SEQ ID NO: 25); DL11 (SEQ ID NO: 28); DL11b (SEQ ID NO: 28); DL11f (SEQ ID NO: 30).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

A menos que se definan de otra manera, se pretende que todos los términos del arte, notaciones y otra terminología científica usados aquí tengan los significados entendidos comúnmente por los expertos en el arte al cual pertenece esta invención. En algunos casos, los términos con significados entendidos comúnmente se definen aquí para mayor claridad y/o fácil referencia, y la inclusión aquí de estas definiciones no debe interpretarse necesariamente como que representa una diferencia sustancial con lo que se entiende generalmente en el arte. Las técnicas y procedimientos descritos o mencionados aquí son generalmente bien entendidos y comúnmente empleados usando metodología

convencional por los expertos en el arte, por ejemplo las metodologías de clonamiento molecular extensamente utilizadas descritas en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2nd edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Como sea apropiado, los procedimientos que involucren el uso de kits y reactivos disponibles en el comercio se efectúan generalmente de acuerdo con protocolos y/o parámetros definidos por el fabricante, a menos que se señale otra cosa.

Antes de describir los presentes métodos, kits y usos, debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros de animales, construcciones y reactivos particulares descritos, ya que ellos, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada aquí tiene el propósito de describir modalidades particulares solamente, y no está destinada a limitar el alcance de la presente invención que estará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

Debe hacerse notar que, como se usan aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto claramente indique otra cosa.

A través de esta memoria y las reivindicaciones, se entenderá que la palabra "comprenden" o variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo" implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros señalado, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

El término "anticuerpo" se usa aquí en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos, y fragmentos de anticuerpos siempre que exhiban la actividad biológica deseada. El término "anticuerpo multiespecífico" se usa aquí en el sentido más amplio y abarca específicamente un anticuerpo que comprende un dominio de unión al antígeno que tiene especificidad poliepitópica (o sea, es capaz de unirse específicamente a dos o más epítopos diferentes en una molécula biológica, o es capaz de unirse específicamente a epítopos en dos o más moléculas biológicas diferentes). Un ejemplo específico de un dominio de unión al antígeno es una unidad $V_H V_L$ constituida por un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena liviana (V_L). Estos anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos de longitud completa, anticuerpos que tienen dos o más dominios V_L y V_H , fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos biespecíficos y triacuerpos, fragmentos de anticuerpos que han sido enlazados en forma

covalente o no covalente. Un "anticuerpo biespecífico" es un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que es capaz de unirse específicamente a dos epítopos diferentes en una molécula biológica, o es capaz de unirse específicamente a epítopos en dos moléculas biológicas diferentes. El anticuerpo biespecífico también se indica aquí como que tiene "especificidad doble" o como que es "doblemente específico".

En ciertas modalidades, un anticuerpo de la invención tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ ó $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo 10^{-8} M o menos, por ejemplo de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo de 10^{-9} M a 10^{-13} M) para su HER o HERs blanco.

La unidad de anticuerpo básica de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas livianas (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM está constituido por 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional llamado cadena J, y por lo tanto contiene 10 sitios de unión al antígeno, en tanto que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgGs, la unidad de 4 cadenas generalmente tiene alrededor de 150.000 daltons. Cada cadena L está enlazada a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, en tanto que dos cadenas H están enlazadas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de las cadenas H. Cada cadena H y L tiene también puentes de disulfuro intracadenas espaciados regularmente. Cada cadena H tiene, en el terminal N, un dominio variable (V_H) seguido por tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ , y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene, en el terminal N, un dominio variable (V_L) seguido por un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que residuos de amino ácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena liviana y la cadena pesada. El apareamiento de V_H con V_L forma un sitio único de unión al antígeno. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase por ejemplo Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrados puede ser asignada a uno de dos tipos claramente definidos llamados kappa y lambda, en

base a las secuencias de amino ácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de amino ácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas pueden ser asignadas a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas denominadas α , δ , γ , ϵ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases en base a diferencias relativamente menores en secuencia de C_H y función, por ejemplo los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos. El dominio V media en la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente por toda la extensión de 110 amino ácidos de los dominios variables. En lugar de eso, las regiones V están constituidas por tramos relativamente no variantes denominados regiones de armazón (FRs) de 15-30 amino ácidos, separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" o HVRs. Los dominios variables de las cadenas pesadas y livianas nativas comprenden cada uno cuatro FRs, que adoptan en gran medida una configuración de láminas beta, conectadas por tres regiones hipervariables que forman asas que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de láminas beta. Las regiones hipervariables de cada cadena son mantenidas juntas en estrecha proximidad por las FRs, y con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están directamente involucrados en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras tal como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa aquí, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman asas definidas estructuralmente. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVRs; tres en el VH (HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3) y tres en el VL (HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3). En los anticuerpos nativos, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVRs, y se cree que H3, en particular, tiene un papel singular en conferir especificidad fina a los

anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu *et al.*, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélido que existen en la naturaleza constituidos por una cadena pesada solamente, son funcionales y estables en ausencia de cadena liviana. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Las HVRs generalmente comprenden residuos de amino ácidos de las asas hipervariables y/o de las "regiones determinantes de complementariedad" (CDRs), donde estas últimas tienen la variabilidad de secuencia más alta y/o están involucradas en el reconocimiento del antígeno. Un número de definiciones de HVR están en uso y están incluidas aquí. Las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). En vez de eso, Chothia se refiere a la ubicación de las asas estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVRs de AbM representan un compromiso entre las HVRs de Kabat y las asas estructurales de Chothia, y son usadas por el software de formación de modelos de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVRs de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas de los complejos disponibles. Los residuos de cada una de estas HVRs se presentan a continuación.

Asa Kabat	AbM	Chothia	Contacto
-----	---	-----	-----
L1 L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2 L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3 L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1 H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Numeración de Kabat)			
H1 H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Numeración de Chothia)			
H2 H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3 H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVRs pueden comprender "HVRs extendidas" como sigue: 24-36 ó 24-34 (L1), 46-56 ó 50-56 (L2) y 89-97 u 89-96 (L3) en el VL, y 26-35 (H1),

50-65 ó 47-65 (H2) y 93-102, 94-102 ó 95-102 (H3) en el VH. Los residuos de los dominios variables están numerados de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*, para cada una de estas definiciones.

Residuos de "armazón" o "FR" son aquellos residuos de los dominios variables distintos de los residuos de las HVR, como se ha definido aquí.

El término "numeración de los residuos de los dominios variables como en Kabat" o "numeración de las posiciones de amino ácidos como en Kabat" y sus variaciones, se refieren al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena liviana de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *supra*. Usando este sistema de numeración, la secuencia lineal de amino ácidos real puede contener menos amino ácidos o amino ácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un solo inserto de amino ácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de residuos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada por Kabat "estándar".

El sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente residuos 1-107 de la cadena liviana y residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa generalmente cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU informado en Kabat *et al.*, *supra*). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo IgG1 EU humano. A menos que aquí se declare otra cosa, las referencias a números de residuos en el dominio variable de los anticuerpos indican la numeración de los residuos por el sistema de numeración de Kabat. A menos que aquí se declare otra cosa, las referencias a números de residuos en el dominio constante de los anticuerpos indican la numeración de los residuos por el sistema de numeración EU (por ejemplo, véase la patente WO 2006/073941).

"Afinidad" se refiere a la potencia de la suma total de interacciones no covalentes entre un sitio de unión único de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique otra cosa, como se usa aquí, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañera Y generalmente puede representarse por la constante de disociación (K_d). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en el arte, incluyendo aquéllos descritos aquí.

Un anticuerpo con la "afinidad madurada" es uno con una o más alteraciones en una o más HVRs o regiones de armazón del mismo, que dan como resultado un aumento en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, comparado con un anticuerpo parental que no posee esa o esas alteraciones. En una modalidad, un anticuerpo con la afinidad madurada tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno blanco. Anticuerpos con la afinidad madurada pueden prepararse usando ciertos procedimientos conocidos en el arte. Por ejemplo, Marks *et al.* *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe maduración de la afinidad por transposición ("shuffling") de dominios VH y VL. Mutagénesis aleatoria de residuos de HVR y/o de armazón se describe, por ejemplo, en Barbas *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden ser divididas adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, o sea, los anticuerpos individuales que constituyen la población son sustancialmente similares y se unen al(a los) mismo(s) epítipo(s), excepto por las posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando estas variantes generalmente presentes en cantidades

minoritarias. Este anticuerpo monoclonal típicamente incluye un anticuerpo que comprende una región variable que se une a un blanco, donde el anticuerpo fue obtenido por un proceso que incluye la selección del anticuerpo a partir de una pluralidad de anticuerpos. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único a partir de una pluralidad de clones, tal como un conjunto de clones de hibridoma, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que el anticuerpo seleccionado puede ser alterado adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por el blanco, para humanizar el anticuerpo, para mejorar su producción en cultivos celulares, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de la región variable alterada también es un anticuerpo monoclonal de esta invención. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son convenientes porque típicamente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas. El calificativo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por algún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que serán usados de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por una variedad de técnicas, incluyendo el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975); Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo, la patente norteamericana U.S. N° 4.816.567), tecnología de exhibición en fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Sidhu *et al.*, J. Mol. Biol., 338(2):299-310 (2004); Lee *et al.*, J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); y Lee *et al.* J. Immunol. Métodos 284(1-2):119-132 (2004)) y tecnologías para producir anticuerpos humanos o de tipo humanos a partir de animales que tienen partes o todos los loci de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulinas humanas (véanse, por ejemplo, las patentes WO 98/24893, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno., 7:33 (1993); patentes norteamericanas U.S. números 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; patente WO

97/17852, patentes norteamericanas U.S. números 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016, y Marks *et al.*, Bio/Technology, 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature, 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature, 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology, 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995).

Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende un sitio de unión al antígeno y también un C_L y al menos los dominios constantes de cadena pesada, C_H1, C_H2 y C_H3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de amino ácidos de los mismos. De preferencia, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, de preferencia la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase patente norteamericana U.S. N° 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)); moléculas de anticuerpos de una sola cadena (por ejemplo scFv). A pesar de que en la presente descripción, y a través de la memoria, se hace referencia a anticuerpos y diversas propiedades de los anticuerpos, la misma descripción se aplica también a fragmentos de anticuerpos funcionales, por ejemplo fragmentos Fab de acción doble.

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere generalmente a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.*, Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995). Estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_H1-V_H-C_H1) que, junto con polipéptidos de la cadena liviana complementarios, forman un par de regiones de unión al antígeno. En una modalidad preferida, el fragmento es "funcional," o sea retiene cualitativamente la capacidad del anticuerpo intacto correspondiente para unirse al receptor HER blanco y, si el anticuerpo intacto también inhibe la activación o función de HER, retiene cualitativamente esta propiedad inhibidora también. Retención cualitativa significa que la actividad es retenida en sí, pero el grado de afinidad de unión y/o actividad podrían diferir.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos llamados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una denominación que refleja la capacidad para cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L entera junto con el dominio de la región

variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). El tratamiento con pepsina de un anticuerpo proporciona un solo fragmento $F(ab')_2$ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab enlazados por disulfuro, que tiene actividad de unión al antígeno divalente y todavía es capaz de entrecruzarse con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que tienen unos pocos residuos adicionales en el terminal carboxi del dominio C_{H1} , incluyendo una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación que se da aquí al Fab' en el cual el o los residuos cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ fueron producidos originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxi-terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos están determinadas por secuencias en la región Fc; esta región también es la parte reconocida por los receptores de Fc (FcR) que se encuentran en ciertos tipos de células.

"Fv" consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena liviana, en asociación no covalente estrecha. Del plegado de estos dos dominios emanan seis asas hipervariables (3 asas de cada una de las cadenas H y L) que aportan los residuos de amino ácidos para la unión al antígeno y confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres HVRs específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, a pesar de que frecuentemente con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

"Fv de una sola cadena", también abreviado como "sFv" o "scFv", se refiere a fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios del anticuerpo V_H y V_L conectados formando una sola cadena polipeptídica. De preferencia, el polipéptido sFv además comprende un enlazador polipéptido entre los dominios V_H y V_L , que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo anterior)

con enlazadores cortos (de alrededor de 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L , de manera tal, que se efectúe un apareamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V , dando como resultado un fragmento bivalente, o sea un fragmento que tiene dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más extensamente, por ejemplo, en la patente europea EP 404 097; la patente WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un 50% o más en un ensayo de competencia, y a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un 50% o más en un ensayo de competencia.

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el cual una porción de la cadena pesada y/o liviana es derivada de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o liviana es derivado de una fuente o especie diferente.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de amino ácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos.

Un "armazón de consenso humano" es un armazón que representa los residuos de amino ácidos que aparecen más comúnmente en una selección de secuencias de armazón de V_L o V_H de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de V_L o V_H de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En una modalidad, para el V_L , el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, *supra*. En una modalidad, para el V_H , el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*, *supra*.

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo que recibe o aceptor) en que residuos de

una región hipervariable del aceptor son reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas del anticuerpo. En algunos casos, residuos de las regiones de armazón (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Más aún, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo aceptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar aún más el desempeño del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente el total de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, donde todas o sustancialmente todas las asas hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FRs son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente comprenderá también al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para mayores detalles, véase Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

Un anticuerpo de esta invención "que se une a" un antígeno de interés es uno que se une al antígeno con una afinidad suficiente para que el anticuerpo sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico para apuntar a una proteína o una célula o tejido que expresa el antígeno. Con respecto a la unión de un anticuerpo a una molécula blanco, el término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido blanco particular, significa una unión que es mensurablemente diferente de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula comparada con la unión de una molécula de control. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse por competencia con una molécula de control que es similar al blanco, por ejemplo, un exceso de blanco no marcado. En este caso, la unión específica queda indicada si la unión del blanco marcado a una sonda es inhibida competitivamente por un exceso de blanco no marcado. En una modalidad particular, "se une específicamente" se refiere a la unión de un anticuerpo a sus receptores HER, blanco especificados y no a otros receptores HER no blanco especificados. Por ejemplo, el anticuerpo se une específicamente a EGFR y a HER3 pero no se une específicamente a HER2 ni a HER4, o el anticuerpo se une

específicamente a EGFR y a HER2 pero no se une específicamente a HER3 ni a HER4, o el anticuerpo se une específicamente a EGFR y a HER4 pero no se une específicamente a HER2 ni a HER3.

Un "receptor HER" es una proteína receptor tirosina quinasa que pertenece a la familia de receptores HER e incluye los receptores EGFR (ErbB1, HER1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4). El receptor HER generalmente comprenderá un dominio extracelular, que puede unirse a un ligando de HER y/o dimerizarse con otra molécula de receptor HER; un dominio transmembrana lipofílico; un dominio de tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxilo-terminal que alberga a varios residuos tirosina que pueden ser fosforilados. El receptor HER puede ser un receptor HER de "secuencia nativa" o una "variante de secuencia de amino ácidos" del mismo. De preferencia, el receptor HER es receptor HER humano de secuencia nativa.

La "ruta de HER" se refiere a la red de señalización mediada por la familia de receptores HER.

Los términos "ErbB1", "HER1", "receptor del factor de crecimiento epidérmico" y "EGFR" se usan aquí en forma intercambiable y se refieren a EGFR divulgado, por ejemplo, en Carpenter *et al. Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987), incluyendo formas mutantes que existen en la naturaleza del mismo (por ejemplo, un EGFR mutante por delección como en Ullrich *et al., Nature* (1984) 309:418-425 y Humphrey *et al. PNAS (USA)* 87:4207-4211 (1990)), y también variantes del mismo, tal como EGFRvIII. Las variantes de EGFR también incluyen variantes de delección, de sustitución y de inserción, por ejemplo las descritas en Lynch *et al. (New England Journal of Medicine* 2004, 350:2129), Paez *et al. (Science* 2004, 304:1497) y Pao *et al. (PNAS* 2004, 101:13306).

En la presente, "dominio extracelular de EGFR" o "EGFR-ECD" se refiere a un dominio de EGFR que está fuera de una célula, ya sea anclado a una membrana celular o en circulación, incluyendo fragmentos del mismo. En una modalidad, el dominio extracelular de EGFR puede comprender cuatro dominios: "Dominio I" (residuos de amino ácidos de alrededor de 1-158, "Dominio II" (residuos de amino ácidos 159-336), "Dominio III" (residuos de amino ácidos 337-470) y "Dominio IV" (residuos de amino ácidos 471-645), donde los límites son aproximados y pueden variar en alrededor de 1-3 amino ácidos.

Las expresiones "ErbB2" y "HER2" se usan aquí en forma intercambiable y se refieren a la proteína HER2 humana descrita, por ejemplo, en Semba *et al., PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985) y Yamamoto *et al. Nature*

319:230-234 (1986) (número de acceso de GenBank X03363). El término "erbB2" se refiere al gen que codifica HER2 humano y "neu" se refiere al gen que codifica p185^{neu} de rata. El HER2 preferido es HER2 humano de secuencia nativa.

En la presente, "dominio extracelular de HER2" o "HER2-ECD" se refiere a un dominio de HER2 que está fuera de una célula, ya sea anclado a una membrana celular o en circulación, incluyendo fragmentos del mismo. En una modalidad, el dominio extracelular de HER2 puede comprender cuatro dominios: "Dominio I" (residuos de amino ácidos de alrededor de 1-195, "Dominio II" (residuos de amino ácidos de alrededor de 196-319), "Dominio III" (residuos de amino ácidos de alrededor de 320-488) y "Dominio IV" (residuos de amino ácidos de alrededor de 489-630) (numeración de los residuos sin péptido de señal). Véase Garrett *et al. Mol. Cell.* 11: 495-505 (2003), Cho *et al. Nature* 421: 756-760 (2003), Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004) y Plowman *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1746-1750 (1993).

"ErbB3" y "HER3" se refieren al polipéptido receptor divulgado, por ejemplo, en las patentes norteamericanas US números 5.183.884 y 5.480.968 y también en Kraus *et al. PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989).

En la presente, "dominio extracelular de HER3" o "HER3-ECD" se refiere a un dominio de HER3 que está fuera de una célula, ya sea anclado a una membrana celular o en circulación, incluyendo fragmentos del mismo. En una modalidad, el dominio extracelular de HER3 puede comprender cuatro dominios: Dominio I, Dominio II, Dominio III y Dominio IV. En una modalidad, el HER3-ECD comprende los amino ácidos 1-636 (numeración incluyendo péptido de señal). En una modalidad, el dominio III de HER3 comprende los amino ácidos 328-532 (numeración incluyendo péptido de señal).

Los términos "ErbB4" y "HER4" se refieren aquí al polipéptido receptor divulgado, por ejemplo, en la solicitud de patente europea EP N° 599 274; Plowman *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); y Plowman *et al., Nature*, 366:473-475 (1993), incluyendo isoformas del mismo, por ejemplo, como se divulga en la patente WO 99/19488, publicada el 22 de abril de 1999.

"Ligando de HER" significa un polipéptido que se une y/o activa a un receptor HER. El ligando de HER de particular interés aquí es un ligando de HER humano de secuencia nativa, tal como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Savage *et al., J. Biol. Chem.* 247:7612-7621 (1972)); factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) (Marquardt *et al., Science* 223:1079-1082 (1984)); anfirregulina, también conocida como factor de crecimiento autocrino de

queratinocitos o derivado de schwannoma (Shoyab *et al.* *Science* 243:1074-1076 (1989); Kimura *et al.* *Nature* 348:257-260 (1990) y Cook *et al.* *Mol. Cell. Biol.* 11:2547-2557 (1991)); betacelulina (Shing *et al.*, *Science* 259:1604-1607 (1993) y Sasada *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:1173 (1993)); factor de crecimiento epidérmico que se une a heparina (HB-EGF) (Higashiyama *et al.*, *Science* 251:936-939 (1991)); epirregulina (Toyoda *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:7495-7500 (1995) y Komurasaki *et al.* *Oncogene* 15:2841-2848 (1997)); una herregulina (véase más abajo); neurregulina-2 (NRG-2) (Carraway *et al.*, *Nature* 387:512-516 (1997)); neurregulina-3 (NRG-3) (Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9562-9567 (1997)); neurregulina-4 (NRG-4) (Harari *et al.* *Oncogene* 18:2681-89 (1999)); y cripto (CR-1) (Kannan *et al.* *J. Biol. Chem.* 272(6):3330-3335 (1997)). Los ligandos de HER que se unen a EGFR incluyen EGF, TGF- α , anfirregulina, betacelulina, HB-EGF y epirregulina. Los ligandos de HER que se unen a HER3 incluyen herregulinas y NRG-2. Los ligandos de HER capaces de unirse a HER4 incluyen betacelulina, epirregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 y herregulinas.

"Herregulina" (HRG), cuando se usa aquí, se refiere a un polipéptido codificado por el producto génico herregulina, como se divulga en la patente norteamericana U.S. N° 5.641.869, o Marchionni *et al.*, *Nature*, 362:312-318 (1993). Los ejemplos de herregulinas incluyen herregulina- α , herregulina- β 1, herregulina- β 2 y herregulina- β 3 (Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205-1210 (1992); y patente norteamericana U.S. N° 5.641.869); factor de diferenciación *neu* (NDF) (Peles *et al.* *Cell* 69: 205-216 (1992)); inductor de actividad del receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls *et al.* *Cell* 72:801-815 (1993)); factores de crecimiento gliales (GGFs) (Marchionni *et al.*, *Nature*, 362:312-318 (1993)); factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho *et al.* *J. Biol. Chem.* 270:14523-14532 (1995)); γ -herregulina (Schaefer *et al.* *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)).

Un "dímero de HER", en la presente, es un dímero asociado en forma no covalente que comprende al menos dos receptores HER. Estos complejos pueden formarse cuando una célula que expresa dos o más receptores HER se expone a un ligando de HER, y pueden ser aislados por inmunoprecipitación y analizados por SDS-PAGE como se describe en Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994), por ejemplo. Otras proteínas, tal como una subunidad de receptor de citoquina (por ejemplo gp130), pueden asociarse con el dímero.

Un "heterodímero de HER", en la presente, es un heterodímero asociado en forma no covalente que comprende al menos dos receptores HER diferentes, tales como los heterodímeros EGFR-HER2, EGFR-HER3, EGFR-HER4, HER2-HER3 o HER2-HER4 heterodímeros.

Un "inhibidor de HER" es un agente que interfiere con la activación o función de HER. Los ejemplos de inhibidores de HER incluyen anticuerpos contra HER (por ejemplo, anticuerpos contra EGFR, HER2, HER3 o HER4); fármacos direccionados hacia EGFR; antagonistas de HER de molécula pequeña; inhibidores tirosina quinasas de HER; inhibidores tirosina quinasas dobles de HER2 y EGFR tal como lapatinib/GW572016; moléculas antisentido (véase, por ejemplo, la patente WO 2004/87207); y/o agentes que se unen a, o interfieren con la función de, moléculas de señalización aguas abajo, tales como MAPK o Akt. De preferencia, el inhibidor de HER es un anticuerpo que se une a un receptor HER.

Un "inhibidor de la dimerización de HER" o "HDI" es un agente que inhibe la formación de un homodímero de HER o heterodímero de HER. De preferencia, el inhibidor de la dimerización de HER es un anticuerpo. Sin embargo, los inhibidores de la dimerización de HER también incluyen pequeñas moléculas peptídicas y no peptídicas, y otras entidades químicas que inhiben la formación de homo- o heterodímeros de HER.

Un anticuerpo que "inhibe la dimerización de HER" es un anticuerpo que inhibe, o interfiere con, la formación de un dímero de HER, independientemente del mecanismo subyacente. En una modalidad, este anticuerpo se une a HER2 en el sitio de unión heterodimérico del mismo. Un ejemplo particular de un anticuerpo que inhibe la dimerización es pertuzumab (Pmab), o MAb 2C4. Otros ejemplos de inhibidores de la dimerización de HER incluyen anticuerpos que se unen a EGFR e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de otros receptores HER (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 806 contra EGFR, MAb 806, que se une a EGFR activado o "libre de amarras"; véase Johns *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)); anticuerpos que se unen a HER3 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de otros receptores HER; anticuerpos que se unen a HER4 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de otros receptores HER; inhibidores de la dimerización de péptidos (patente norteamericana US N° 6.417.168); inhibidores de la dimerización antisentido; etc.

Como se usa aquí, "antagonista de EGFR" o "inhibidor de EGFR" se refiere a aquellos compuestos que se unen específicamente a EGFR e impiden o

reducen su actividad de señalización, y no se unen específicamente a HER2, HER3 ni HER4. Los ejemplos de estos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase la patente norteamericana US N° 4.943.533, Mendelsohn *et al.*) y variantes de los mismos, tales como 225 quimérico (C225 o Cetuximab; ERBITUX®) y 225 humano reconvertido (H225) (véase la patente WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo totalmente humano direccionado hacia EGFR (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (patente norteamericana US N° 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR, como se describe en la patente norteamericana US N° 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF o Panitumumab (véase la patente WO 98/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto *et al.* *Eur. J. Cancer* 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab), un anticuerpo para EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compite tanto con EGF como con TGF-alfa por la unión a EGFR (EMD/Merck); anticuerpo contra EGFR humano, HuMax-EGFR (GenMab); anticuerpos totalmente humanos conocidos como E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 y E7.6.3 y descritos en la patente norteamericana US 6.235.883; MDX-447 (Medarex Inc); y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR puede ser conjugado con un agente citotóxico, generando así un inmunoconjugado (véase, por ejemplo, la patente europea EP 659 439 A2, Merck Patent GmbH). Los antagonistas de EGFR incluyen moléculas pequeñas tales como los compuestos descritos en las patentes norteamericanas US números: 5.616.582, 5.457.105, 5.475.001, 5.654.307, 5.679.683, 6.084.095, 6.265.410, 6.455.534, 6.521.620, 6.596.726, 6.713.484, 5.770.599, 6.140.332, 5.866.572, 6.399.602, 6.344.459, 6.602.863, 6.391.874, 6.344.455, 5.760.041, 6.002.008, y 5.747.498, y también las siguientes publicaciones PCT: WO 98/14451, WO 98/50038, WO 99/09016 y WO 99/24037. Antagonistas de EGFR de molécula pequeña particulares incluyen OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, diclorhidrato de N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinilo], Pfizer Inc.); ZD1839, gefitinib (IRESSA®) 4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolina, AstraZeneca); ZM 105180 (6-amino-4-(3-metilfenil-amino)quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluorofenil)-

N2-(1-metilpiperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidina-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletil)amino]-1H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletil)-amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butinamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida) (Wyeth); AG1478 (Sugen); y AG1571 (SU 5271; Sugén).

Un "anticuerpo contra HER" es un anticuerpo que se une a un receptor HER. Opcionalmente, el anticuerpo contra HER interfiere además con la activación o función de HER. Anticuerpos particulares contra HER2 incluyen pertuzumab y trastuzumab. Ejemplos de anticuerpos particulares contra EGFR incluyen cetuximab y panitumumab.

Las publicaciones de patentes relacionadas con anticuerpos contra HER incluyen: US 5.677.171, US 5.720.937, US 5.720.954, US 5.725.856, US 5.770.195, US 5.772.997, US 6.165.464, US 6.387.371, US 6.399.063, US 2002/0192211 A1, US 6.015.567, US 6.333.169, US 4.968.603, US 5.821.337, US 6.054.297, US 6.407.213, US 6.719.971, US 6.800.738, US 2004/0236078 A1, US 5.648.237, US 6.267.958, US 6.685.940, US 6.821.515, WO 98/17797, US 6.333.398, US 6.797.814, US 6.339.142, US 6.417.335, US 6.489.447, WO 99/31140, US 2003/0147884 A1, US 2003/0170234 A1, US 2005/0002928A1, US 6.573.043, US 2003/0152987 A1, WO 99/48527, US 2002/0141993 A1, WO 01/00245, US 2003/0086924, US 2004/0013667 A1, WO 00/69460, WO 01/00238, WO 01/15730, US 6.627.196 B1, US 6.632.979 B1, WO 01/00244, US 2002/0090662 A1, WO 01/89566, US 2002/0064785, US 2003/0134344, WO 04/24866, US 2004/0082047, US 2003/0175845 A1, WO 03/087131, US 2003/0228663, WO 2004/008099 A2, US 2004/0106161, WO 2004/048525, US 2004/0258685 A1, US 5.985.553, US 5.747.261, US 4.935.341, US 5.401.638, US 5.604.107, WO 87/07646, WO 89/10412, WO 91/05264, EP 412 116 B1, EP 494 135 B1, US 5.824.311, EP 444 181 B1, EP 1 006 194 A2, US 2002/0155527 A1, WO 91/02062, US 5.571.894, US 5.939.531, EP 502 812 B1, WO 93/03741, EP 554 441 B1, EP 656 367 A1, US 5.288.477, US 5.514.554, US 5.587.458, WO 93/12220, WO 93/16185, US 5.877.305, WO 93/21319, WO 93/21232, US 5.856.089, WO 94/22478, US 5.910.486, US 6.028.059, WO 96/07321, US 5.804.396, US 5.846.749, EP 711 565, WO 96/16673, US 5.783.404, US 5.977.322, US 6.512.097, WO 97/00271, US 6.270.765, US 6.395.272, US 5.837.243, WO 96/40789, US 5.783.186, US 6.458.356, WO 97/20858, WO 97/38731, US 6.214.388, US 5.925.519, WO 98/02463, US 5.922.845, WO

98/18489, WO 98/33914, US 5.994.071, WO 98/45479, US 6.358.682 B1, US 2003/0059790, WO 99/55367, WO 01/20033, US 2002/0076695 A1, WO 00/78347, WO 01/09187, WO 01/21192, WO 01/32155, WO 01/53354, WO 01/56604, WO 01/76630, WO 02/05791, WO 02/11677, US 6.582.919, US 2002/0192652 A1, US 2003/0211530 A1, WO 02/44413, US 2002/0142328, US 6.602.670 B2, WO 02/45653, WO 02/055106, US 2003/0152572, US 2003/0165840, WO 02/087619, WO 03/006509, WO 03/012072, WO 03/028638, US 2003/0068318, WO 03/041736, EP 1 357 132, US 2003/0202973, US 2004/0138160, US 5.705.157, US 6.123.939, EP 616 812 B1, US 2003/0103973, US 2003/0108545, US 6.403.630 B1, WO 00/61145, WO 00/61185, US 6.333.348 B1, WO 01/05425, WO 01/64246, US 2003/0022918, US 2002/0051785 A1, US 6,767,541, WO 01/76586, US 2003/0144252, WO 01/87336, US 2002/0031515 A1, WO 01/87334, WO 02/05791, WO 02/09754, US 2003/0157097, US 2002/0076408, WO 02/055106, WO 02/070008, WO 02/089842 y WO 03/86467.

"Activación de HER" se refiere a la activación, o fosforilación, de cualesquier uno o más receptores HER. Generalmente, la activación de HER da como resultado una transducción de señales (por ejemplo, aquella causada por un dominio de quinasa intracelular de un receptor HER que fosforila residuos tirosina en el receptor HER o un polipéptido sustrato). La activación de HER puede ser mediada por la unión de un ligando de HER a un dímero de HER que comprende el receptor HER de interés. La unión de un ligando de HER a un dímero de HER puede activar un dominio de quinasa de uno o más de los receptores HER en el dímero, y así da como resultado la fosforilación de residuos tirosina en uno o más de los receptores HER y/o la fosforilación de residuos tirosina en polipéptido(s) sustrato adicional(es), tales como las quinasas intracelulares Akt o MAPK.

"Fosforilación" se refiere a la adición de uno o más grupos fosfato a una proteína, tal como un receptor HER, o sustrato.

Un "sitio de unión heterodimérico" en HER2 se refiere a una región en el dominio extracelular de HER2 que hace contacto, o forma una interfaz, con una región en el dominio extracelular de EGFR, HER3 o HER4 al formar un dímero con el mismo. La región se encuentra en el Dominio II de HER2. Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

Un anticuerpo contra HER2 que "se une a un sitio de unión heterodimérico" de HER2, se une a residuos en el dominio II (y opcionalmente también se une a residuos en otros de los dominios del dominio extracelular de HER2, tales como los dominios I y III), y puede obstruir estéricamente, al menos

en algún grado, la formación de un heterodímero HER2-EGFR, HER2-HER3 o HER2-HER4. Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004) caracterizan la estructura cristalina de HER2-pertuzumab, depositado en RCSB Protein Data Bank (Código ID IS78), ilustrando un ejemplo de anticuerpo que se une al sitio de unión heterodimérico de HER2.

Un anticuerpo que "se une al Dominio II" de HER2, se une a residuos en el dominio II y opcionalmente a residuos en otro(s) dominio(s) de HER2, tales como los dominios I y III.

"Aislado", cuando se usa para describir los diversos anticuerpos divulgados aquí, significa un anticuerpo que ha sido identificado y separado y/o recuperado de una célula o cultivo celular desde donde fue expresado. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En modalidades preferidas, el anticuerpo será purificado (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de amino ácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de vaso giratorio, o (2) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, de preferencia, tinción con plata. Anticuerpo aislado incluye anticuerpos *in situ* dentro de células recombinantes, porque al menos un componente del entorno natural del polipéptido no estará presente. Sin embargo, normalmente el polipéptido aislado se preparará mediante al menos un paso de purificación. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER multiespecífico es un anticuerpo aislado.

El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación enlazada operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para las procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores ("enhancers").

El ácido nucleico está "enlazado operativamente" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está enlazado operativamente a ADN para un polipéptido, si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está

enlazado operativamente a una secuencia de codificación si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está enlazado operativamente a una secuencia de codificación si está ubicado de forma que facilite la traducción. En general, "enlazado operativamente" significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas, y en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. El enlace se realiza mediante ligazón en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o enlazadores oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de amino ácidos", con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia, se define como el porcentaje de residuos de amino ácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de amino ácidos en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de amino ácidos puede efectuarse de diversas maneras que están dentro de la experiencia en el arte, por ejemplo, usando un software computacional disponible al público tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en el arte pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualesquier algoritmos necesarios para lograr el máximo alineamiento a través de la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Sin embargo, para los propósitos de la presente, los valores de porcentaje de identidad de secuencia de amino ácidos se generan usando el programa computacional de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa computacional de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente ha sido presentado con documentación del usuario en la oficina U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde está registrado bajo el N° de Registro de U.S. Copyright TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede ser compilado a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debe ser compilado para el uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones en que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de amino ácidos, el porcentaje de identidad de secuencia de amino ácidos de una secuencia de amino ácidos A dada a, con o contra una secuencia de amino ácidos B dada (lo que alternativamente puede expresarse como una secuencia de amino ácidos A dada que tiene o comprende un determinado porcentaje de identidad de secuencia de amino ácidos a, con o contra una secuencia de amino ácidos B dada) se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de amino ácidos calificados como concordancias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de A y B hecho por ese programa, y donde Y es el número total de residuos de amino ácidos en B. Se podrá apreciar que cuando la longitud de la secuencia de amino ácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de amino ácidos B, el porcentaje de identidad de secuencia de amino ácidos de A a B no será igual al porcentaje de identidad de secuencia de amino ácidos de B a A. A menos que específicamente se declare otra cosa, todos los valores de porcentaje de identidad de secuencia de amino ácidos usados aquí se obtienen como se describió en el párrafo inmediatamente precedente, usando el programa computacional ALIGN-2.

La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación es fácilmente determinable por un técnico de nivel medio en el arte, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura del lavado y la concentración de sales. En general, las sondas más largas requieren temperaturas más altas para un alineamiento correcto, en tanto que las sondas más cortas requieren temperaturas más bajas. La hibridación generalmente depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para realinearse cuando las hebras complementarias están presentes en un ambiente por debajo de su temperatura de fusión. Mientras más alto es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, más alta será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se desprende que las temperaturas relativas más altas tenderán a hacer más rigurosas las condiciones de la reacción, mientras que las temperaturas más bajas, menos. Para detalles y explicación adicionales de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers (1995).

Las "condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se definen aquí, pueden identificarse como aquellas que: (1) emplean baja

fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecilsulfato de sodio al 0,1% a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente de desnaturalización tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con 0,1% de albúmina de suero de bovino/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con 750 mM de cloruro de sodio, 75 mM citrato de sodio a 42°C; o (3) hibridación durante la noche en una solución que emplea 50% de formamida, 5 x SSC (0,75 M de NaCl, 0,075 M de citrato de sodio), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sodio, 5 x solución de Denhardt, ADN de semen de salmón sonicado (50 µg/ml), 0,1% de SDS y 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con un lavado de 10 minutos a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) seguido por un lavado de 10 minutos con alta rigurosidad consistente en 0,1 x SSC conteniendo EDTA a 55°C.

Las "condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y porcentaje de SDS) menos rigurosas que las descritas más arriba. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es la incubación durante la noche a 37°C en una solución que comprende: 20% de formamida, 5 x SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato trisódico), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano, y 20 mg/ml de ADN de semen de salmón cortado y desnaturalizado, seguido por el lavado de los filtros en 1 x SSC a alrededor de 37-50°C. El experto en el arte sabrá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. como sea necesario para acomodar factores tales como longitud de la sonda y similares.

Las "funciones efectoras" de un anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc de secuencia de amino ácidos variante) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de un anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación hacia abajo de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y activación de células B.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual la Ig secretada unida a

receptores de Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite a estas células efectoras citotóxicas unirse específicamente a una célula blanco portadora de antígeno y posteriormente matar a la célula blanco con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para esta matanza. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, expresan solamente FcγRIII, en tanto que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcRs en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede efectuarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el que se describe en las patentes norteamericanas US N° 5.500.362 ó 5.821.337. Las células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede ser evaluada *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se divulga en Clynes *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*) 95:652-656 (1998).

"Receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de amino ácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase una revisión en M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcRs se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo aquéllos que serán identificados en el futuro, están comprendidos aquí dentro del término "FcR". El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgGs maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y efectúan funciones efectoras. De preferencia, las células expresan al menos FcγRIII y efectúan la función efectora ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; siendo preferidas las PBMCs y las células NK. Las células efectoras pueden ser aisladas de una fuente nativa, por ejemplo de sangre.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula blanco en presencia de complemento. La activación de la ruta clásica del complemento es iniciada por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, puede efectuarse un ensayo de CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

Como se usa aquí, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "tratando") se refiere a una intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del individuo que está siendo tratado, y puede efectuarse ya sea para profilaxis o durante el curso de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no están limitados a, prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualesquier consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, prevención de la metástasis, disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, mejoría o alivio del estado de enfermedad, y remisión o pronóstico mejorado. En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención se usan para retardar el desarrollo de una enfermedad o para hacer más lenta la progresión de una enfermedad.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto. En el caso de un tumor (por ejemplo, un tumor canceroso), la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede disminuir el número de células cancerosas; disminuir el tamaño del tumor primario; inhibir (o sea, hacer más lenta en alguna medida y de preferencia detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (o sea, hacer más lenta en alguna medida y de preferencia detener) la metástasis del tumor; inhibir en alguna medida el crecimiento del tumor; y/o aliviar en alguna

medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo pueda prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia *in vivo* puede medirse, por ejemplo, evaluando la duración de la supervivencia, el tiempo para la progresión de la enfermedad (TTP), las tasas de respuesta (RR), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida.

"Reducir o inhibir" significa la capacidad de provocar una disminución general preferentemente de un 20% o mayor, más preferentemente de un 50% o mayor, y más preferentemente aún, de un 75%, 85%, 90%, 95% o mayor. Reducir o inhibir pueden referirse a los síntomas del trastorno que está siendo tratado, la presencia o tamaño de las metástasis, el tamaño del tumor primario, o el tamaño o número de los vasos sanguíneos en trastornos angiogénicos.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la condición fisiológica en los mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Incluidos en esta definición están los cánceres benignos y malignos. "Cáncer en etapa temprana" significa un cáncer que no es invasivo ni metastásico o está clasificado como un cáncer en Etapa 0, I o II.

El término "precanceroso" se refiere a una condición o un crecimiento que típicamente precede o se desarrolla a un cáncer.

"No metastásico" significa un cáncer que es benigno o que permanece en el sitio primario y no ha penetrado en el sistema de vasos linfáticos o sanguíneos ni en tejidos distintos del sitio primario. Generalmente, un cáncer no metastásico es cualquier cáncer que es un cáncer en Etapa 0, I o II, y ocasionalmente un cáncer en Etapa III.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que es no tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no está limitado a, un tampón, excipiente, estabilizador o preservante.

El término "terapia anti-cáncer" se refiere a una terapia útil para tratar el cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos anti-cáncer incluyen, pero no están limitados a, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en terapia de radiación, agentes anti-angiogénesis, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulina, y otros agentes para tratar el cáncer, anticuerpos anti-CD20, inhibidores del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (por ejemplo, Gleevec® (mesilato de imatinib)), un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citoquinas,

antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a uno o más de los siguientes blancos EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o receptor(es) de VEGF, TRAIL/Apo2, y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. Combinaciones de los mismos también están incluidas en la invención.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocadona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilen-tiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-amino-camptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucil, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediína (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma 1I y calicheamicina omega 1I (véase, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor de alfa-4 integrina oral; dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; y también cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediína de cromoproteínas relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, antramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, doxorubicina HCl,

inyección de liposomas (DOXIL®), doxorubicina liposómica TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposómica peguilada (CAELYX®) y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tal como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; compuestos antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glicósido aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxíurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas de la albúmina modificada por ingeniería genética de paclitaxel (ABRAXANE®) y docetaxel (TAXOTERE®); clorambucil; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN®) y carboplatino; vincas, que impiden la polimerización de tubulina que forma microtúbulos, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorín; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tal como ácido retinoico, incluyendo

bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tal como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquéllos que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, por ejemplo PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas para terapia génica, por ejemplo vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo celecoxib o etoricoxib), inhibidor del proteasoma (por ejemplo PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersén sódico (GENASÉNSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR (véase definición más adelante); inhibidores de tirosina quinasas (véase definición más adelante); inhibidores de serina-treonina quinasas tales como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inhibidores de farnesiltransferasa tal como lonafarnib (SCH 6636, SARASAR®); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; y también combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN®) combinado con 5-FU y leucovorín.

Los agentes quimioterapéuticos definidos aquí incluyen "agentes anti-hormonales" o "agentes terapéuticos endocrinos" que actúan regulando, reduciendo, bloqueando o inhibiendo los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer. Pueden ser las hormonas mismas, incluyendo pero no limitadas a: anti-estrógenos con un perfil mixto de agonista/antagonista, incluyendo tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, keoxifeno, y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs), tal como SERM3; anti-estrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®) y EM800 (estos agentes pueden bloquear la dimerización de los receptores de estrógenos (ERs), inhibir la unión al ADN,

aumentar el recambio de ERs y/o disminuir los niveles de ERs); inhibidores de aromatasa, incluyendo inhibidores de aromatasa esteroideas tales como formestano y exemestano (AROMASIN®) e inhibidores de aromatasa no esteroideas tales como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de aromatasa incluyendo vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol y 4(5)-imidazoles; agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante, incluyendo leuprolide (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, buserelina y triptorelina; esteroides sexuales, incluyendo progestinas tales como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, estrógenos tales como dietilestilbestrol y premarina, y andrógenos/retinoides tales como fluoximesterona, ácido retinoico todo trans y fenretinida; onapristona; anti-progesteronas; reguladores hacia abajo de los receptores de estrógenos (ERDs); anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; y también combinaciones de dos o más de los anteriores.

Un "sujeto" es un vertebrado, de preferencia un mamífero, de mayor preferencia un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no están limitados a, seres humanos, primates superiores no humanos, primates, animales de granja (tales como vacas), animales para deportes, mascotas (tales como gatos, perros y caballos) y animales de laboratorio (tales como ratones y ratas).

II. Descripción detallada

La presente invención proporciona anticuerpos, y fragmentos de anticuerpos funcionales, que comprenden al menos un dominio de unión al antígeno que tiene especificidad de unión por al menos dos receptores HER diferentes, en particular EGFR y HER2, EGFR y HER3, o EGFR y HER4. Estos anticuerpos multiespecíficos son distintos de los anticuerpos multiespecíficos tradicionales que tienen dominios de unión al antígeno (habitualmente dos) con especificidades de unión diferentes. En determinadas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos descritos aquí tienen la estructura molecular de una IgG (o Fab) y así retienen atributos favorables de una IgG para el desarrollo terapéutico, tales como propiedades farmacocinéticas predecibles, protocolos de fabricación bien establecidos, elección de funciones efectoras mediadas por Fc, y bi- o mono-valencias. Estos atributos favorables frecuentemente faltan en los

anticuerpos multiespecíficos tradicionales que se derivan ensamblando dos fragmentos de anticuerpos distintos para formar una molécula.

Los anticuerpos multiespecíficos descritos aquí, y fragmentos de anticuerpos funcionales de los mismos, son útiles para el tratamiento de enfermedades o condiciones, tales como cánceres, que están asociadas con las rutas de los receptores HER. En una modalidad particular, el dominio de unión al antígeno del anticuerpo multiespecífico se une específicamente a ambos EGFR y HER3. En otra modalidad, el dominio de unión al antígeno se une específicamente a ambos EGFR y HER2. En otra modalidad, el dominio de unión al antígeno se une específicamente a ambos EGFR y HER4.

Un aspecto particular de la invención proporciona anticuerpos que comprenden dos (o más) dominios de unión al antígeno, cada uno de los cuales tiene la misma especificidad de unión.

Una modalidad proporciona un anticuerpo multiespecífico constituido por dos dominios de unión al antígeno, donde cada dominio de unión al antígeno tiene la misma especificidad y se une específicamente a dos receptores HER diferentes. En una modalidad particular, cada dominio de unión al antígeno se une específicamente a ambos EGFR y HER3. En otra modalidad, cada dominio de unión al antígeno se une específicamente a ambos EGFR y HER2. En otra modalidad, cada dominio de unión al antígeno se une específicamente a ambos EGFR y HER4. En otra modalidad, cada dominio de unión al antígeno se une específicamente al Dominio III de EGFR. En otra modalidad, cada dominio de unión al antígeno se une específicamente al Dominio III de HER3. En otra modalidad, cada dominio de unión al antígeno es capaz de unirse al Dominio III de EGFR y al Dominio III de HER3.

En modalidades particulares, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a su o sus receptores HER blanco y no se une específicamente a los receptores HER no blanco. En consecuencia, en una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a EGFR y a HER3 pero no se une específicamente a HER2 ni a HER4. En otra modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a EGFR y a HER2 pero no se une específicamente a HER3 ni a HER4. En otra modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a EGFR y a HER4 pero no se une específicamente a HER2 ni a HER3.

En determinadas modalidades, cada dominio de unión al antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de

cadena liviana (V_L). En una modalidad, la unidad V_HV_L se une específicamente a dos receptores HER diferentes. En una modalidad particular, la unidad V_HV_L se une específicamente a EGFR y a HER3. En otra modalidad, la unidad V_HV_L se une específicamente a EGFR y a HER2. En otra modalidad, la unidad V_HV_L se une específicamente a EGFR y a HER4.

En modalidades particulares, la afinidad del anticuerpo multiespecífico por su o sus receptores HER blanco está indicada por una K_d de menos de 10^{-5} M, menos de 10^{-6} M, menos de 10^{-7} M, menos de 10^{-8} M, menos de 10^{-9} M, menos de 10^{-10} M, menos de 10^{-11} M o menos de 10^{-12} M. En una modalidad, la K_d del anticuerpo por uno de sus receptores blanco es menos de 10^{-7} M, menos de 10^{-8} M, menos de 10^{-9} M, menos de 10^{-10} M, menos de 10^{-11} M o menos de 10^{-12} M. En otra modalidad, la K_d del anticuerpo multiespecífico por todos sus receptores blanco es menos de 10^{-7} M, menos de 10^{-8} M, menos de 10^{-9} M, menos de 10^{-10} M, menos de 10^{-11} M o menos de 10^{-12} M.

En algunas modalidades, la afinidad del anticuerpo multiespecífico por uno de sus receptores HER blanco es mayor que por su(s) otro(s) receptor(es) HER blanco. En una modalidad, la afinidad del anticuerpo multiespecífico por un receptor HER blanco es al menos 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40, 50, 100 veces mayor que su afinidad por otro receptor HER blanco. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a EGFR y a otro receptor HER, y su afinidad de unión por el otro receptor HER es al menos 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40, 50 ó 100 veces mayor que su afinidad por EGFR. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a EGFR y a HER3, y su afinidad de unión por HER3 es al menos 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40, 50 ó 100 veces mayor que su afinidad de unión por EGFR. En otra modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a EGFR y a HER2, y su afinidad de unión por HER2 es al menos 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40, 50 ó 100 veces mayor que su afinidad de unión por EGFR. En otra modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a EGFR y a HER4, y su afinidad de unión por HER4 es al menos 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40, 50 ó 100 veces mayor que su afinidad por EGFR.

En algunas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención inhiben una actividad biológica de al menos uno de los receptores HER a los cuales se unen específicamente. En algunas modalidades,

los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención inhiben una actividad biológica de ambos receptores HER a los cuales se unen específicamente. Así por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico de la invención inhibe una actividad biológica de un receptor EGFR y/o HER2 y/o HER3 y/o HER4.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a EGFR humano y a HER3 humano, e inhibe una actividad biológica de al menos el EGFR. En otra modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a EGFR humano y a HER3 humano, e inhibe al menos una actividad biológica de HER3. En otra modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a EGFR humano y a HER3 humano, e inhibe una actividad biológica de ambos EGFR y HER3.

En otra modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une específicamente a EGFR humano y a HER2 humano, e inhibe al menos una actividad biológica de EGFR. En otra modalidad, el anticuerpo se une específicamente a EGFR humano y a HER2 humano, e inhibe al menos una actividad biológica de HER2. En otra modalidad, el anticuerpo se une específicamente a EGFR humano y a HER2 humano, e inhibe una actividad biológica de ambos EGFR y HER2.

En otra modalidad, el anticuerpo se une específicamente a EGFR humano y a HER4 humano, e inhibe una actividad biológica de al menos el EGFR. En otra modalidad, el anticuerpo se une específicamente a EGFR humano y a HER4 humano, e inhibe al menos una actividad biológica de HER4. En otra modalidad, el anticuerpo se une específicamente a EGFR humano y a HER4 humano, e inhibe una actividad biológica de ambos EGFR y HER4.

En determinadas modalidades, los anticuerpos de la presente inhiben una actividad biológica impulsada, al menos parcialmente, por un receptor HER al cual no se unen. Por ejemplo, los anticuerpos que se unen a EGFR y a HER3 todavía podrían ser capaces de inhibir una actividad biológica impulsada por HER2.

La inhibición de una actividad biológica puede medirse en ensayos bien conocidos en el arte. Así por ejemplo, los anticuerpos de la presente pueden inhibir la fosforilación de uno o más de los receptores HER, y/o pueden inhibir la unión de un ligando de HER a su receptor, y/o pueden inhibir la proliferación inducida por el ligando de células que expresan el receptor HER y/o pueden inhibir rutas de señalización aguas abajo que son activadas mediante un receptor HER.

Dos rutas de señalización aguas abajo principales que son activadas en respuesta a la fosforilación de EGFR, son las rutas Ras/MAPK y fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt. Por lo tanto, la capacidad de un anticuerpo de la presente para inhibir la actividad biológica de un receptor HER puede medirse evaluando si puede bloquear la activación de estas rutas, por ejemplo en células NR6. Así, puede medirse la capacidad de los anticuerpos para bloquear la fosforilación inducida por el ligando de p44/42MAPK, pAKT u otras moléculas de señalización aguas abajo. La señalización de HER3 también ha sido implicada en varias otras rutas, incluyendo c-met y FGFR. La capacidad de un anticuerpo de la presente para inhibir la actividad biológica de un receptor HER puede medirse evaluando si puede bloquear la activación de estas rutas.

Un aspecto de la invención proporciona anticuerpos multiespecíficos que se generan diversificando un anticuerpo con especificidad para un receptor HER de tal manera que desarrolle especificidad para un segundo receptor HER, reteniendo la especificidad para el primer receptor HER. En términos genéricos, este método comprende los pasos de (1) diversificar la secuencia de amino ácidos de un dominio variable de cadena liviana (V_L) de un anticuerpo, donde antes de la diversificación, el anticuerpo comprendía un V_L y un dominio variable de cadena pesada (V_H) capaces de unirse a un epítipo en un primer receptor HER y (2) seleccionar un anticuerpo diversificado capaz de unirse al epítipo en el primer receptor HER y a un epítipo en un segundo receptor HER. Estos pasos pueden repetirse con el fin de generar anticuerpos multiespecíficos. Una descripción detallada de este método se proporciona en la publicación de patente norteamericana US N° 2008/0069820, cuyas enseñanzas completas se incorporan aquí expresamente por referencia. Este método se ilustra adicionalmente en los Ejemplos. En el método descrito en los Ejemplos, un anticuerpo anti-EGFR se usa como molde para la diversificación y, por lo tanto, para la preparación de anticuerpos anti-HER multiespecíficos, sin embargo, otros anticuerpos anti-HER, tales como anticuerpos anti-HER2, anti-HER3 o anti-HER4 también podrían servir como molde.

La invención proporciona además anticuerpos monoespecíficos que son capaces de unirse específicamente a un receptor HER, y no se unen específicamente a los otros receptores HER. En una modalidad, el anticuerpo se une específicamente a EGFR. En una modalidad, el anticuerpo se une específicamente al Dominio III de EGFR. En algunas modalidades, el anticuerpo se une específicamente a EGFR e inhibe una actividad biológica de EGFR. En

otra modalidad, el anticuerpo se une específicamente a HER3. En una modalidad, el anticuerpo se une específicamente al Dominio III de HER3. En algunas modalidades, el anticuerpo se une específicamente a HER3 e inhibe una actividad biológica de HER3.

Los anticuerpos monoespecíficos pueden usarse como el anticuerpo molde para una diversificación adicional, para añadir especificidad de unión a otros receptores HER o a otros antígenos blanco.

Toxicidad

La toxicidad de los antagonistas de EGFR está bien documentada tanto en estudios pre-clínicos como clínicos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-EGFR cetuximab exhibe diversas formas de toxicidad a niveles terapéuticamente eficaces. Las reacciones adversas más comunes con cetuximab (ERBITUX®, Imclone) (incidencia $\geq 25\%$) son reacciones adversas cutáneas (incluyendo sarpullido, prurito y cambios en las uñas), cefalea, diarrea e infección. Las reacciones adversas más serias asociadas con el tratamiento con cetuximab son reacciones a las infusiones, paro cardiorrespiratorio, toxicidad dermatológica y dermatitis por radiación, sepsis, insuficiencia renal, enfermedad pulmonar intersticial y embolia pulmonar. Véase, "Biologics License Agreement (BLA)" para cetuximab (solicitud N° 125084) (incorporado aquí por referencia). Problemas de toxicidad similares se observan con panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), donde se produjo toxicidad dermatológica en el 89% de los pacientes a quienes se administró este anticuerpo. Estas toxicidades fueron severas, de grado 3 CTC y más alto. (etiqueta de la FDA para VECTIBIX®)

Se ha informado que el agente quimioterapéutico anti-EGFR erlotinib provoca, en algunos casos, insuficiencia renal aguda o insuficiencia renal, insuficiencia hepática y/o síndrome hepatorenal, perforaciones gastrointestinales, trastornos cutáneos bulosos y exfoliativos, y ulceración y perforación de la córnea. Véanse las etiquetas de seguridad de la FDA *Warnings and Precautions* para erlotinib (TARCEVA®, Genentech, OSI Pharmaceuticals) (2009).

"Tóxico" o "toxicidad" se refiere a cualquier efecto adverso causado por un agente cuando se administra a un sujeto. Las medidas de toxicidad incluyen, pero no están limitadas a, mortalidad, pérdida de peso corporal, falla orgánica, función orgánica alterada, toxicidad en el sistema nervioso central, toxicidad gastrointestinal (indicada, por ejemplo, por diarrea), toxicidad

dermatológica (indicada, por ejemplo, por aparición de sarpullido, lesión cutánea, descamación o prurito), toxicidad cardíaca, infección, sepsis y citotoxicidad.

La toxicidad puede ser determinada por métodos conocidos en el arte, tal como monitoreando observaciones clínicas desde el lado de la jaula, peso corporal, consumo de alimentos, velocidad de respiración, mediciones de oximetría del pulso, examen físico, evaluaciones oftálmicas, evaluaciones neurológicas, parámetros metabólicos, parámetros cardiovasculares, patología clínica (incluyendo química clínica, hematología, análisis de orina y parámetros de coagulación) y patología macroscópica y microscópica.

El "Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAE)" preparado por el National Cancer Institute (incorporado aquí por referencia en su totalidad) proporciona información con respecto a indicadores de toxicidad particulares aceptados en sujetos humanos. La Figura 31 proporciona información con respecto a las toxicidades no clínicas y clínicas observadas para terapias con antagonistas de EGFR.

La toxicidad puede medirse en términos de eventos tóxicos totales o severidad del o de los eventos tóxicos. La severidad de los eventos puede describirse usando el sistema de calificación establecido en el CTCAE. Los grados se asignan a cada evento adverso usando descripciones clínicas singulares de severidad basadas en la pauta general de que Grado 1 se refiere a un evento leve, Grado 2 se refiere a un evento moderado, Grado 3 se refiere a un evento severo, Grado 4 se refiere a un evento que deja discapacitado o amenaza la vida, y Grado 5 se refiere a muerte relacionada con el evento. El CTCAE proporciona las descripciones clínicas específicas para los eventos tóxicos. Los descriptores para toxicidad dermatológica se proporcionan comenzando en la página 14 del CTCAE, v.3. Como un ejemplo, la Figura 32 muestra la calificación para sarpullido/descamación y acné/sarpullido acneiforme. (CTCAE, v.3) Hay un número de modelos conocidos en el arte que se usan para monitorear indicadores potenciales de toxicidad, incluyendo, pero no limitados a, modelos basados en células *in vitro* y modelos animales no humanos *in vivo*. La toxicidad también se monitorea en sujetos humanos en estudios de ensayos clínicos.

En una modalidad particular, la toxicidad se mide en monos cinomolgos. El efecto tóxico de los antagonistas de EGFR en monos cinomolgos está bien documentado. Como se divulga en el "Biologics License Agreement (BLA)" para cetuximab (Solicitud N° 125084) (incorporado aquí por referencia), todos los monos que recibieron cetuximab exhibieron lesiones leves a severas en

la piel, consistentes en formación de escamas, enrojecimiento, eritema, dermatitis, fisuras, heridas y exantema, y/o adelgazamiento o pérdida del cabello. La toxicidad dermatológica era dependiente de la dosis tanto en severidad como en momento de aparición, donde la severidad para las dosis alta, media y baja fue severa, moderada y suave, y el momento de la aparición fue en los días 15, 22 y 64 del estudio, respectivamente. Las complicaciones secundarias de las lesiones cutáneas severas fueron infección bacteriana o sepsis, con mortalidad o eutanasia subsiguientes del 50% de los animales en el grupo de dosis alta. Otras toxicidades relacionadas con la dosis incluyeron cambios en ciertos parámetros de patología clínica asociados con evidencia macroscópica y microscópica de daño celular y tisular en el hígado, médula ósea, bazo y órganos linfoides.

Como se divulga en los Ejemplos, los monos cinomolgos tratados con un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a EGFR y a HER3 exhibieron menos incidencias de toxicidad, indicadas por lesiones dérmicas, en comparación con monos cinomolgos tratados con una cantidad igual del antagonista de EGFR cetuximab. Uno de tres monos cinomolgos tratados con 25 mg/kg del anticuerpo biespecífico desarrolló lesiones dérmicas, en tanto que 3 de 3 monos cinomolgos tratados con 25 mg/kg de cetuximab desarrollaron lesiones dérmicas. La lesión que se produjo en el mono tratado con el anticuerpo biespecífico era menos severa que las lesiones de los monos tratados con cetuximab, y la aparición de la lesión fue retardada. El animal tratado con el anticuerpo biespecífico desarrolló la lesión cutánea una semana después de la última (sexta) dosis, en comparación con los monos tratados con cetuximab donde la aparición de las lesiones dérmicas se produjo después de la tercera dosis en todos los animales.

En estudios clínicos de cetuximab, se observaron toxicidades dermatológicas, incluyendo sarpullido acneiforme, sequedad y fisuras en la piel, y secuelas inflamatorias e infecciosas. La incidencia informada de toxicidad dermatológica fue tan alta como 89% (para los pacientes con cáncer colorrectal avanzado).

Los modelos de toxicidad cutánea son conocidos y pueden usarse para determinar la toxicidad dermatológica de los anticuerpos. Los ejemplos de estos modelos incluyen queratinocitos epidérmicos humanos (NHEK (Clonetics, San Diego, CA; Lonza Bioscience, Walkersville, MD)); HEKa (Cascade Biologics, Portland, OR; Invitrogen, Carlsbad, CA) y epidermis humana reconstituida (cultivos EpiDerm® (MatTek, Ashland, MA)). Estos modelos pueden usarse para examinar

el efecto de los anticuerpos en la proliferación celular, expresión génica, expresión de proteínas, fosforilación de receptores, viabilidad celular y cambios en la histopatología. Lacouture, M.E., *Nature Rev. Cancer*, 6:803-812 (2006).

Es deseable proporcionar un anticuerpo menos tóxico que apunte a la ruta de EGFR. La dosificación de los antagonistas de EGFR, tal como cetuximab, está limitada por la toxicidad (principalmente toxicidad dermatológica y reacciones a infusiones). Un anticuerpo menos tóxico podría administrarse a una dosis más alta que un antagonista de EGFR más tóxico, lo que podría dar como resultado efectos antitumorales aumentados. En consecuencia, un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que se une específicamente a EGFR y a al menos un otro receptor HER (HER2, HER3 y/o HER4), donde el anticuerpo es menos tóxico que un antagonista de EGFR cuando el anticuerpo y el antagonista de EGFR se administran en dosis equivalentes. En una modalidad, el anticuerpo se une específicamente a EGFR y a HER3. En otra modalidad, el anticuerpo se une específicamente a EGFR y a HER2. En otra modalidad, el anticuerpo se une específicamente a EGFR y a HER4.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico induce una menor incidencia de toxicidades, toxicidades menos severas o aparición retardada de las toxicidades en un modelo *in vivo*, comparado con un antagonista de EGFR. Un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que se une específicamente a EGFR y a al menos un otro receptor HER (HER2, HER3 y/o HER4), donde el anticuerpo induce menos incidentes de toxicidad en sujetos a quienes se administra el anticuerpo en comparación con los incidentes de toxicidad en sujetos a quienes se administra un antagonista de EGFR. En modalidades particulares, el número de incidentes de toxicidad en sujetos a quienes se administra el anticuerpo es al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ó 90% menor que el número de incidentes de toxicidad en sujetos a quienes se administra un antagonista de EGFR.

En otras modalidades, la tasa de incidentes de toxicidad en sujetos a quienes se administra el anticuerpo es menos de 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 2% ó 1%.

En modalidades particulares, el anticuerpo multiespecífico induce una incidencia más baja de toxicidades dermatológicas, toxicidades dermatológicas menos severas, o aparición retardada de toxicidades dermatológicas en un modelo *in vivo*, en comparación con un antagonista de EGFR. Un aspecto de la invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que

se une específicamente a EGFR y a al menos un otro receptor HER (HER2, HER3 y/o HER4), donde el anticuerpo induce menos incidentes totales de toxicidad dermatológica en sujetos a quienes se administra el anticuerpo en comparación con los incidentes totales de toxicidad dermatológica en sujetos a quienes se administra un antagonista de EGFR. En modalidades particulares, el número de incidentes totales de toxicidad dermatológica en sujetos a quienes se administra el anticuerpo es al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ó 90% menor que el número de incidentes totales de toxicidad dermatológica en sujetos a quienes se administra un antagonista de EGFR.

En otras modalidades, la tasa de incidentes totales de toxicidad dermatológica en sujetos a quienes se administra el anticuerpo es menos de 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 2% ó 1%.

Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que se une específicamente a EGFR y a al menos un otro receptor HER (HER2, HER3, y/o HER4), donde el anticuerpo induce menos incidentes de toxicidad de grado 3 o superior en sujetos a quienes se administra el anticuerpo en comparación con los incidentes de toxicidad de grado 3 o superior en sujetos a quienes se administra el antagonista de EGFR. En modalidades particulares, el número de incidentes de toxicidad de grado 3 o superior en sujetos a quienes se administra el anticuerpo es al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ó 90% menor que el número de incidentes de toxicidad de grado 3 o superior en sujetos a quienes se administra un antagonista de EGFR.

En otras modalidades, la tasa de incidentes de toxicidad de grado 3 o superior en sujetos a quienes se administra el anticuerpo multiespecífico es menos de 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% ó 1%.

En modalidades particulares, el anticuerpo multiespecífico induce menos incidentes de toxicidad dermatológica de grado 3 o superior en sujetos a quienes se administra el anticuerpo biespecífico, en comparación con los incidentes de toxicidad dermatológica de grado 3 o superior en sujetos a quienes se administra un antagonista de EGFR. En modalidades particulares, el número de incidentes de toxicidad dermatológica de grado 3 o superior en sujetos a quienes se administra el anticuerpo multiespecífico es al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ó 90% menor que el número de incidentes de toxicidad dermatológica de grado 3 o superior en sujetos a quienes se administra un antagonista de EGFR.

En otras modalidades, la tasa de incidentes de toxicidad dermatológica de grado 3 o superior en sujetos a quienes se administra el anticuerpo multiespecífico es menos de 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% ó 1%.

En otras modalidades, el anticuerpo induce menos incidencias de función orgánica alterada en un modelo *in vivo* en comparación con un antagonista de EGFR. En otras modalidades, el anticuerpo induce menos toxicidades gastrointestinales, o menos severas, en un modelo *in vivo* en comparación con un antagonista de EGFR.

En algunas modalidades, el antagonista de EGFR es un anticuerpo anti-EGFR. En una modalidad, el antagonista de EGFR es cetuximab. En otra modalidad, el antagonista de EGFR es panitumumab. En otras modalidades, el antagonista de EGFR es una molécula pequeña. En una modalidad, el antagonista de EGFR es erlotinib. En una modalidad, el modelo *in vivo* es un mono, tal como un mono cinomolgo. En otra modalidad, el modelo *in vivo* es un ser humano.

Anticuerpos y variantes de anticuerpos

En algunas modalidades, la invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno no se une específicamente a otros blancos, incluyendo otros receptores HER.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H (dominio variable de cadena pesada) que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L (dominio variable de cadena liviana) que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 40. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 40.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 40. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 40. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 40. En algunas modalidades, las HVRs son HVRs extendidas.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 64. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 26. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 64 y un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 26.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 64. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de

SEQ ID NO: 26. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 64 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 26. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 64 y un V_L que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 26. En algunas modalidades, las HVRs son HVRs extendidas.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 28. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 27. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 28 y un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 27.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 28. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 27. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 28 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 27. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo

comprende un V_H que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 28 y un V_L que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 27. En algunas modalidades, las HVRs son HVRs extendidas. En una modalidad específica, HVR-H1 comprende la secuencia de amino ácidos LSGDWIH (SEQ ID NO: 48), HVR-H2 comprende la secuencia de amino ácidos LGEISAAGGYTD (SEQ ID NO: 50), HVR-H3 comprende la secuencia de amino ácidos ARESRVSFEEAAMDY (SEQ ID NO: 53), HVR-L1 comprende la secuencia de amino ácidos DLATDVA (SEQ ID NO: 54), HVR-L2 comprende la secuencia de amino ácidos SASF (SEQ ID NO: 56) y HVR-L3 comprende la secuencia de amino ácidos SEPEPYT (SEQ ID NO: 57).

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 28 y un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 28 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 28 y un V_L que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29. En algunas modalidades, las HVRs son HVRs extendidas. En una modalidad específica, HVR-H1 comprende la secuencia de amino ácidos LSGDWIH (SEQ ID NO: 48), HVR-H2 comprende la secuencia de amino ácidos LGEISAAGGYTD (SEQ ID NO: 50), HVR-H3 comprende la secuencia de amino ácidos ARESRVSFEEAAMDY (SEQ ID NO: 53), HVR-L1 comprende la secuencia

de amino ácidos NIATDVA (SEQ ID NO: 55), HVR-L2 comprende la secuencia de amino ácidos SASF (SEQ ID NO: 56) y HVR-L3 comprende la secuencia de amino ácidos SEPEPYT (SEQ ID NO: 57).

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 30. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 30 y un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 30. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 30 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 30 y un V_L que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29. En algunas modalidades, las HVRs son HVRs extendidas. En una modalidad específica, HVR-H1 comprende la secuencia de amino ácidos LSGDWIH (SEQ ID NO: 48), HVR-H2 comprende la secuencia de amino ácidos VGEISAAGGYTØ (SEQ ID NO: 51), HVR-H3 comprende la secuencia de amino ácidos ARESRVSFEEAMDY (SEQ ID NO: 53), HVR-L1 comprende la secuencia de amino ácidos NIATDVA (SEQ ID NO: 55), HVR-L2 comprende la secuencia de amino ácidos SASF (SEQ ID NO: 56) y HVR-L3 comprende la secuencia de amino ácidos SEPEPYT (SEQ ID NO: 57).

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 40, 41, 42, 43, 44, 45 ó 46. En una modalidad, el

anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 40, 41, 42, 43, 44, 45 ó 46.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 40, 41, 42, 43, 44, 45 ó 46. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 40, 41, 42, 43, 44, 45 ó 46. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 40, 41, 42, 43, 44, 45 ó 46. En algunas modalidades, las HVRs son HVRs extendidas.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER2, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 36, 37 ó 38. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER2, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 36, 37 ó 38.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER2, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER2, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de

SEQ ID NOs: 36, 37 ó 38. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER2, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 36, 37 ó 38. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER2, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 36, 37 ó 38. En algunas modalidades, las HVRs son HVRs extendidas.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER4, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER4, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 39. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER4, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un dominio variable de cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 39.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER4, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 39. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER4, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 39. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER4, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y

un V_L que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 39. En algunas modalidades, las HVRs son HVRs extendidas.

En una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo monoespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 24. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 24.

En una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo monoespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 24. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 24. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 24. En algunas modalidades, las HVRs son HVRs extendidas. En una modalidad específica, HVR-H1 comprende la secuencia de amino ácidos FTGNWIH (SEQ ID NO: 47), HVR-H2 comprende la secuencia de amino ácidos VGEISPSGGYTD (SEQ ID NO: 49), HVR-H3 comprende la secuencia de amino ácidos ARESRVSYEAAMDY (SEQ ID NO: 52), HVR-L1 comprende la secuencia de amino ácidos DVSTAVA (SEQ ID NO: 78), HVR-L2 comprende la secuencia

de amino ácidos SASF (SEQ ID NO: 56) y HVR-L3 comprende la secuencia de amino ácidos SYTPYT (SEQ ID NO: 79).

En una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo monoespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 33, 34 ó 35. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29 y un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 33, 34 ó 35.

En una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo monoespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 33, 34 ó 35. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 33, 34 ó 35. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29 y un V_L que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 33, 34 ó 35. En algunas modalidades, las HVRs son HVRs extendidas. En una modalidad específica, HVR-H1 comprende la secuencia de amino ácidos FTGDWIH (SEQ ID NO: 62), HVR-H2 comprende la secuencia de amino ácidos VGEISPAGAYTD (SEQ ID NO: 60), HVR-H3 comprende la secuencia de amino ácidos AREAKVSFEAAMDY (SEQ ID NO: 61), HVR-L1 comprende la secuencia de amino ácidos NIATDVA (SEQ ID NO: 55), HVR-L2 comprende la secuencia de

amino ácidos SASF (SEQ ID NO: 56) y HVR-L3 comprende la secuencia de amino ácidos SEPEPYT (SEQ ID NO: 57).

En una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo monoespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 32. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 31. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 32 y un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 31.

En una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo monoespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 32. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 31. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 32 y un V_L que comprende una, dos y/o tres de las HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 31. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 32 y un V_L que comprende las tres HVRs de la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 31. En algunas modalidades, las HVRs son HVRs extendidas. En una modalidad específica, HVR-H1 comprende la secuencia de amino ácidos FSGDWIH (SEQ ID NO: 59), HVR-H2 comprende la secuencia de amino ácidos VGEISPAGAYTD (SEQ ID NO: 60), HVR-H3 comprende la secuencia de amino ácidos AREAKVSFEAAMDY (SEQ ID NO: 61), HVR-L1 comprende la secuencia de amino ácidos DLATDVA (SEQ ID NO: 54), HVR-L2 comprende la secuencia de

amino ácidos SASF (SEQ ID NO: 56) y HVR-L3 comprende la secuencia de amino ácidos SEPEPYT (SEQ ID NO: 57).

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 2, 12 ó 14. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 13. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 2 y una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 4. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 12 y una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 11. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 12 y una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 13. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 14 y una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 13.

En algunas modalidades, la invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER2. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno no se une específicamente a otros blancos, incluyendo otros receptores HER. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER2, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 2. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une

específicamente a EGFR y a HER2, donde el anticuerpo comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 21, 22 ó 23.

En algunas modalidades, la invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER4. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno no se une específicamente a otros blancos, incluyendo otros receptores HER. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER4, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 2. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER4, donde el anticuerpo comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 18.

En una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo monoespecífico que se une específicamente a EGFR. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno no se une específicamente a otros blancos, incluyendo otros receptores HER. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 2. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR, donde el anticuerpo comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 1 ó 3. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 2 y una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 1. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 2 y una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 3.

En una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo monoespecífico que se une específicamente a HER3. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno no se une específicamente a otros blancos, incluyendo otros receptores HER. En una modalidad, el anticuerpo

monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 16, 17, 19 ó 20. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 13 ó 15. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 16, 17, 19 ó 20 y una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 13 ó 15.

En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 16 y una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 15. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 17 y una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 13. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 19 y una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 13. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 20 y una cadena liviana que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 13.

En algunas modalidades, se contemplan una o más modificaciones a la secuencia de amino ácidos de los anticuerpos descritos aquí. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Variantes de secuencia de amino ácidos del anticuerpo pueden prepararse introduciendo cambios apropiados en la secuencia nucleotídica que codifica el anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Estas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones desde y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos

dentro de las secuencias de amino ácidos del anticuerpo. Puede hacerse cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de amino ácidos pueden ser introducidas en la secuencia de amino ácidos del anticuerpo sujeto en el momento en que se fabrica esa secuencia.

En algunas modalidades, una secuencia de amino ácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia contiene sustituciones, inserciones o delecciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de amino ácidos retiene la capacidad para unirse al blanco o a los blancos originales de la secuencia de referencia. En algunas modalidades, una secuencia de amino ácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia contiene sustituciones, inserciones o delecciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esa secuencia de amino ácidos retiene la capacidad para unirse al o a los blancos originales de la secuencia de referencia y no se une específicamente a ningún otro blanco, incluyendo otros receptores HER. En algunas modalidades, un total de 1 a 10 amino ácidos han sido sustituidos, insertados o delecionados en la secuencia de amino ácidos de una secuencia de referencia. En algunas modalidades, las sustituciones, inserciones o delecciones se producen en regiones fuera de las HVRs (o sea, en las FRs).

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 40. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO:

25 y un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 40.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 64. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 26. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 64 y un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 26.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene la secuencia de amino ácidos de al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 29. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 28 y un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 30. En una modalidad, el anticuerpo

multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 30 y un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de amino ácidos de SEQ ID NOs: 40, 41, 42, 43, 44, 45 ó 46. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NOs: 40, 41, 42, 43, 44, 45 ó 46.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER2, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER2, donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 36. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER2, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 36. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al

antígeno que se une específicamente a EGFR y HER2, donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 37. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER2, donde el anticuerpo comprende un dominio V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que tiene la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 37. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER2, donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 38. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER2, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 38.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER4, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER4, donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 39. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER4, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 39.

En una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo monoespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR, donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 24. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 24.

En una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo monoespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 32. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 31. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 32 y un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 31.

En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la

secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 33. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 33 y un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 34. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 34 y un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 35. En una modalidad, el anticuerpo monoespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 35 y un V_L que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29.

Un ejemplo de alineamiento que muestra la numeración de Kabat para el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena liviana de varios anticuerpos anti-HER se presenta en la Figura 33.

Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25, donde el V_H de SEQ ID NO: 25 comprende una sustitución de amino ácido en F29(V_H), T30(V_H), N32(V_H), V48(V_H), P52a(V_H), S53(V_H), T57(V_H), S96(V_H) ó Y100(V_H), numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. En una modalidad, el anticuerpo comprende más de una de estas sustituciones. En una modalidad, el anticuerpo comprende todas estas sustituciones. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25, donde el V_H de SEQ ID NO: 25 comprende una o más sustituciones de amino ácidos seleccionadas del grupo consistente en F29(V_H)L, T30(V_H)S, N32(V_H)D, V48(V_H)L, P52a(V_H)A, S53(V_H)A, T57(V_H)S, S96(V_H)A e Y100(V_H)F, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25, donde el V_H de SEQ ID NO: 25 comprende las sustituciones de amino ácidos F29(V_H)L, T30(V_H)S, N32(V_H)D, P52a(V_H)A, S53(V_H)A e Y100(V_H)F, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 58, donde el V_L de SEQ ID NO: 58 comprende una sustitución de amino ácido en D28(V_L), V29(V_L), S30(V_L), T31(V_L), A32(V_L), V33(V_L), S50(V_L), A51(V_L), F53(V_L), S91(V_L), Y92(V_L), T93(V_L), T94(V_L) ó P96(V_L), numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. En una modalidad, el anticuerpo comprende más de una de estas sustituciones. En una modalidad, el anticuerpo comprende todas estas sustituciones. En una modalidad, el anticuerpo comprende inserciones de amino ácidos entre el amino ácido 31 y el amino ácido 32.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 58, donde el V_L de SEQ ID NO: 58 comprende una o más sustituciones de amino ácidos seleccionadas del grupo consistente en D28(V_L)N, V29(V_L)I, V29(V_L)L, S30(V_L)A, A32(V_L)D, Y92(V_L)E, T93(V_L)P, T94(V_L)E y P96(V_L)Y, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 58, donde el V_L de SEQ ID NO: 58 comprende las sustituciones de amino ácidos D28(V_L)N, V29(V_L)I, S30(V_L)A, A32(V_L)D, Y92(V_L)E, T93(V_L)P, T94(V_L)E y P96(V_L)Y, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 58, donde el V_H de SEQ ID NO: 25 comprende una sustitución de amino ácido en F29(V_H), T30(V_H), N32(V_H), V48(V_H), P52a(V_H), S53(V_H), T57(V_H), S96(V_H) ó Y100(V_H), y donde el V_L de SEQ ID NO: 58 comprende una sustitución de amino ácido en D28(V_L), V29(V_L), S30(V_L), T31(V_L), A32(V_L), V33(V_L), S50(V_L), A51(V_L), F53(V_L), S91(V_L), Y92(V_L), T93(V_L), T94(V_L) ó P96(V_L), numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. En una modalidad, el anticuerpo comprende más de una de estas sustituciones. En una modalidad, el anticuerpo comprende todas estas sustituciones.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25 y un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 58, donde el V_H de SEQ ID NO: 25 comprende una o más sustituciones de amino ácidos seleccionadas del grupo consistente en F29(V_H)L, T30(V_H)S, N32(V_H)D, V48(V_H)L, P52a(V_H)A, S53(V_H)A, T57(V_H)S, S96(V_H)A, e Y100(V_H)F, y el V_L de SEQ ID NO: 58 comprende una o más sustituciones de amino ácidos seleccionadas del grupo consistente en D28(V_L)N, V29(V_L)I, V29(V_L)L, S30(V_L)A, A32(V_L)D, Y92(V_L)E, T93(V_L)P, T94(V_L)E y P96(V_L)Y, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 25, donde el V_H de SEQ ID NO: 25 comprende las sustituciones de amino ácidos F29(V_H)L, T30(V_H)S, N32(V_H)D, P52a(V_H)A, S53(V_H)A e Y100(V_H)F, y un V_L que comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 58, donde el V_L de SEQ ID NO: 58 comprende las sustituciones de amino ácidos D28(V_L)N, V29(V_L)I, S30(V_L)A, A32(V_L)D, Y92(V_L)E, T93(V_L)P, T94(V_L)E y P96(V_L)Y, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Un método útil para la identificación de determinados residuos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis mediante barrido con alanina", como se describe en Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Aquí, un residuo o grupo de residuos blanco son identificados (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y reemplazados por un amino ácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para afectar la interacción de los amino ácidos con el antígeno. Enseguida, aquellas ubicaciones de amino ácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones son refinadas introduciendo otras variantes o variantes adicionales en, o para, los sitios de sustitución. Así, a pesar de que el sitio para introducir una variación a la secuencia de amino ácidos es predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita ser predeterminada. Por ejemplo, para analizar el desempeño de una mutación en un sitio dado, se efectúa mutagénesis mediante barrido con ala o aleatoria en el codón o región blanco, y las inmunoglobulinas expresadas son sondeadas en cuanto a la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de amino ácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, y también inserciones intrasecuencia de residuos de amino ácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al terminal N o C del anticuerpo de una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media del anticuerpo en el suero.

Variantes de glicosilación

En determinadas modalidades, un anticuerpo de la invención es alterado para aumentar o disminuir la magnitud hasta la cual el anticuerpo es glicosilado. La glicosilación de los polipéptidos es típicamente ya sea enlazada a N o enlazada a O. Enlazada a N se refiere a la adhesión de una especie carbohidrato a la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier amino ácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la adhesión enzimática de la especie carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación enlazada a O se refiere a la adhesión de una de las azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiamino ácido, más comúnmente serina o treonina, a pesar de que también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición o delección de sitios de glicosilación al anticuerpo se efectúa convenientemente alterando la secuencia de amino ácidos de manera tal que una o más de las secuencias tripeptídicas descritas más arriba (para sitios de glicosilación enlazados a N) sea creada o removida. La alteración también puede efectuarse por adición, delección o sustitución de uno o más residuos serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación enlazados a O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato adherido a la misma puede ser alterado. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que generalmente está adherido por un enlace de N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* (1997) *TIBTECH* 15:26-32. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, y también una fucosa adherida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunas modalidades, pueden efectuarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención, con el fin de crear variantes del anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

En una modalidad, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa adherida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en este anticuerpo puede ser de 1% a 80%, de 1% a 65%, de 5% a 65% o de 20% a 40%.

La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glicoestructuras adheridas a Asn297 (por ejemplo, estructuras de manosa complejas, híbridas y superiores), medida por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en la patente WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo asparagina ubicado alrededor de la posición 297 en la región Fc (numeración EU de residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede estar ubicado alrededor de ± 3 amino ácidos aguas arriba o aguas abajo de la posición 297, o sea, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Estas variantes de fucosilación pueden tener función ADCC mejorada. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes norteamericanas números US 2003/0157108 (Presta, L.) y US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "defucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); solicitud de patente norteamericana US N° 2003/0157108 A1, Presta, L; y patente WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares con genes inactivados ("knockout"), tales como células CHO con el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, inactivado (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al., Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y patente WO 2003/085107).

Se proporcionan además variantes de anticuerpos con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en las cuales un oligosacárido biantenarico adherido a la región Fc del anticuerpo es bisectado por GlcNAc. Estas variantes de anticuerpos pueden tener fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Ejemplos de estas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en la patente WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); la patente norteamericana US N° 6.602.684 (Umana *et al.*); y la solicitud norteamericana US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un

residuo galactosa en el oligosacárido adherido a la región Fc. Estas variantes de anticuerpos pueden tener función CDC mejorada. Estas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en las patentes WO 1997/30087 (Patel *et al.*), WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.).

Variantes de la región Fc

En determinadas modalidades, una o más modificaciones de amino ácidos pueden ser introducidas en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente, generando así una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de amino ácido (por ejemplo una sustitución) en una o más posiciones de amino ácidos.

En determinadas modalidades, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que la hace una candidata deseable para aplicaciones en las cuales la vida media del anticuerpo *in vivo* es importante, y sin embargo ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* pueden efectuarse para confirmar la reducción/agotamiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden efectuarse ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (y por lo tanto probablemente carece de actividad de ADCC), pero mantiene la capacidad de unirse a FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, las células NK, expresan solamente FcγRIII, en tanto que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente norteamericana U.S. N° 5.500.362 (véase, por ejemplo Hellstrom, I. *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I. *et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); US 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al., J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Alternativamente, pueden emplearse métodos de ensayo no radioactivos (véase, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radioactivo para citometría de flujo ACTI® (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares

de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede ser evaluada *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se divulga en Clynes *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También pueden efectuarse ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y, por lo tanto, carece de actividad de CDC. Véase, por ejemplo, el ensayo ELISA de unión a C1q y C3c en las patentes WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede efectuarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al., J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al., Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También pueden efectuarse determinaciones de unión a FcRn y de eliminación/vida media *in vivo* usando métodos conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al., Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquéllos con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc, 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente norteamericana U.S. N° 6.737.056). Estos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de amino ácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc llamado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 a alanina (patente norteamericana US N° 7.332.581).

Se describen ciertas variantes de anticuerpos con unión aumentada o disminuida a FcRs. (Véase, por ejemplo, patente norteamericana U.S. N° 6.737.056, patente WO 2004/056312 y Shields *et al., J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).)

En determinadas modalidades, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de amino ácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos).

En algunas modalidades, se efectúan alteraciones en la región Fc que dan como resultado una unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alterada (o sea, aumentada o disminuida), por ejemplo, como se describe en la patente norteamericana US N° 6.194.551, la patente WO 99/51642 e Idusogie *et al. J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Los anticuerpos con vidas medias aumentadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgGs

maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en la solicitud de patente norteamericana US 2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Estas variantes de Fc incluyen aquéllas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 ó 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente norteamericana US N° 7.371.826).

Véase también Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); patente norteamericana U.S. N° 5.648.260; patente norteamericana U.S. N° 5.624.821; y patente WO 94/29351 referentes a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

Variantes de anticuerpos modificadas genéticamente con cisteína

En determinadas modalidades, puede ser deseable crear anticuerpos modificados genéticamente con cisteína, por ejemplo, "tioMAbs," en los cuales uno o más residuos de un anticuerpo son sustituidos por residuos cisteína. En modalidades particulares, los residuos sustituidos están en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir esos residuos por cisteína, grupos tiol reactivos quedan ubicados en sitios accesibles del anticuerpo y pueden usarse para conjugar el anticuerpo con otras especies, tales como especies farmacológicas o especies enlazador-fármaco, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente aquí. En determinadas modalidades, cualesquier uno o más de los siguientes residuos puede ser sustituido por cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena liviana; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína pueden generarse como se describe, por ejemplo, en la patente norteamericana U.S. N° 7.521.541.

Derivados de anticuerpos

En determinadas modalidades, un anticuerpo proporcionado aquí puede ser modificado además para contener especies no proteicas adicionales que son conocidas en el arte y están fácilmente disponibles. Las especies adecuadas para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no están limitadas a, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no están limitados a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico,

polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrico maleico, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, co-polímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxetilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros adheridos al anticuerpo puede variar, y si más de un polímero está adherido, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización pueden determinarse en base a consideraciones que incluyen, pero no están limitadas a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que serán mejoradas, si el derivado de anticuerpo será usado en una terapia bajo condiciones definidas, etc.

En otra modalidad, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y una especie no proteica que pueden ser calentados selectivamente por exposición a radiación. En una modalidad, la especie no proteica es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no está limitada a, longitudes de onda que no dañan a las células normales, pero que calientan la especie no proteica hasta una temperatura a la cual las células proximales al anticuerpo-especie no proteica resultan muertas. Véase, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al.*, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006).

Se proporcionan otras variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de amino ácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en las FRs. Sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones preferidas". Cambios más sustanciales, denominados "sustituciones de ejemplo" se proporcionan en la Tabla 4, o se describen adicionalmente más abajo en referencia a las clases de amino ácidos. Pueden introducirse sustituciones de amino ácidos en un anticuerpo de interés y los productos pueden ser sondeados, por ejemplo, en cuanto a una actividad deseada, tal como unión al antígeno mejorada, inmunogenicidad disminuida, ADCC o CDC mejoradas, etc.

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Pueden lograrse modificaciones en las propiedades biológicas de un anticuerpo seleccionando sustituciones que afectan (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en láminas o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio blanco, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los amino ácidos pueden ser agrupados de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

- (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His(H)

Alternativamente, los residuos que existen en la naturaleza pueden dividirse en grupos en base a propiedades comunes de sus cadenas laterales:

- (1) hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras provocarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Estos residuos sustituidos también pueden ser introducidos en los sitios de sustituciones conservadoras o en los sitios (no conservados) restantes.

Un tipo de variante de sustitución involucra sustituir uno o más residuos de las regiones hipervariables de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la o las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) con respecto al anticuerpo parental a partir del cual fueron generadas. Un ejemplo de variante de sustitución es un anticuerpo con afinidad madurada, que puede ser generado convenientemente usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en exhibición en fagos. En breve, varios sitios de las regiones hipervariables (por ejemplo, 6-7 sitios) son mutados para generar todas las sustituciones posibles de amino ácidos en cada sitio. Los anticuerpos así generados son exhibidos en partículas de fagos filamentosos como fusiones a al menos parte de una proteína de la cápside del fago (por ejemplo, el producto gen III de M13) empacada dentro de cada partícula. Enseguida, las variantes exhibidas en fagos son sondeadas en cuanto a su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión). Con el fin de identificar sitios de las regiones hipervariables candidatos para modificación, puede efectuarse mutagénesis por barrido (por ejemplo, barrido con alanina) para identificar residuos de las regiones hipervariables que contribuyen significativamente a la

unión al antígeno. Alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Estos residuos de contacto y residuos cercanos son candidatos para sustitución de acuerdo con técnicas conocidas en el arte, incluyendo aquéllas detalladas aquí. Una vez que se generan estas variantes, el panel de variantes se somete a sondeo usando técnicas conocidas en el arte, incluyendo las descritas aquí, y las variantes con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para su desarrollo posterior.

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de secuencia de amino ácidos del anticuerpo se preparan por una variedad de métodos conocidos en el arte. Estos métodos incluyen, pero no están limitados a, aislamiento desde una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de amino ácidos que existen en la naturaleza) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de cassette de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

Inmunconjugados

La invención también proporciona inmunconjugados (mencionados en forma intercambiable como "conjugados de anticuerpo-fármaco" o "ADCs") que comprenden un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina proteica, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas), o un isótopo radioactivo, tal como At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu (o sea, un radioconjugado).

Los inmunconjugados han sido usados para la entrega local de agentes citotóxicos, o sea, fármacos que matan o inhiben el crecimiento o proliferación de las células, en el tratamiento del cáncer (Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549; Wu *et al.* (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) *id.* 3:207-212; Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26:151-172; patente norteamericana US N° 4.975.278). Los inmunconjugados permiten la entrega direccionada de una especie farmacológica a un tumor, y la acumulación intracelular en el mismo, cuando la administración

sistémica de fármacos no conjugados podría provocar niveles de toxicidad inaceptables para las células normales al igual que para las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin *et al.*, *Lancet* (Mar. 15, 1986) pp. 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (A. Pinchera *et al.*, eds) pp. 475-506. Tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales han sido informados como útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland *et al.*, (1986) *supra*). Las toxinas usadas en conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tal como toxina de difteria, toxinas de plantas tal como ricina, toxinas de molécula pequeña tal como geldanamicina (Mandler *et al.* (2000) *J. Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler *et al.* (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler *et al.* (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (patente europea EP 1 391 213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) y calicheamicina (Lode *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando son conjugados con ligandos de receptores proteicos o anticuerpos grandes.

Se ha demostrado que trastuzumab-DM1 (o T-DM1) es eficaz en modelos sensibles a trastuzumab e insensibles a trastuzumab de cáncer que sobre-expresa HER2. (Patente norteamericana US 7.097.840). ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetano, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa de murino dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de linfocitos B normales y malignos y un radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y unidos por un enlazador de tiourea-quelante (Wiseman *et al.* (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman *et al.* (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig *et al.* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig *et al.* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). A pesar de que ZEVALIN tiene actividad contra el linfoma no Hodgkin de células B (NHL), su administración provoca citopenjías severas y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG® (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo huCD33 enlazado a calicheamicina, fue aprobado en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide

aguda por inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; patentes norteamericanas US números 4.970.198, 5.079.233, 5.585.089, 5.606.040, 5.693.762, 5.739.116, 5.767.285, 5.773.001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 enlazado mediante el enlazador disulfuro SPP a la especie farmacológica maitansinoide, DM1, está avanzando a las pruebas de Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como cánceres de colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal anti-antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) enlazado a la especie farmacológica maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el tratamiento potencial de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, fueron conjugados a los anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específico para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico para CD30 en malignidades hematológicas) (Doronina *et al.* (2003) *Nature Biotechnol.* 21(7):778-784) y están bajo desarrollo terapéutico.

En determinadas modalidades, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen aquí (por ejemplo, más arriba). Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, la patente WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993. Hay disponibles una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re . Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), bis-azido compuestos (tal

como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de bis-flúor activo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen-triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase la patente WO 94/11026.

También están contemplados aquí los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una calicheamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

Maitansina y maitansinoides

En algunas modalidades, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) conjugado a una o más moléculas de maitansinoide.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina fue aislada por primera vez del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente norteamericana U.S. N° 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (patente norteamericana U.S. N° 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se divulgan, por ejemplo, en las patentes norteamericanas US números 4.137.230, 4.248.870, 4.256.746, 4.260.608, 4.265.814, 4.294.757, 4.307.016, 4.308.268, 4.308.269, 4.309.428, 4.313.946, 4.315.929, 4.317.821, 4.322.348, 4.331.598, 4.361.650, 4.364.866, 4.424.219, 4.450.254, 4.362.663 y 4.371.533.

Las especies farmacológicas maitansinoides son especies farmacológicas atractivas en conjugados de anticuerpo-fármaco porque son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) se pueden derivatizar con grupos funcionales adecuados para la conjugación a anticuerpos mediante los enlazadores no disulfuros, (iii) estables en el plasma, y (iv) eficaces contra una variedad de líneas celulares tumorales.

Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, los métodos para fabricarlos y su uso terapéutico se divulgan, por ejemplo, en las patentes

norteamericanas US número 5.208.020 y 5.416.064 y en la patente europea EP 0 425 235 B1, cuyas enseñanzas se incorporan aquí expresamente por referencia. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 enlazado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se encontró que el conjugado era altamente citotóxico para células de cáncer de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los cuales un maitansinoide fue conjugado mediante un enlazador disulfuro al anticuerpo A7 de murino que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal TA.1 de murino que se une al oncogen HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide fue determinada *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco alcanzó un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, el que podría aumentarse incrementando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide se preparan enlazando químicamente un anticuerpo a una molécula de maitansinoide, sin disminuir significativamente la actividad biológica ni del anticuerpo ni de la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la patente norteamericana U.S. N° 5.208.020 (cuyas enseñanzas se incorporan aquí expresamente por referencia). Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha demostrado eficacia para aumentar la citotoxicidad en células blanco, sin afectar negativamente la función o solubilidad del anticuerpo, a pesar de que se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo aumentara la citotoxicidad por sobre el uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en el arte y pueden ser sintetizados por técnicas conocidas o aislados de fuentes naturales. Maitansinoides adecuados se divulgan, por ejemplo, en la patente norteamericana U.S. N° 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones que no son patentes mencionadas más arriba. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Hay muchos grupos enlazadores conocidos en el arte para fabricar conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los divulgados en la patente norteamericana U.S. N° 5.208.020 o la patente europea EP 0 425 235 B1, Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992) y la solicitud de patente norteamericana US N° 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004, cuyas enseñanzas se incorporan aquí expresamente por referencia. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC pueden prepararse como se divulga en la solicitud de patente norteamericana US N° 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los grupos enlazadores incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles al ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasa, o grupos lábiles a esterasa, como se divulga en las patentes identificadas más arriba, siendo preferidos los grupos disulfuro y tioéter. Grupos enlazadores adicionales se describen y ejemplifican aquí.

Los conjugados de anticuerpo y maitansinoide pueden fabricarse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), bis-azido compuestos (tal como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de bis-flúor activo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173:723-737 (1978)) y 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El enlazador puede ser adherido a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace de éster puede formarse por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede ocurrir en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una modalidad preferida, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o un análogo de maitansinol.

Auristatinas y dolastatinas

En algunas modalidades, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a dolastatinas o análogos peptídicos y derivados de dolastatina, las auristatinas (patentes norteamericanas US números 5.635.483 y 5.780.588). Se ha demostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke *et al.* (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) y tienen actividad anti-cáncer (patente norteamericana US 5.663.149) y anti-fúngica (Pettit *et al.* (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). La especie farmacológica dolastatina o auristatina puede ser adherida al anticuerpo a través del terminal N (amino) o el terminal C (carboxilo) de la especie farmacológica peptídica (patente WO 02/088172).

Modalidades de ejemplo de auristatina incluyen las especies farmacológicas monometilauristatinas DE y DF enlazadas al terminal N, divulgadas en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", solicitud norteamericana US N° de serie 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004, cuyas enseñanzas se incorporan aquí expresamente por referencia en su totalidad.

Tipicamente, las especies farmacológicas a base de péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más amino ácidos y/o fragmentos peptídicos. Estos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Las especies farmacológicas auristatinas/dolastatinas pueden prepararse de acuerdo con los métodos de: la patente norteamericana US 5.635.483; la patente norteamericana US 5.780.588; Pettit *et al.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit *et al.* (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., *et al.* *Synthesis*, 1996, 719-725; y Pettit *et al.* (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863. Véase también Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", solicitud US N° de serie 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad (que divulga, por ejemplo, enlazadores y métodos para preparar compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados a enlazadores).

Calicheamicina

En otras modalidades, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de calicheamicina. Los antibióticos de la familia de las calicheamicinas son capaces de producir rupturas de ADN de doble hebra a concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de las calicheamicinas, véanse las patentes norteamericanas U.S. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de calicheamicina que pueden usarse incluyen, pero no están limitados a, γ 11, α 21, α 31, N-acetil- γ 11, PSAG y θ 11 (Hinman *et al.*, Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode *et al.*, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes norteamericanas mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco anti-tumoral al cual puede ser conjugado el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto calicheamicina como QFA tienen sitios de acción intracelulares y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes por internalización mediada por anticuerpos aumenta mucho sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden ser conjugados a los anticuerpos incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 que se describe en las patentes norteamericanas US 5.053.394 y 5.770.710, y también las esperamicinas (patente norteamericana US 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, la patente WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por

ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Una variedad de isótopos radioactivos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios cintigráficos, por ejemplo $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , o un marcador de spin para formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (NMR) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, mri), tal como nuevamente yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcadores u otros marcadores pueden ser incorporados en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido puede ser biosintetizado o puede ser sintetizado por síntesis química de amino ácidos usando precursores de amino ácidos adecuados que involucran, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcadores tales como $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} pueden ser adheridos mediante un residuo cisteína en el péptido. Itrio-90 puede ser adherido mediante un residuo lisina. El método IODOGEN (Fraker *et al.* (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscinigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

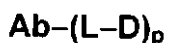
Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico pueden fabricarse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), bis-azido compuestos (tal como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de bis-flúor activo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase la

patente WO 94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil al ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992); patente norteamericana U.S. N° 5.208.020).

Los compuestos expresamente contemplan, pero no están limitados a, ADC preparados con reactivos de entrecruzamiento: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB ((4-vinilsulfona)benzoato de succinimidilo) que están disponibles en el comercio (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparación de conjugados de anticuerpo y fármaco

En los conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC), un anticuerpo (Ab) es conjugado a una o más especies farmacológicas (D), por ejemplo de alrededor de 1 a alrededor de 20 especies farmacológicas por anticuerpo, mediante un enlazador (L). El ADC de Fórmula I puede prepararse por varias rutas, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para los expertos en el arte, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido por la reacción con una especie farmacológica D; y (2) reacción de un grupo nucleofílico de una especie farmacológica con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido por la reacción con el grupo nucleofílico de un anticuerpo. Métodos adicionales para preparar ADC se describen aquí.



I

El enlazador puede estar compuesto de uno o más componentes de enlazadores. Los ejemplos de componentes de enlazadores incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC") y (4-yodoacetil)-aminobenzoato de N-succinimidilo ("SIAB"). Componentes de enlazadores adicionales son conocidos

en el arte y algunos se describen aquí. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", solicitud US N° de serie 10/983.340 presentada el 5 de noviembre de 2004, cuyos contenidos se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, el enlazador puede comprender residuos de amino ácidos. Los ejemplos de componentes de enlazadores amino ácidos incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los ejemplos de dipéptidos incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los ejemplos de tripéptidos incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los residuos de amino ácidos que constituyen un componente de enlazador amino ácido incluyen aquéllos que existen en la naturaleza, y también amino ácidos minoritarios y análogos de amino ácidos que no existen en la naturaleza, tal como citrulina. Los componentes de enlazadores amino ácidos pueden ser diseñados y optimizados en su selectividad para el corte enzimático por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada al tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

Los grupos nucleofílicos en los anticuerpos incluyen, pero no están limitados a: (i) grupos amina N-terminales, (ii) grupos amina en cadenas laterales, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol en cadenas laterales, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcares cuando el anticuerpo es glicosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en especies enlazadoras y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros de ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, o sea puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Así, cada puente de cisteína formará, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Grupos nucleofílicos adicionales puede ser introducidos en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Grupos tiol reactivos pueden ser introducidos en el anticuerpo (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más residuos cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos del amino ácido cisteína no nativos).

Los conjugados de anticuerpo y fármaco también pueden ser producidos por modificación del anticuerpo para introducir especies electrofílicas, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleofílicos en el reactivo enlazador o fármaco. Las azúcares de los anticuerpos glicosilados pueden ser oxidadas, por ejemplo con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos enlazadores o especies farmacológicas. Los grupos base de Schiff imina resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden ser reducidos, por ejemplo por reactivos de borohidruro, para formar enlaces de amina estables. En una modalidad, la reacción de la porción carbohidrato de un anticuerpo glicosilado ya sea con galactosa oxidasa o meta-peryodato de sodio puede dar grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína, que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). En otra modalidad, proteínas que contienen residuos serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer amino ácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; patente norteamericana US 5.362.852). Este aldehído puede hacerse reaccionar con una especie farmacológica o un nucleófilo enlazador.

De manera similar, los grupos nucleofílicos en una especie farmacológica incluyen, pero no están limitados a: amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina, y grupos arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en especies enlazadoras y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros de ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida.

Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y el agente citotóxico puede prepararse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado, ya sea adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra modalidad, el anticuerpo puede ser conjugado a un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en el pre-direccionamiento al tumor, donde el conjugado anticuerpo-receptor es administrado al paciente,

seguido por la remoción del conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación, y después se administra un "ligando" (por ejemplo avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo un radionucleótido).

Composiciones y métodos recombinantes

Los anticuerpos pueden ser producidos usando composiciones y métodos recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente norteamericana U.S. N° 4.816.567. En una modalidad, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-HER descrito aquí. Este ácido nucleico puede codificar una secuencia de amino ácidos que comprende el VL y/o una secuencia de amino ácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas liviana y/o pesada del anticuerpo). En otra modalidad, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden este ácido nucleico. En otra modalidad, se proporciona una célula huésped que comprende este ácido nucleico. En una de estas modalidades, una célula huésped comprende (por ejemplo, ha sido transformada con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de amino ácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de amino ácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de amino ácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de amino ácidos que comprende el VH del anticuerpo. En una modalidad, la célula huésped es eucariótica, por ejemplo una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfocítica (por ejemplo, una célula Y0, NS0, Sp20). En una modalidad, se proporciona un método para fabricar un anticuerpo anti-HER, donde el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se indicó más arriba, bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo desde la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-HER, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo como se describió más arriba, es aislado e insertado en uno o más vectores para su clonamiento posterior y/o expresión en una célula huésped. Este ácido nucleico puede ser fácilmente aislado y secuenciado usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y liviana del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para el clonamiento o expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen las células procarióticas o eucarióticas descritas aquí. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser producidos en bacterias, en particular cuando la glicosilación y la función efectora de Fc no son necesarias. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, las patentes norteamericanas US números 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo puede ser aislado de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede ser purificado adicionalmente.

Además de las procariotas, microbios eucarióticos tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonamiento o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas rutas de glicosilación han sido "humanizadas", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o totalmente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), y Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glicosilado también son derivadas de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que pueden usarse en conjunto con células de insectos, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Cultivos de células de plantas también pueden utilizarse como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes norteamericanas US números 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES® para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Células de vertebrados también pueden usarse como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles las líneas celulares de mamíferos que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos útiles son la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 descritas, por ejemplo, en Graham *et al.*, *J. Gen Virol.*, 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 descritas, por ejemplo, en Matther, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono

(CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI descritas, por ejemplo, en Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383: 44-68 (1982); células MRC 5 y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamíferos útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células DHFR-CHO (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas de células huésped de mamíferos adecuadas para la producción de anticuerpos, véase por ejemplo Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

Usos terapéuticos

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos descritos aquí pueden usarse para el tratamiento del cáncer, incluyendo tumores pre-cancerosos, no metastásicos, metastásicos y cancerosos (por ejemplo, cáncer en etapas tempranas), o para el tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar cáncer, por ejemplo cáncer de mama. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos también pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades no malignas, tales como trastornos neurodegenerativos, trastornos psiquiátricos o enfermedades autoinmunes.

El término cáncer abarca un conjunto de trastornos proliferativos, incluyendo pero no limitados a, crecimientos pre-cancerosos, tumores benignos y tumores malignos. Los tumores benignos permanecen localizados en el sitio de origen y no tienen la capacidad de infiltrar, invadir o producir metástasis en sitios distantes. Los tumores malignos invadirán y dañarán otros tejidos a su alrededor. También pueden adquirir la capacidad de desprenderse de donde empezaron y esparcirse a otras partes del cuerpo (producir metástasis), habitualmente a través del torrente sanguíneo o a través del sistema linfático donde están ubicados los ganglios linfáticos. Los tumores primarios se clasifican por el tipo de tejido del cual surgen; los tumores metastásicos se clasifican por el tipo de tejido desde el cual se derivan las células cancerosas. Con el tiempo, las células de un tumor maligno se vuelven más anormales y tienen menos apariencia de células normales. Este cambio en la apariencia de las células cancerosas se denomina grado del tumor, y las células cancerosas se describen como que son bien diferenciadas,

moderadamente diferenciadas, mal diferenciadas o indiferenciadas. Las células bien diferenciadas tienen una apariencia bastante normal y se asemejan a las células normales de las cuales se originaron. Las células indiferenciadas son células que se han vuelto tan anormales, que ya no es posible determinar el origen de las células.

El tumor puede ser un tumor sólido o un tumor no sólido o de tejido blando. Ejemplos de tumores de tejido blando incluyen leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda del adulto, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda de células B maduras, leucemia linfocítica crónica, leucemia prolinfocítica o leucemia de células peludas), o linfoma (por ejemplo, linfoma no Hodgkin, linfoma de células T cutáneo o enfermedad de Hodgkin). Un tumor sólido incluye cualquier cáncer de tejidos corporales distintos de sangre, médula ósea o sistema linfático. Los tumores sólidos pueden dividirse además en aquéllos de origen en células epiteliales y aquéllos de origen en células no epiteliales. Ejemplos de tumores sólidos de células epiteliales incluyen tumores del tracto gastrointestinal, colon, mama, próstata, pulmón, riñón, hígado, páncreas, ovario, cabeza y cuello, cavidad oral, estómago, duodeno, intestino delgado, intestino grueso, ano, vesícula biliar, labio, nasofaringe, piel, útero, órgano genital masculino, órganos urinarios, vejiga y piel (incluyendo melanoma). Los tumores sólidos de origen no epitelial incluyen sarcomas, tumores cerebrales y tumores óseos.

Los cánceres epiteliales generalmente evolucionan desde un tumor benigno a una etapa pre-invasiva (por ejemplo, carcinoma *in situ*), y a un cáncer maligno, que ha atravesado la membrana basal y ha invadido el estroma subepitelial.

En una modalidad, los anticuerpos multiespecíficos se unen específicamente a EGFR y a al menos un otro receptor HER, tal como HER2 o HER3 o HER4, y son útiles en la prevención y/o tratamiento de tumores sólidos, en particular tumores colorrectales, de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas y carcinoma de células escamosas), de cabeza y cuello, de ovario, de piel, pancreático y/o de mama.

Los anticuerpos multiespecíficos también se usan para reducir o prevenir la resistencia al tratamiento direccionado a la ruta de HER. Una limitación significativa al usar tratamientos que apuntan a la ruta de HER, es la resistencia que presentan muchos pacientes con cáncer a los efectos terapéuticos del tratamiento. Algunos pacientes con cáncer no muestran ninguna respuesta al

tratamiento direccionado a la ruta de HER. Otros pacientes con cáncer pueden presentar una respuesta inicial, pero después se vuelven resistentes al tratamiento. Un cáncer es resistente a un tratamiento si el cáncer ha avanzado mientras se está recibiendo el tratamiento (refractario), o si el cáncer ha avanzado dentro de 12 meses después de completar un régimen de tratamiento (recaída).

En una modalidad, el tratamiento direccionado a la ruta de HER comprende un tratamiento con anticuerpos que apuntan a la ruta de HER (por ejemplo, anticuerpos contra EGFR, anticuerpos contra HER2, anticuerpos contra HER3 y/o anticuerpos contra HER4). En otra modalidad, el tratamiento direccionado a la ruta de HER comprende un tratamiento con un agente quimioterapéutico.

Dosificaciones y formulaciones

Las presentes composiciones de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos serán formuladas, dosificadas y administradas de una manera compatible con la buena práctica médica. Los factores para considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que está siendo tratado, el mamífero particular que está siendo tratado, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de entrega del agente, el método de administración, el esquema de administración, y otros factores conocidos para los profesionales médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que será administrada será regida por estas consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar un cáncer. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo no necesita ser, pero opcionalmente es, formulado con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar un cáncer o un riesgo de desarrollar un cáncer. La cantidad eficaz de estos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores discutidos más arriba. Éstos generalmente se usan en las mismas dosificaciones y con vías de administración como las usadas anteriormente o alrededor de 1 a 99% de las dosificaciones empleadas anteriormente. Generalmente, el alivio o tratamiento de un cáncer involucra disminuir uno o más de los síntomas o problemas médicos asociados con el cáncer. La cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede lograr uno o una combinación de lo siguiente: reducir (en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más) el número de células cancerosas; reducir o inhibir el tamaño del tumor o la carga del tumor; inhibir (o

sea, disminuir en alguna medida y/o detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; disminuir la secreción hormonal en el caso de adenomas; disminuir la densidad de los vasos; inhibir la metástasis del tumor; reducir o inhibir el crecimiento del tumor; y/o aliviar en alguna medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se usa para prevenir la aparición o reaparición del cáncer en el sujeto.

En una modalidad, la presente invención puede usarse para aumentar la duración de la supervivencia de un paciente humano susceptible a, o diagnosticado con, un cáncer. Duración de la supervivencia se define como el tiempo desde la primera administración del fármaco hasta la muerte. La duración de la supervivencia también puede medirse por la razón de riesgo (HR) estratificada del grupo de tratamiento versus el grupo de control, que representa el riesgo de muerte para un paciente durante el tratamiento.

En otra modalidad, el tratamiento de la presente invención aumenta significativamente la tasa de respuesta en un grupo de pacientes humanos susceptibles a, o diagnosticados con, un cáncer, que son tratados con diversas terapias anti-cáncer. Tasa de respuesta se define como el porcentaje de pacientes tratados que respondieron al tratamiento. En un aspecto, el tratamiento de combinación de la invención usando un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y cirugía, terapia de radiación o uno o más agentes quimioterapéuticos, aumenta significativamente la tasa de respuesta en el grupo de pacientes tratados en comparación con el grupo tratado con cirugía, terapia de radiación o quimioterapia sola, teniendo el aumento un valor p de Chi-cuadrado de menos de 0,005.

Mediciones adicionales de eficacia terapéutica en el tratamiento de cánceres se describen en la publicación de la solicitud de patente norteamericana US N° 2005/0186208.

Las formulaciones terapéuticas se preparan usando métodos estándar conocidos en el arte, mezclando el ingrediente activo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences (20th edition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.). Los vehículos aceptables incluyen suero fisiológico o tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como

polivinilpirrolidona; amino ácidos tales como glicina, glutamina, asparaginas, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tal como sodio; y/o tensoactivos no iónicos tales como TWEEN®, PLURONICS® o PEG.

Opcionalmente pero de preferencia, la formulación contiene una sal farmacéuticamente aceptable, de preferencia cloruro de sodio, y de preferencia a alrededor de las concentraciones fisiológicas. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden contener un preservante farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la concentración del preservante está en el rango de 0,1 a 2,0%, típicamente v/v. Los preservantes adecuados incluyen aquéllos conocidos en las artes farmacéuticas. Alcohol bencílico, fenol, m-cresol, metilparabeno y propilparabeno son preservantes preferidos. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden incluir un tensoactivo farmacéuticamente aceptable a una concentración de 0,005 a 0,02%.

La presente formulación también puede contener más de un compuesto activo como sea necesario para la indicación particular que está siendo tratada, de preferencia aquéllos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Estas moléculas están presentes convenientemente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.

Los ingredientes activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Estas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*.

Pueden elaborarse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en la forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos (patente norteamericana US N° 3.773.919),

copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como los LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. A pesar de que polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo, ellos pueden desnaturalizarse o sufrir agregación como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, resultando una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices de polímeros específicos.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos descritos aquí son administrados a un sujeto humano de acuerdo con métodos conocidos, tal como administración intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. La administración local puede ser particularmente deseada si hay efectos secundarios extensos o toxicidad asociados con el antagonismo de HER (por ejemplo EGFR, HER2, HER3, HER4, etc.). Una estrategia *ex vivo* también puede usarse para aplicaciones terapéuticas. Las estrategias *ex vivo* involucran transfectar o transducir células obtenidas del sujeto con un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Después, las células transfectadas o transducidas son devueltas al sujeto. Las células pueden ser cualesquiera de una amplia gama de tipos incluyendo, sin limitación, células hematopoyéticas (por ejemplo, células de la médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, células T o células B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos o células musculares.

En un ejemplo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es administrado localmente, por ejemplo por inyecciones directas, cuando el trastorno o ubicación del tumor lo permite, y las inyecciones pueden repetirse

periódicamente. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo también puede ser administrado sistémicamente al sujeto o directamente a las células tumorales, por ejemplo a un tumor o un lecho tumoral después de una excisión quirúrgica del tumor, con el fin de prevenir o reducir la recurrencia local o metástasis.

Para la prevención o tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que será tratada, el tipo de anticuerpo, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de alrededor de 1 $\mu\text{g/kg}$ a 20 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg - 15 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas o por infusión continua. Una dosificación típica diaria puede estar en el rango de alrededor de 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados más arriba. Para administraciones repetidas por varios días o más tiempo, dependiendo de la condición, el tratamiento generalmente se mantendrá hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de dosificación del anticuerpo estará en el rango de alrededor de 0,05 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg. Así, una o más dosis de alrededor de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg o 20 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) pueden administrarse al paciente. Estas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo todas las semanas, cada dos semanas o cada tres semanas (por ejemplo, de manera tal que el paciente reciba de alrededor de dos a alrededor de veinte, o por ejemplo alrededor de seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga inicial más alta, seguida por una o más dosis más bajas. Un ejemplo de régimen de dosificación comprende administrar una dosis de carga inicial de alrededor de 4 mg/kg, seguida por una dosis de mantención semanal de alrededor de 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia es monitoreado fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Terapia de combinación

Un anticuerpo de la invención puede ser combinado en una formulación de combinación farmacéutica, o régimen de dosificación como terapia de combinación, con un segundo compuesto que tiene propiedades anti-cáncer. El segundo compuesto de la formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación puede tener actividades complementarias con el anticuerpo de la combinación, de manera tal que no se afecten adversamente entre sí. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se usa en combinación con otro anticuerpo anti-HER, tal como HERCEPTIN®, pertuzumab y/o cetuximab. Los anticuerpos de la invención también pueden usarse en combinación con terapia de radiación.

El segundo compuesto puede ser un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento, agente anti-hormonal y/o agente cardioprotector. Estas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto. Una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo de la invención también puede tener una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico, tal como un inhibidor de la formación de tubulina, un inhibidor de topoisomerasa, un intercalador de ADN o un enlazador de ADN.

Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración de un agente anti-cáncer identificado de acuerdo con esta invención. La terapia de combinación puede administrarse como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación puede administrarse en dos o más administraciones. La administración combinada incluye co-administración, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, donde hay un período de tiempo durante el cual ambos (o todos) los agentes activos ejercen sus actividades biológicas simultáneamente.

Los ejemplos de esta terapia de combinación incluyen combinaciones con agentes quimioterapéuticos tales como erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), sutent (SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), oxaliplatino (Eloxatin®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), leucovorín, rapamicina (Sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, GlaxoSmithKline), lonafarnib (SCH 66336), sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs.) y

gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; antineoplásicos antifolato tal como pemetrexed (ALIMTA®, Eli Lilly), aziridinas tales como benzodopa, carbocucina, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucil, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enedina, calicheamicina, calicheamicina gamma 11 y calicheamicina omega 11; dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tal como clodronato; una esperamicina; y también cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enedina de cromoproteínas relacionados, aclacinomisinas, actinomicina, antramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tal como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; compuestos anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano,

trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolinico; aceglatona; glicósido aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxíurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilaminá; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE®, formulaciones de nanopartículas de la albúmina de paclitaxel (libre de cremofor) (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucil; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tal como ácido retinoico; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

Esta terapia de combinación también incluye: (i) agentes anti-hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de las hormonas sobre los tumores, tales como anti-estrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs), incluyendo por ejemplo tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; (ii) inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, por ejemplo 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®; (iii) anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida,

bicalutamida, leuprolide y goserelina; y también troxacitabina (un análogo citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); (iv) inhibidores de proteína quinasas; (v) inhibidores de lípido quinasas; (vi) oligonucleótidos antisentido, particularmente aquéllos que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, por ejemplo PKC-alfa, Raf y H-Ras; (vii) ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, la ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; (viii) vacunas tales como vacunas para terapia génica, por ejemplo vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor de topoisomerasa LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) agentes anti-angiogénicos tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y (x) sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

La preparación y los esquemas de dosificación para estos agentes quimioterapéuticos pueden usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como determine empíricamente un profesional experto. La preparación y los esquemas de dosificación para esta quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service*, (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y demostrar ser "sinérgica", o sea el efecto logrado cuando los ingredientes activos se usan juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan de usar los compuestos por separado. Un efecto sinérgico puede lograrse cuando los ingredientes activos son: (1) co-formulados y administrados o entregados simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) entregados por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando son administrados en terapia de alternancia, puede lograrse un efecto sinérgico cuando los compuestos son administrados o entregados secuencialmente, por ejemplo por diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, una dosificación eficaz de cada ingrediente activo es administrada secuencialmente, o sea seriadamente, en tanto que en la terapia de combinación, dosificaciones eficaces de dos o más ingredientes activos se administran juntas.

Artículos de fabricación y kits

Otra modalidad de la invención es un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de cánceres. El artículo de fabricación comprende un contenedor y una etiqueta o inserto del envase encima

de, o asociado con, el contenedor. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas, etc. Los contenedores pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El contenedor contiene una composición que es eficaz para tratar la condición, y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa para solución intravenosa o un frasco que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de la invención. La etiqueta o inserto del envase indica que la composición se usa para tratar la condición particular. La etiqueta o inserto del envase comprenderá además instrucciones para administrar la composición de anticuerpo al paciente. También se contemplan artículos de fabricación y kits que comprenden las terapias de combinación descritas aquí.

Inserto del envase se refiere a las instrucciones habitualmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias referentes al uso de estos productos terapéuticos. En una modalidad, el inserto del envase indica que la composición se usa para tratar un tumor sólido, por ejemplo cáncer colorrectal, de pulmón y/o de mama.

Adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo contenedor que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyección bacteriostática (BWFI), suero fisiológico tamponado con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

También se proporcionan kits que son útiles para diversos propósitos, por ejemplo para la purificación o inmunoprecipitación de receptores HER desde células. Para el aislamiento y purificación de EGFR y/o HER2 y/o HER3 y/o HER4, el kit puede contener un anticuerpo contra EGFR/HER2 y/o EGFR/HER3 y/o EGFR/HER4 acoplado a perlas (por ejemplo, perlas de SEPHAROSE®). Pueden proporcionarse kits que contienen los anticuerpos para la detección y cuantificación del receptor HER deseado *in vitro*, por ejemplo, en un ensayo ELISA o de inmunotransferencia "Western blot". Al igual que el artículo de fabricación, el kit comprende un contenedor y una etiqueta o inserto del envase encima de, o asociado con, el contenedor. El contenedor contiene una composición que comprende al menos un anticuerpo multiespecífico o fragmento de anticuerpo de

la invención. Pueden incluirse contenedores adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes y tampones o anticuerpos de control. La etiqueta o inserto del envase puede proporcionar una descripción de la composición y también instrucciones para el uso *in vitro* o de diagnóstico previsto.

La descripción escrita que antecede se considera suficiente para permitir que un experto en el arte lleve a la práctica la invención. Los siguientes Ejemplos se dan sólo para propósitos ilustrativos, y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas aquí, serán evidentes para los expertos en el arte a partir de la descripción que antecede y caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Los reactivos disponibles en el comercio mencionados en los Ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a menos que se indique otra cosa. La fuente de las células identificadas en los Ejemplos siguientes, y a través de toda la memoria, por los números de acceso de ATCC, es la American Type Culture Collection, Manassas, VA. A menos que se señale otra cosa, la presente invención usa procedimientos estándar de tecnología de ADN recombinante, tales como los descritos más arriba y en los siguientes textos: Sambrook *et al.*, *supra*; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989); Innis *et al.*, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc.: N.Y., 1990); Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988); Gait, Oligonucleotide Synthesis (IRL Press: Oxford, 1984); Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan *et al.*, Current Protocols in Immunology, 1991.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Aislamiento y caracterización de anticuerpos que se unen a EGFR humano

Materiales

Las enzimas y los fagos auxiliares M13-KO7 se compraron a New England Biolabs. *E. coli* XL1-Blue era de Stratagene. Albúmina de suero de bovino (BSA), ovoalbúmina y Tween 20 se compraron a Sigma. Neutravidina, caseína y Superblock se compraron a Pierce. Peroxidasa de rábano picante

(HRP) conjugada con anti-M13 se compró a Amersham Pharmacia. Las inmunoplasacas Maxisorp se compraron a NUNC (Roskilde, Dinamarca). El sustrato tetrametilbenzidina (TMB) se compró a Kirkegaard and Perry Laboratories (Gaithersburg, MD).

Construcción de bibliotecas

Las bibliotecas de anticuerpos exhibidos en fagos fueron generadas en base a un armazón de anticuerpo humano proveniente de 4D5 humanizado (h4D5, trastuzumab), donde la diversidad de cadenas laterales y de longitud fue incorporada en regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (CDR1, CDR2, CDR3) en la primera biblioteca (Biblioteca 1), y en CDRs de la cadena pesada y CDR3 de la cadena liviana en la segunda biblioteca (Biblioteca 2), siempre focalizando en la diversificación en la cadena pesada como se ha descrito (Lee et al., J. Mol. Biol. 340: 1073-1093 (2004)). Las bibliotecas se construyeron como se ha descrito (Lee et al., J. Mol. Biol. 340: 1073-1093 (2004)), excepto que los oligonucleótidos degenerados usados fueron modificados en forma modesta.

Clasificación de las dos bibliotecas

La Biblioteca 1 y la Biblioteca 2 fueron sometidas directamente a selección por unión a un blanco (hEGFR-ECD-Fc (dominio extracelular de EGFR humano fusionado a una región Fc de IgG1 humana) y EGFRvIII-Fc). La proteína EGFRvIII-Fc es una variante de EGFR donde falta la mayor parte del dominio II (E1-P353 (no incluyendo el péptido de señal)) fusionado a una región Fc de hIgG1. Véase Kuan, C-T, *et al.*, Endocrine-Related Canc. 8: 83-96 (2001); Bigner, S H, *et al.*, Cancer Research, 50: 8017-8022 (1990). Placas de 96 pocillos Maxisorp de Nunc fueron recubiertas con 100 μ l/pocillo del antígeno blanco (hEGFR-ECD-Fc, EGFRvIII-Fc) (5 μ g/ml) en PBS (tampón de carbonato de sodio 0,05 M, pH 9,6) a 4°C durante la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas fueron bloqueadas con agentes bloqueadores alternados. Soluciones de fagos de 10^{13} fagos/ml (3-5 OD/ml) fueron incubadas con los antígenos aplicados como recubrimiento por 18 horas en la primera ronda de selección. La entrada de fagos fue disminuyendo en cada ronda de selección, como sigue: primera ronda 3-5 OD/ml, segunda ronda 3 OD/ml, tercera ronda 0,5~1 OD/ml y cuarta ronda 0,1~0,5 OD/ml. Los fagos diluidos fueron incubados por 30 minutos en hielo. Se añadió 1 μ M de una proteína de fusión a Fc a los fagos bloqueados

desde la tercera ronda para remover los elementos de unión ("binders") a Fc. Después de la incubación de las soluciones de fagos (100 μ l/pocillo en 8 pocillos recubiertos con antígeno blanco y 2 pocillos no recubiertos) en las inmunoplaacas para permitir la unión al antígeno inmovilizado (durante la noche para la primera ronda, 2 horas para las rondas restantes), las inmunoplaacas se lavaron al menos diez veces continuamente con PBS y 0,05% de Tween 20. Los fagos unidos fueron eluidos con 100 μ l/pocillo de HCl 100 mM a temperatura ambiente por 20 minutos. Los fagos eluidos (de los pocillos recubiertos) y los fagos de fondo (de los pocillos no recubiertos) fueron neutralizados añadiendo 1/10 del volumen de Tris 1M de pH 11,0 y BSA hasta un 0,1% final. Se calculó la recuperación de fagos por cada pocillo de inmunoplaaca recubierto con antígeno y se comparó con la de un pocillo bloqueado no recubierto con antígeno, para estudiar el enriquecimiento de clones de fagos que exhibían Fabs que se unieron específicamente al antígeno blanco. Los fagos eluidos fueron amplificados en *E. coli* y usados para rondas de selección posteriores.

Caracterización de alto rendimiento de clones que se unen a hEGFR

Clones aleatorios de la ronda 4 fueron seleccionados para sondeo y sometidos a un ensayo ELISA para fagos, en el cual la unión al blanco y a anti-gD fue comparada con la unión a proteínas no relevantes (BSA, HER2, un anticuerpo anti-EGFR, trastuzumab).

Inmunoplaacas con formato de 384 pocillos fueron recubiertas con 1 μ g/ml de blanco, anti-gD y proteínas no relevantes a 4°C durante la noche o a temperatura ambiente por 2 horas, y bloqueadas por 1 hora con BSA al 1% en PBS. Clones de fagomidios en *E. coli* XL1-Blue fueron cultivados en 150 μ l de caldo 2YT suplementado con carbenicilina y fagos auxiliares M13-KO7; los cultivos crecieron con agitación durante la noche a 37°C en un formato de 96 pocillos. Los sobrenadantes de los cultivos que contenían fagos fueron diluidos cinco veces en PBST (PBS con 0,05% de Tween 20 y 0,5% (p/v) de BSA). Se agregaron 30 μ l de mezcla a cada cuadrante de una placa recubierta de 384 pocillos y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. La placa fue lavada con PBT (PBS con 0,05% de Tween 20) e incubada por 30 minutos con un conjugado de peroxidasa de rábano picante y anticuerpo anti-M13 diluido 5.000 veces hasta 1 nM en PBST. Las placas fueron lavadas, desarrolladas con sustrato TMB por aproximadamente cinco minutos, extinguidas con H₃PO₄ 1,0 M y leídas espectrofotométricamente a 450 nm.

Los clones que se unieron al anticuerpo anti-gD y al blanco, pero no a las proteínas no específicas, fueron considerados como positivos específicos. La biblioteca de VH permitió el aislamiento de elementos de unión ("binders") específicos para ambos EGFR-ECD-Fc y EGFRvIII-Fc.

ELISA de competencia de unión en solución

La afinidad de unión de clones de unión seleccionados fue determinada por un ensayo ELISA de competencia de unión en solución.

Clones de fagomidios seleccionados en *E. coli* XL1-Blue fueron cultivados en 20 ml de caldo 2YT suplementado con carbenicilina, kanamicina y fagos auxiliares M13-KO7; los cultivos crecieron con agitación durante la noche a 30°C. Los sobrenadantes de los fagos fueron purificados por doble precipitación en PEG al 20%/NaCl 2,5 M, resuspendidos en PBS y leídos espectrofotométricamente a 268 nm para determinar la concentración (en OD/ml).

Los fagos purificados fueron titulados en inmunoplaacas recubiertas con 1 µg/ml de hEGFR-ECD-Fc, para determinar la concentración óptima para el ensayo ELISA de competencia en solución.

La dilución que dio una señal de 1 OD/ml a 450 nm fue usada en el ensayo de unión en solución, en el cual los fagos fueron incubados primero con concentraciones crecientes de antígeno (hEGFR-ECD) por una hora, y después transferidos a inmunoplaacas recubiertas con antígeno por 15 minutos para capturar los fagos no unidos. La IC₅₀ fue calculada como la concentración de antígeno en la etapa de unión en solución que inhibía al 50% de los fagos de unirse al antígeno inmovilizado. El ensayo ELISA de competencia de unión en solución se efectuó a temperatura ambiente. Los valores de IC₅₀ para clones seleccionados estaban en el rango de 36,2 nM a > 1.000 nM.

Conversión de fagos que exhiben F(ab)zip en IgG humana

Para determinar con exactitud la afinidad, especificidad y otras propiedades, clones seleccionados fueron expresados como hIgG libre.

Los dominios variables de cadena liviana y cadena pesada fueron clonados en vectores previamente diseñados para la expresión transitoria de IgG humana en células de mamífero. (Lee *et al.*, J. Mol. Biol. 23:340:1073-1093 (2004)).

La región V_L del ADN fagomidial fue digerida con enzimas de restricción, que cortaron el ADN aguas arriba de la región que codifica CDR L1 (*EcoRV*) y aguas abajo de la región que codifica CDR L3 (*KpnI*).

La región V_H del ADN fagomidial fue digerida con enzimas de restricción, que cortaron el ADN aguas arriba de la región que codifica CDR H1 (*ApaI*) y aguas abajo de la región que codifica CDR H3 (*BsiwI*).

La IgG libre secretada fue purificada por cromatografía de afinidad con proteína A y analizada en un ensayo ELISA de unión directa en inmunoplasmas recubiertas con hEGFR.

Comparación de epítomos anti-hEGFR

Se estudió la capacidad de los anticuerpos anti-EGFR aislados para competir con otro anticuerpo anti-hEGFR que se sabe que se une al dominio III de EGFR, con el fin de determinar los epítomos reconocidos por los anticuerpos anti-hEGFR.

Los ensayos se efectuaron en un formato de ELISA competitivo. Para el ELISA competitivo, EGFR-ECD-Fc fue inmovilizado en inmunoplasmas Maxisorp a 2 $\mu\text{g/ml}$. Una concentración fija del anticuerpo anti-EGFR (o un anticuerpo inespecífico de control) fue capturada por el EGFR-ECD-Fc aplicado como recubrimiento, y se agregaron los Fabs en fagos anti-EGFR seleccionados purificados, que fueron detectados con HRP conjugada con α -M13. Es probable que los anticuerpos que fueron bloqueados de unirse a las placas recubiertas con EGFR-ECD-Fc compartan epítomos superpuestos.

Para el ELISA competitivo con TGF- α , EGFR-ECD-Fc fue capturado primero por anticuerpo anti-Fc humano aplicado como recubrimiento, enseguida una concentración fija de TGF- α fue capturada por EGFR-ECD-Fc. Se agregaron los Fabs en fagos purificados, que fueron detectados con HRP conjugada con α -M13.

Finalmente, se determinó la unión de clones seleccionados a construcciones con dominios de EGFR expuestos y deletados, para confirmar el ELISA competitivo anterior. El clon denominado D1 compete con el anticuerpo anti-EGFR y es probable que se una a EGFR en el dominio III.

Ejemplo 2

Caracterización de anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano

Inhibición de la unión del ligando

Con el fin de determinar si el anticuerpo anti-EGFR seleccionado D1 inhibe la unión de ^{125}I -EGF a células H1666 (ATCC CRL-5885, Manassas, Va.), la versión de IgG purificada de D1 fue analizada en un ensayo de unión del ligando, como sigue. Células H1666 fueron sembradas en placas de 12 pocillos. Al día siguiente, el medio de crecimiento fue removido y las células fueron pretratadas con anticuerpo 200 nM por 2 horas a temperatura ambiente. Se agregaron 20 μl /pocillo de EGF radiomarcado (conc. de uso por debajo de la K_d de la línea celular) y las células fueron tratadas durante 2 horas más a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas con tampón de unión, solubilizadas y transferidas, y las muestras fueron contadas usando un contador iso Data γ . Se usó EGF no marcado como competidor frío. Los resultados demuestran que D1 inhibe la unión del ligando ^{125}I -EGF a las células H1666.

Inhibición de la fosforilación de EGFR inducida por TGF- α en células EGFR-NR6 transfectadas en forma estable

Para determinar si el anticuerpo anti-EGFR D1 bloquea selectivamente la fosforilación de EGFR inducida por TGF- α , células EGFR-NR6 transfectadas en forma estable fueron sometidas a ayuno de suero por 2-3 horas y pre-incubadas con diversas concentraciones de D1 por 2 horas. Las células fueron estimuladas con TGF- α 1 nM. Lisados de células enteras fueron sometidos a análisis por SDS-PAGE, y las manchas de la inmunotransferencia fueron sondeadas con anti-fosfotirosina y anti-EGFR como un control de carga. Un anticuerpo anti-EGFR disponible en el comercio fue usado como control positivo. Los datos demostraron que D1 inhibe la fosforilación de EGFR inducida por TGF- α en un ensayo basado en células.

Ejemplo 3

Maduración de la afinidad de D1

Construcción de bibliotecas

Se crearon dos bibliotecas exhibidas en fagos (bibliotecas L3/H3 y L3/H1H2) usando mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, como se ha descrito (Lee *et al.*, Blood, 108, 3103-3111, 2006). Los vectores molde de las bibliotecas contenían un codón de detención (TAA) incorporado en CDR-L3, que fue reparado durante la reacción de mutagénesis usando oligonucleótidos degenerados que se alinearon sobre las secuencias que codifican CDR-L3 (todas las bibliotecas), CDR-H3 (biblioteca L3/H3), CDR-H2 y CDR H1 (biblioteca L3/H1H2). Las reacciones de mutagénesis de las bibliotecas se efectuaron de acuerdo con el método de Kunkel *et al.* (Methods Enzymol. 1987;154:367-82). Los oligonucleótidos se combinaron en diferentes proporciones para afinar la diversidad, para reflejar la frecuencia de los amino ácidos en el repertorio natural en posiciones seleccionadas. Los productos de la mutagénesis fueron acumulados en una reacción por cada biblioteca y electroporados en células *E. coli* SS320, y se cultivaron suplementados con fagos auxiliares KO7 como se ha descrito (Lee *et al.*, 2004, *supra*).

Clasificación y sonda de las bibliotecas

Para la selección de aumento de afinidad, las bibliotecas en fagos fueron sometidas a clasificación en placas contra hEGFR-ECD-Fc en la primera ronda, seguida por tres rondas de clasificación en solución.

Se efectuaron tres rondas de clasificación en solución con rigurosidad creciente de la selección. Las inmunoplaacas fueron recubiertas con 5 µg/ml de neutravidina durante la noche a 4°C y bloqueadas con Superblock (Pierce) y PBST. 3-5 OD/ml de fagos propagados fueron pre-incubados con 100 nM de EGFR-ECD biotinilado en Superblock, después diluidos 10x y agregados a las inmunoplaacas bloqueadas por 5-10 minutos. Las placas fueron lavadas 8 veces, los fagos fueron eluidos y propagados para la siguiente ronda de clasificación en solución, disminuyendo la entrada de fagos (0,5 OD/ml) y la concentración de EGFR-ECD biotinilado hasta 1 nM.

ELISA de sondeo de afinidad de alto rendimiento (competencia de una sola mancha)

Se eligieron clones aleatorios de la última ronda de clasificación en solución para el sondeo, y se sometieron a un ensayo ELISA de competencia para fagos de un solo punto, en el cual se compara la unión al blanco del sobrenadante de fagos pre-incubado (o no) con hEGFR-ECD.

Clones de fagomidios en *E. coli* XL1-Blue fueron cultivados en 150 µl de caldo 2YT suplementado con carbenicilina y fagos auxiliares M13-KO7; los cultivos crecieron con agitación durante la noche a 37°C en un formato de 96 pocillos. Los sobrenadantes de los cultivos que contenían fagos fueron diluidos cinco veces en PBST (PBS con 0,05% de Tween 20 y 0,5% (p/v) de BSA) con o sin EGFR-ECD 5 nM. La reducción de OD (%) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Reducción de OD}_{450\text{nm}} (\%) = (\text{OD}_{450\text{nm}} \text{ de pocillos con competidor}) / (\text{OD}_{450\text{nm}} \text{ de pocillo sin competidor}) * 100$$

Los clones con una reducción de OD mayor que 25% fueron seleccionados para el ensayo ELISA de competencia de unión en solución.

;

ELISA de competencia de unión en solución

La afinidad de unión de clones de unión seleccionados por ELISA de una sola mancha fue determinada por un ensayo ELISA de competencia de unión en solución, como se describió más arriba.

La IC50 en fago de un clon seleccionado de la maduración de la afinidad del clon parental D1 (D1.5) se determinó como se describió más arriba. La IC50 para D1.5 fue de 0,39 nM. D1.5 fue reformateado a mIgG2A para su caracterización posterior, usando el mismo sitio de restricción descrito más arriba y vectores diseñados para la expresión transitoria de IgG de murino en células de mamífero.

Ejemplo 4

Caracterización de anticuerpos anti-EGFR mejorados como mIgG libre

Medición por BIAcore

Se usaron ensayos de resonancia de plasmón de superficie en un instrumento BIAcore®-2000 para determinar la afinidad de mIgG2A anti-EGFR. mIgG D1.5 inmovilizado en chips CM5 a ~150 unidades de respuesta (RU) fue

usado en los ensayos BIAcore. Concentraciones crecientes desde 12,5 nM hasta 200 nM de EGFR-ECD fueron inyectadas a 30 μ l/min a 25°C. Las respuestas de unión fueron corregidas restando el RU de una celda de flujo de blanco. Para el análisis cinético, se usó el modelo 1:1 de Langmuir de ajuste simultáneo de k_{on} y k_{off} . La KD determinada por este método para D1.5 fue de 1,2 nM.

Mapeo de epítomos

Se evaluó la unión de clones seleccionados a construcciones con dominios de EGFR expuestos y deletados, para confirmar el epítipo de unión heredado de los clones parentales. D1.5, el clon con afinidad mejorada seleccionado de la clasificación de D1, se une a EGFR en el dominio III.

Inhibición de la fosforilación de EGFR inducida por TGF- α en células EGFR-NR6

D1.5 fue analizado para determinar si inhibía la fosforilación de EGFR inducida por TGF- α con mayor potencia en comparación con el clon parental. Los anticuerpos fueron probados en células EGFR-NR6 y el ensayo se efectuó como se describió más arriba en el Ejemplo 2. Un anticuerpo anti-EGFR disponible en el comercio fue usado como control positivo.

Los resultados demuestran que D1.5 mostró una mayor inhibición de la fosforilación de EGFR inducida por el ligando, comparado con el clon parental D1.

Inhibición de la proliferación celular en células H1666

Se efectuó un ensayo para determinar si D1.5 inhibe la proliferación celular de una línea celular de cáncer NSCLC, H1666, que expresa EGFR, HER2 y HER3 a niveles moderados. Células H1666 (ATCC CRL-5885, Manassas, Va.) fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 5.000 células. Al día siguiente, las células fueron tratadas simultáneamente con diversas concentraciones de anticuerpo (hasta 50 μ g/ml) en un medio que contenía 1% de suero. Después de 3 días, se agregó Azul Alamar y la fluorescencia se detectó usando un fluorómetro. Los resultados se expresaron en RFUs.

Los resultados demuestran que D1.5 mostró una mayor inhibición del crecimiento celular que D1.

Estudio de xenoinjerto de A431

Un modelo de xenoinjerto de A431 fue usado para validar la eficacia *in vivo* del anticuerpo anti-EGFR con afinidad madurada D1.5. Las células A431 son amplificadas en EGFR y responden muy bien a agentes anti-EGFR. El estudio se efectuó en ratones nu/un y un anticuerpo anti-EGFR disponible en el comercio fue usado como referencia.

En un primer paso, la reactividad cruzada de D1.5 con EGFR de murino fue evaluada en un ensayo ELISA competitivo. Inmunoplasmas fueron recubiertas con hEGFR-ECD-Fc. Diluciones seriadas de mEGFR-ECD-Fc fueron incubadas con una concentración fija de D1.5. Los resultados indican que D1.5 reaccionó en forma cruzada con EGFR de murino. Para determinar la dosificación necesaria para el estudio de eficacia *in vivo*, D1.5 se inyectó primero en una dosis única (50 mg/kg) y las concentraciones de IgG en el suero se midieron por ELISA. D1.5 fue eliminado más rápido y se vieron concentraciones en disminución después de siete días post-inyección. El estudio de eficacia (modelo de xenoinjerto de A431) reveló que D1.5 inhibió completamente el crecimiento del tumor. D1.5 fue tan eficaz como el anticuerpo anti-EGFR a 50 mg/kg. Su potencia reducida en el grupo con dosis más baja (25 mg/kg) se debió a la eliminación más rápida del anticuerpo. (Figura 1).

Ejemplo 5

Diseño de bibliotecas de cadena liviana y sondeo para anticuerpos biespecíficos

Diseño y construcción de las bibliotecas

Se diseñaron bibliotecas basadas en un molde de D1.5 para diversificar la composición de amino ácidos y la longitud de las CDRs de la cadena liviana del anticuerpo. Un subconjunto de las posiciones aleatorizadas fueron hechas a medida para representar amino ácidos que son parte del repertorio natural en estos sitios, en tanto que los sitios restantes fueron aleatorizados para incluir el total de los 20 amino ácidos que existen en la naturaleza. Además, posiciones aleatorizadas en CDR L3 fueron hechas a medida y sesgadas hacia la secuencia nativa del molde, porque esta CDR se considera importante para la unión de D1.5. Para CDR L1, cada longitud era una mezcla de tres oligonucleótidos que contenían codones para las posiciones 28-33. Para una L1 más larga, NNK fue insertado entre las posiciones 30 y 31.

Posiciones	28	29	30	31	32	33
CDR-L1	G ₇₀ A ₇₀ C ₇₀	RTT	NNK	NNK	TAC	STA
	G ₇₀ A ₇₀ C ₇₀	RTT	NNK	NNK	DGG	STA
	G ₇₀ A ₇₀ C ₇₀	RTT	NNK	NNK	NMT	STA

Para CDR L2, cuatro oligonucleótidos fueron mezclados 1:1:2:10.

	50	51	52	53
CDR-L2	NKK	GST	TCC	NNK
	TGG	GST	TCC	NNK
	KG Ø	GST	TCC	TMT
	NKK	GST	TCC	TMT

N=A/C/G/T, D=A/G/T, V=A/C/G, B=C/G/T, H=A/C/T, K=G/T, M=A/C, R=A/G, S=G/C, W=A/T, Y=C/T.

* G₇₀A₇₀C₇₀ permite que el 70% del nucleótido designado y el 10% de cada uno de los otros tres codifiquen aproximadamente 50% de Glu y 50% de los otros amino ácidos. Véase la publicación de patente norteamericana US N° 2008/0069820 y Bostrom, J. *et al.*, Science 323:1610-1614 (2009).

La diversidad para CDR L3 es derivada de la mezcla de los siguientes oligonucleótidos. Oligonucleótidos de CDR_L3 de D1.5

- F693** ACTTATTAC TGT CAG CAA 878 NNK 776 RST CCT TAC ACG TTC GGA (SEQ ID: 70)
- F694** ACTTATTAC TGT CAG CAA 878 TAC 776 RST CCT TAC ACG TTC GGA (SEQ ID: 71)
- F695** ACTTATTAC TGT CAG CAA DGG NNK 776 577 CCT TAC ACG TTC GGA (SEQ ID: 72)
- F696** ACTTATTAC TGT CAG CAA KMT NNK 776 577 CCT TAC ACG TTC GGA (SEQ ID: 73)
- F697** ACTTATTAC TGT CAG CAA 878 NNK 776 NNK CCT TAC ACG TTC GGA (SEQ ID: 74)
- F698** ACTTATTAC TGT CAG CAA DGG NNK NNK RST CCT TAC ACG TTC GGA (SEQ ID: 75)
- F699** ACTTATTAC TGT CAG CAA KMT NNK NNK RST CCT TAC ACG TTC GGA (SEQ ID: 76)

5=70% de A, 6=70% de G, 7=70% de C, 8=70% de T (10% para el resto de tres nucleótidos)

En todas las bibliotecas, la cadena pesada se mantuvo constante con la secuencia del clon parental. Todos los moldes de la biblioteca contenían un codón de detención incorporado en CDR L1, impidiendo la presencia de la cadena liviana del molde entre los miembros de la biblioteca de anticuerpos exhibidos en fagos.

Se construyeron bibliotecas por un método de mutagénesis (mutagénesis de Kunkel) usando el ADN molde de una sola hebra que contenía el codón de detención para alinear con los conjuntos de oligonucleótidos para tres CDRs, L1, L2 y L3, simultáneamente. ADN de las bibliotecas proveniente de la mutagénesis fue transformado en la cepa de células bacterianas SS320 por electroporación, y se cultivó con fagos auxiliares KO7. Colonias individuales de las bibliotecas construidas fueron evaluadas en cuanto a niveles de exhibición mediante la detección del marcador gD en el terminal C de la cadena liviana, y en cuanto a la retención de la unión al antígeno primario (EGFR) en un formato ELISA de una sola mancha. Un promedio de 35% de las colonias individuales evaluadas de las bibliotecas de D1.5 presentan un alto nivel de exhibición y retuvieron la propiedad de unión a EGFR.

Clasificación y sondeo de las bibliotecas para el aislamiento de clones con especificidad doble

Las bibliotecas fueron sometidas a una ronda inicial de selección por unión con anticuerpo anti-gD como el blanco de captura, para eliminar los clones en los cuales el gen de Fab había sido deletado o no estaba expresado, y selección por unión con hEGFR-ECD-Fc, seguido por 4 rondas de selección con antígeno en placa (HER2-ECD, HER2-ECD-Fc, HER2-I-III-Fc, HER3-ECD-Fc, HER4-ECD-Fc (en todos los casos, el Fc en las construcciones de fusión es el fragmento que se une al complemento de hIgG1). Alternativamente, fueron sometidas directamente a selección por unión al blanco sin pre-selección con anti-gD y hEGFR-ECD-Fc.

Cada ronda de selección en placa se efectuó como se describió anteriormente en el Ejemplo 3. Clones aleatorios de las rondas 3 y 4 fueron seleccionados para sondeo y sometidos a un ensayo ELISA para fagos, en el cual la unión al blanco y a anti-gD fue comparada con la unión a una proteína no

relevante (BSA) para comprobar unión no específica. Los clones que se unieron al anticuerpo anti-gD y al blanco, pero no a los controles de proteínas que no eran blanco (tales como albúmina de suero de bovino, otras IgGs), fueron considerados como positivos específicos.

Las regiones del dominio variable de la cadena liviana de los clones positivos fueron amplificadas por PCR y secuenciadas. El análisis de la secuencia de ADN de los clones de unión ("binders") positivos específicos reveló 1 clon de unión singular para ambos EGFR y HER2 (D1.5-201 (SEQ ID NO: 36)), 7 clones de unión singulares para ambos EGFR y HER3 (D1.5-100 (SEQ ID NO: 40), D1.5-103 (SEQ ID NO: 41), D1.5-113 (SEQ ID NO: 42), D1.5-115 (SEQ ID NO: 43), D1.5-116 (SEQ ID NO: 44), D1.5-121 (SEQ ID NO: 45), D1.5-122 (SEQ ID NO: 46)), 1 clon de unión singular para ambos EGFR y HER4 (D1.5-400, (SEQ ID NO: 39)).

Ocho de los nueve clones biespecíficos retuvieron la prolina en la posición 93 en HVR L3. Debido a que la adopción de prolina en esta posición (con tirosina en la posición 96) aumentó dramáticamente la afinidad de D1.5 por EGFR en comparación con su clon parental D1, es probable que sea un contribuyente en la retención de la unión a EGFR.

Evaluación de la especificidad de los clones en fagos hEGFR/HER2, hEGFR/HER3, hEGFR/HER4 biespecíficos

Para determinar si los nueve clones con actividades dobles eran específicos para sus blancos cognados, se evaluó su unión a un panel de antígenos en un formato ELISA en placa directa.

2 µg/ml de varias proteínas fueron aplicados como recubrimiento en inmunoplasacas durante la noche a 4°C. Las placas fueron bloqueadas con BSA al 1% en PBST, y una dilución del sobrenadante de los Fabs en fagos cultivados como se describió en el Ejemplo 1 fue aplicada a la placa por 30 minutos.

Las placas se lavaron y las señales de unión se registraron y analizaron como se describió en el Ejemplo 1. Los resultados indican que todos los clones con especificidades dobles eran específicos para sus blancos cognados. El clon D1.5-4 y el clon parental D1.5 se usaron como controles. (Figura 2).

Ejemplo 6

Caracterización de anticuerpos con especificidad doble como mIgG libre

Todos los clones con especificidad doble fueron reformateados a mIgG2A para su caracterización posterior, usando el mismo sitio de restricción descrito más arriba y vectores diseñados previamente para la expresión transitoria de IgG de murino en células de mamífero.

Inhibición de la fosforilación de EGFR inducida por TGF- α en células EGFR-NR6

Para determinar si los siete anticuerpos con especificidad doble seleccionados bloquean la fosforilación de EGFR inducida por TGF- α , células EGFR-NR6 transfectadas en forma estable fueron tratadas como se describió en el Ejemplo 2. Los datos en la Figura 3 demuestran que los anticuerpos EGFR/HER3 y EGFR/HER2 inhibieron la fosforilación de EGFR inducida por TGF- α a alta concentración. Un anticuerpo anti-EGFR disponible en el comercio fue usado como control positivo.

Un estudio de dosis respuesta en los clones D1.5-100 y D1.5-103 mostró que el clon D1.5-100 perdió la alta potencia de su clon parental (D1.5) para inhibir la fosforilación de EGFR. Sin embargo, D1.5-103 tuvo una potencia similar a D1.5 en este ensayo.

Inhibición de la unión de herregulina a HER3 por anticuerpos anti-EGFR/HER3

Para determinar si los anticuerpos anti-EGFR/HER3 seleccionados podían inhibir la unión de herregulina a la proteína HER3-ECD-Fc, IgGs purificadas fueron analizadas en un ensayo de unión con ligando radiomarcado.

Se efectuaron ensayos de unión en pocillos desmontables de Nunc. Las placas fueron recubiertas a 4°C durante la noche con 100 μ l de 5 mg/ml de Ab anti-humano de cabra en tampón de carbonato 50 mM (pH 9,6). Las placas fueron enjuagadas dos veces con tampón de lavado (PBS/0,005% de Tween 20) y bloqueadas con 100 μ l de BSA al 1%/PBS por 30 minutos. El tampón fue removido y cada pocillo fue incubado con 200 ng de HER3-ECD-Fc en BSA al 1%/PBS por 1,5 horas. Las placas fueron enjuagadas tres veces con tampón de lavado y los anticuerpos en BSA al 1%/PBS fueron pre-unidos a HER3-IgG a 4°C durante la noche. Se agregó 125 I-HRG y las placas fueron incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Las placas fueron enjuagadas tres veces y los pocillos individuales fueron contados usando un contador Iso Data $\square\square$ Serie 100. (Figura

4). Los resultados demuestran que los siete anticuerpos con especificidad doble para EGFR y HER3 pueden inhibir la unión de herregulina a HER3-ECD-Fc.

Inhibición de la unión de herregulina a HER4 por un anticuerpo anti-EGFR/HER4

Para determinar si el anticuerpo anti-EGFR/HER4 seleccionado, D1.5-400, podía inhibir la unión de herregulina a HER4-ECD-Fc, se efectuó un ensayo de unión al ligando como el descrito más arriba. Se usaron 25 ng de HER4-ECD-Fc en lugar de HER3-ECD-Fc. Los resultados demuestran que D1.5-400 inhibió la unión de herregulina a HER4.

Inhibición de la fosforilación de HER2/HER3 inducida por herregulina en células MCF7

Para determinar si los siete anticuerpos seleccionados con especificidad doble para EGFR y HER3 podían inhibir la fosforilación de HER2/HER3 inducida por herregulina en células MCF7, ellos fueron analizados en un ensayo de fosforilación del receptor: células MCF7 (ATCC HTB 22, Manassas, Va.) fueron sembradas en placas de 12 pocillos. Después de un ayuno de suero, las células fueron incubadas con los anticuerpos indicados (75 µg/ml o 150 µg/ml) por 2 horas. Las células fueron estimuladas con HRG 0,5 nM por 8 minutos y los lisados celulares totales fueron corridos en SDS-PAGE, y las manchas de inmunotransferencia "Western blot" fueron sondeadas con anti-fosfo-HER3, anti-pTyr o anti-tubulina como control de carga. (Figura 5). Los resultados demuestran que todos los anticuerpos anti-EGFR/HER3 inhibieron la fosforilación de HER2/HER3 inducida por herregulina a alta concentración. Pertuzumab (Pmab) fue usado como control positivo.

Inhibición de la proliferación de células MDA-175

Para determinar el potencial inhibidor del crecimiento de los anticuerpos anti-EGFR/HER3 en el crecimiento celular impulsado por HRG, células MDA-175 (ATCC HTB 25, Manassas, Va.) (20.000 células/pocillo) fueron sembradas en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, las células fueron tratadas simultáneamente con diversas concentraciones de anticuerpo (hasta 50 µg/ml) en un medio que contenía 1% de suero. Después de 4 días o 5 días, se agregó Azul Alamar y la fluorescencia se detectó usando un fluorómetro. Los resultados se expresaron en RFUs. Se eligieron células MDA-175 debido a que su crecimiento es el resultado de una estimulación autocrina por HRG. El anticuerpo anti-

EGFR/HER3 D1.5-100 y el clon D1.5-122 mostraron inhibición del crecimiento de las células MDA-175. Pertuzumab (Pmab) fue usado como control positivo. (Figura 6).

Ejemplo 7

Estudio de mapeo por mutagénesis de los anticuerpos biespecíficos anti-hEGFR/HER3, D1.5-100 y D1.5-103

Se efectuó un análisis de barrido con alanina y homólogos por el método "shotgun" usando bibliotecas combinatorias exhibidas en fagos (Vajdos *et al.*, J. Biol. Biol. 320:415-28 (2002)) para investigar la interacción entre cada anticuerpo y sus dos antígenos, EGFR y HER3.

Las selecciones por unión en los antígenos (hEGFR y HER3) para aislar clones funcionales, seguidas por secuenciación de ADN, permitieron calcular las razones tipo silvestre/mutante en cada posición variada. Enseguida, estas razones fueron usadas para determinar la contribución de cada cadena lateral barrida a la unión a EGFR y HER3.

Los resultados permitieron el mapeo del parátipo funcional para la unión a EGFR y HER3.

Diseño de bibliotecas "shotgun" de D1.5-100 y D1.5-103

Residuos expuestos al solvente en las CDRs fueron barridos usando bibliotecas exhibidas en fagos, donde se permitió que los residuos de tipo silvestre variaran ya sea como un residuo alanina o de tipo silvestre (barrido con alanina) o como un residuo homólogo o de tipo silvestre (barrido con homólogos). La naturaleza del código genético requirió que algunas otras sustituciones fueran incluidas en la biblioteca, además de los residuos Wt/Alanina o Wt/Homólogo. Se construyeron bibliotecas de cadena pesada y cadena liviana separadas por barrido con alanina y homólogos. La degeneración estuvo en el rango de $1,3 \times 10^5$ a $7,5 \times 10^7$.

Construcción de bibliotecas por barrido "shotgun"

Se construyeron bibliotecas como se describió anteriormente, excepto que un Fab único fue expresado en la superficie de bacteriófagos fusionados al dominio C-terminal de la proteína minoritaria de la cápside, gen-3 de M13, después de la remoción de la cremallera de leucina del plásmido original por

mutagénesis de Kunkel (Oligo F220: TCT TGT GAC AAA ACT CAC AGT GGC GGT GGC TCT GGT). (SEQ ID NO: 77)

La biblioteca de barrido con alanina y homólogos de la cadena liviana tenía codones de detención en HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3, y las bibliotecas de barrido con alanina y homólogos de la cadena pesada contenían codones de detención en cada HVR de la cadena pesada. Las bibliotecas se construyeron por métodos descritos anteriormente (Sidhu *et al.*, J. Mol. Biol. 338:299-310 (2004)), usando mutagénesis de Kunkel (Kunkel *et al.*, 1987, *supra*) en los moldes de detención respectivos. Las bibliotecas de barrido con alanina son bibliotecas exhibidas en fagos que permiten que cadenas laterales seleccionadas varíen como residuos de tipo silvestre o alanina. Barrido con homólogos significa que las bibliotecas exhibidas en fagos permiten que cadenas laterales seleccionadas varíen como amino ácidos de tipo silvestre o similares.

Selección de bibliotecas

Inmunoplasacas Maxisorp de 96 pocillos de NUNC fueron recubiertas con 5 µg/ml e blanco de captura (EGFR-ECD-Fc, HER3-ECD-Fc o Proteína L) y bloqueadas con BSA al 1% (p/v) en PBS. Fagos de las bibliotecas descritas más arriba fueron propagados con fagos auxiliares KO7 (NEB), como se ha descrito (Lee *et al.*, 2004, *supra*). Soluciones de fagos de la biblioteca fueron agregadas a las placas recubiertas a una concentración de 10^{13} partículas de fagos/ml y se incubó por 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 8 veces con PBST, seguido por la elución de los fagos unidos con HCl 0,1 M por 30 minutos. El enriquecimiento después de cada ronda de selección fue determinado como se describió anteriormente. Después de 2 rondas de selección con blanco, se seleccionó un número de clones aleatorios de cada biblioteca para secuenciación como se ha descrito (Sidhu *et al.*, 2004, *supra*).

Las secuencias de ADN de los clones que se unieron fueron usadas para determinar las razones tipo silvestre/mutación en cada posición variada. Las razones fueron usadas para evaluar la contribución a la unión al antígeno de cada cadena lateral seleccionada. Dividiendo la razón wt/mut de la selección de antígenos por la razón wt/mut de la selección de exhibición, se obtiene una estimación cuantitativa del efecto de cada mutación sobre la afinidad de unión al antígeno (razón de función $F_{wt/mut}$). Si la razón es mayor que 1, la mutación es perjudicial. Si la razón es menor que 1, la mutación es beneficiosa. 2.500 clones fueron secuenciados.

En base a los resultados del barrido con alanina y homólogos, los puntos calientes del anticuerpo D1.5-100 para la unión a EGFR y HER3 fueron mapeados en la estructura del anticuerpo anti-HER2 conocido 4D5-Fv. Como se ve en la Figura 7, el mapeo sugiere que para la unión a EGFR, la cadena pesada domina, y las cadenas pesada y liviana trabajan juntas para la unión a HER3. Los residuos ácidos (E, D) tienen un rol importante en la unión a ambos EGFR y HER3, y especialmente a HER3.

Maduración de la afinidad

La Figura 8 ilustra la maduración de la afinidad de D1.5-100, usando las bibliotecas "shotgun" descritas más arriba. En esta estrategia de maduración de la afinidad, la biblioteca de homólogos de cadena pesada D1.5-100 fue clasificada como se describió anteriormente. Después de efectuar dos rondas de clasificación en placa, en placas recubiertas con HER3-ECD-Fc, y tres rondas en solución, blancos alternantes fueron clasificados (EGFR-ECD y HER3-ECD-Fc) bajo rigurosidad creciente. Se eligieron clones individuales que fueron evaluados en un ensayo ELISA de una sola mancha para aislar clones que retuvieron la actividad de unión doble. Entre los clones evaluados, 79 de 94 muestran unión a ambos EGFR/HER3, en tanto que 11 perdieron la unión a EGFR y muestran unión específica a HER3.

Aislamiento de clones por competencia de una sola mancha

Se eligieron colonias individuales de la última ronda de clasificación y los fagos se cultivaron como se describió en el Ejemplo 1. 384 pocillos fueron recubiertos con EGFR-ECD-Fc a 1 µl/ml. Para cada colonia cultivada, 25 µl de sobrenadante de los fagos o tampón de ELISA fueron incubados con 25 µl de EGFR-ECD (50 nM) y HER3-ECD-Fc (10 nM). 4 µl de la incubación fueron agregados a la placa recubierta con EGFR-ECD-Fc, y la placa fue lavada ocho veces. Se agregaron 60 µl del anticuerpo conjugado anti-M13-HRP 1/5000, y la placa fue lavada ocho veces y desarrollada con TMB + H₃PO₄.

Se seleccionaron ocho clones singulares que muestran mayor inhibición que D1.5-100 para EGFR y HER3, usando el siguiente protocolo de competencia con una sola mancha:

1. Se eligieron colonias individuales de la última ronda de clasificación y los fagos se cultivaron como se describió anteriormente;

2. Una placa de 384 pocillos fue recubierta con EGFR-ECD-Fc a 1 µg/ml;
3. Para cada colonia cultivada, 25 µl de sobrenadante de los fagos o tampón de ELISA fueron incubados con 25 µl de EGFR-ECD (50 nM) y HER3-ECD-Fc (10 nM);
4. 4 µl de la incubación fueron agregados a la placa recubierta con EGFR-ECD-Fc;
5. La placa fue lavada 8 veces;
6. Se agregaron 60 µl del anticuerpo conjugado anti-M13-HRP 1/5000;
7. La placa fue lavada 8 veces;
8. La placa fue desarrollada con TMB + H₃PO₄.

Se seleccionaron 8 clones singulares que muestran mayor inhibición que D1.5-100 para ambos EGFR y HER3 (DL6, SEQ ID NO: 63; DL7, SEQ ID NO: 64; DL8, SEQ ID NO: 65; DL9, SEQ ID NO: 66; DL10, SEQ ID NO: 67; DL11, SEQ ID NO: 28; DL12, SEQ ID NO: 68; DL13, SEQ ID NO: 69). Para los anticuerpos anti-HER3, se seleccionaron 7 clones singulares que muestran mayor inhibición que D1.5-100 para HER3.

Caracterización de anticuerpos biespecíficos y anti-HER3 con la afinidad madurada

La especificidad de unión de anticuerpos biespecíficos con la afinidad madurada seleccionados fue evaluada por unión directa a un panel de diversas proteínas, como se describió en el Ejemplo 5. Como se ve en la Figura 9, los anticuerpos seleccionados mostraron especificidad de unión para ambos EGFR y HER3.

Se calcularon los valores de IC₅₀ para dos anticuerpos biespecíficos seleccionados (DL7 y DL11), como se describió en el Ejemplo 1, y se compararon con el clon parental D1.5-100. Ambos anticuerpos biespecíficos seleccionados muestran afinidad similar por HER3-ECD-Fc y afinidad aumentada por EGFR. DL1.5-100 tuvo una IC₅₀ de 44 nM para EGFR-ECD, 0,1 nM para HER3-FC; DL7 tuvo una IC₅₀ de 6,1 nM para EGFR-ECD, 0,25 nM para HER3-FC; DL11 tuvo una IC₅₀ de 5,7 nM para EGFR-ECD, 0,43 nM para HER3-FC.

La especificidad de unión de anticuerpos anti-HER3 seleccionados fue evaluada por unión directa a un panel de diversas proteínas, como se

describió anteriormente. Los anticuerpos seleccionados (DL3.5, DL3.6, DL3.7) muestran especificidad de unión solamente para HER3.

Se calcularon los valores de IC₅₀ en fagos para anticuerpos seleccionados como se describió más arriba, y se compararon con el clon parental D1.5-100. Todos los anticuerpos (DL3.1-3.7) muestran afinidad aumentada por HER3-ECD-Fc, con IC₅₀s de entre 1 y 3,8 nM. El clon parental DL1.5-100 tuvo una IC₅₀ de 4,6 nM.

La unión de anticuerpos biespecíficos y anticuerpos anti-HER3 seleccionados fue comparada con la unión de la proteína del dominio III de HER3 (marcador His N-terminal) usando el ensayo ELISA de competencia descrito más arriba. Los anticuerpos contra EGFR/HER3 y anti-HER3 monoespecífico tienen afinidades similares por las construcciones HER3-ECD-Fc y dominio III de HER3 (IC₅₀ en fagos).

Anticuerpos biespecíficos y anticuerpos anti-HER3 con la afinidad madurada seleccionados fueron reformateados a mlgG2A y validados en un ensayo ELISA de competencia, como se describió más arriba. Los anticuerpos mlgG2A biespecíficos muestran afinidad aumentada por ambos EGFR-ECD y dominio III de HER3, en comparación con el clon parental D1.5-100.

Usando BIAcore 300 para el análisis cinético de los anticuerpos contra EGFR/HER3 con la afinidad madurada DL7 y DL11, y los anticuerpos específicos anti-HER3 DL3.6 y DL3.7, mlgG2A purificada de cada anticuerpo (DL1.5-100, DL7, DL11, DL3.6, DL3.7) fue acoplada sobre un chip CM5, y varias diluciones del antígeno (EGFR-ECD, dominio III de HER3, HER3-ECD) se hicieron fluir sobre el chip recubierto bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 4. El chip CM5 fue regenerado entre cada inyección de antígeno. Finalmente, se determinó KD usando un análisis de unión 1:1 con transferencia de masa. Los anticuerpos contra EGFR/HER3 con la afinidad madurada DL7 y DL11 tienen una KD (M) mejorada para ambos blancos.

Con el fin de evaluar la función inhibidora de los anticuerpos DL7, DL11 con la afinidad madurada y el anticuerpo parental D1.5 sobre EGFR, células EGFR-NR6 que sólo expresan EGFR fueron pretratadas con diversas cantidades de anticuerpos (hasta 20 µg/ml) por una hora y, posteriormente, la fosforilación de EGFR fue inducida por TGFα (5 nM). La inhibición de la fosforilación del receptor por los anticuerpos fue detectada usando un anticuerpo anti-fosfotirosina. También se vio inhibición de la activación de MAPK de una manera dependiente

de la dosis. El anticuerpo DL11 fue más potente que DL7 para inhibir la fosforilación de EGFR y ERK1/2. (Figura 10A).

Se comparó la función inhibidora de DL7, DL11 y el anticuerpo anti-HER3 monoespecífico DL3.6 sobre la transactivación de HER3. (Figura 10B). Células MCF-7 que expresan HER2, HER3 y EGFR fueron pretratadas con cantidades indicadas de anticuerpo (hasta 50 µg/ml) por una hora, y la activación de HER3 y la transfosforilación de HER3 fueron inducidas por HRG. La inhibición de la fosforilación de HER3 fue detectada usando un anticuerpo anti-fosfo HER3. Se vio inhibición de las moléculas de señalización aguas abajo, ERK1/2 y también Akt, de una manera dependiente de la dosis. Nuevamente DL11 fue más potente que DL7.

La función inhibidora del crecimiento de DL11 fue comparada con la de un anticuerpo anti-EGFR disponible en el comercio, pertuzumab y un anticuerpo anti-HER3, o con la de DL3.6, D1.5 o la combinación de D1.5 más DL3.6. Células H1666 (ATCC CRL-5885, Manassas, Va.) (una línea celular de NSCLC que expresa HER2, HER3, EGFR y ligandos de EGFR) (6.000 células/pocillo) fueron estimuladas en su crecimiento con HRG (3 nM). Los anticuerpos fueron ensayados de una manera dependiente de la dosis, y las características inhibidoras del crecimiento fueron comparadas con todos los otros anticuerpos monoespecíficos. Como se muestra en la Figura 11A, DL11 inhibió el crecimiento celular en mayor medida que los anticuerpos monoespecíficos, o combinaciones de los mismos.

Resultados similares se obtuvieron cuando el ensayo se repitió usando células H1666 estimuladas en su crecimiento con HRG (3 nM) + TGF α (6 nM). (Figura 11B).

La función inhibidora del crecimiento de DL11 fue comparada con pertuzumab, un anticuerpo anti-EGFR y un anticuerpo anti-HER3, o con DL3.6, D1.5 o la combinación de D1.5 más DL3.6 en células HCA-7. HCA-7 es una línea celular colorrectal que expresa HER2, HER3 y EGFR. El crecimiento celular fue estimulado con HRG (3 nM) en presencia de suero al 1%. Los anticuerpos fueron ensayados de una manera dependiente de la dosis y la viabilidad celular fue detectada después de 3 días, usando el reactivo Azul Alamar. Como se ve en la Figura 12A, DL11 mostró características inhibidoras del crecimiento superiores en comparación con todos los otros tratamientos.

La inhibición del crecimiento de las células HCA-7 fue investigada como se describió en relación con la Figura 12A, excepto que el crecimiento fue

estimulado con HRG (3 nM) más $TGF\alpha$ (5 nM). Como se ve en la Figura 12B, DL11 mostró características inhibitoras del crecimiento superiores en comparación con todos los otros tratamientos.

Se investigó la inhibición del crecimiento de Calu-3 por DL11 en comparación con un anticuerpo anti-EGFR, pertuzumab y un anticuerpo anti-HER3. La línea celular de NSCLC Calu-3 (ATCC HTB-55, Manassas, Va.) sobreexpresa HER2 y tiene niveles normales de HER3 y EGFR. El crecimiento celular (10.000 células/pocillo) fue estimulado con HRG (3 nM) en presencia de suero al 1%, y los anticuerpos fueron ensayados de una manera dependiente de la dosis. Como se ve en la Figura 13, DL11 mostró una actividad superior comparado con los anticuerpos monoespecíficos.

Ejemplo 8

Estudio de mapeo por mutagénesis de los anticuerpos biespecíficos anti-hEGFR/HER2, D1.5-201 y D1.5-201-2

Para la maduración de la afinidad de D1.5-201, se diseñó una biblioteca de "soft"/homólogos de cadena liviana en amino ácidos seleccionados. Algunos residuos "soft" fueron aleatorizados "soft", donde la frecuencia de residuos de tipo silvestre fue de 50%. Algunos residuos fueron aleatorizados usando codones que codifican el residuo de tipo silvestre o el residuo homólogo. alguna aleatorización de homólogos permite 1 ó 2 residuos adicionales además del residuo de tipo silvestre y el homólogo. Finalmente, algunos residuos no fueron cambiados.

La Figura 14 ilustra otra estrategia de clasificación para la maduración de la afinidad de D1.5-201. En esta estrategia, la biblioteca de "soft"/homólogos de la cadena liviana de D1.5-201 fue clasificada como se describió anteriormente. Después de efectuar tres rondas de clasificación en placa/solución alternadas en HER2/ECD bajo rigurosidad creciente, se eligieron clones individuales que fueron evaluados en un ensayo ELISA de una sola mancha, para aislar clones que retuvieron la actividad de unión doble para EGFR y HER2. Entre los clones evaluados, 77/192 muestran unión a ambos EGFR y HER2.

Se determinaron las secuencias de la región variable de la cadena liviana para los anticuerpos biespecíficos contra EGFR/HER2 con la afinidad madurada seleccionados (D1.5-201 (SEQ ID NO: 36), D1.5-201-2 (SEQ ID NO:

37), D1.5-201-3 (SEQ ID NO: 38)). Se calcularon las IC50 en fagos para dos anticuerpos biespecíficos con la afinidad madurada seleccionados (D1.5-201-2, D1.5-201-3) como se describió anteriormente, y se compararon con el clon parental D1.5-201. Ambos anticuerpos biespecíficos con la afinidad madurada muestran afinidad aumentada por HER2-ECD y EGFR-ECD.

Ejemplo 9

Maduración de la afinidad de DL11

La afinidad de DL11 fue madurada adicionalmente como se describió más arriba, dando como resultado dos anticuerpos biespecíficos adicionales con especificidad para EGFR y HER3 (DL11b y DL11f) y dos anticuerpos específicos para HER3 (DL3-11b y DL3-11f). Las secuencias de amino ácidos de la cadena pesada y la cadena liviana de DL11b se muestran en SEQ ID NOs: 12 y 13, respectivamente. Las secuencias de amino ácidos de la cadena pesada y la cadena liviana de DL11f se muestran en SEQ ID NOs: 14 y 13, respectivamente. Las secuencias de amino ácidos de la cadena pesada y la cadena liviana de DL3-11b se muestran en SEQ ID NOs: 19 y 13, respectivamente, y las secuencias de amino ácidos de la cadena pesada y la cadena liviana de DL3-11f se muestran en SEQ ID NOs: 20 y 13, respectivamente.

Ensayo de afinidad Biacore

Las afinidades de unión de DL11b y DL11f por sus blancos EGFR y HER3 se determinaron en el siguiente ensayo Biacore. Tanto DL11b como DL11f mostraron afinidad aumentada por sus blancos en comparación con DL11.

Las mediciones se efectuaron usando resonancia de plasmón de superficie en un instrumento BIAcore® 2000 (GE Healthcare, BIAcore Life Sciences, Piscataway, NJ). ADNcs que codifican los dominios extracelulares (ECDs) de EGFR humano (amino ácidos 1-637) y HER3 humano (amino ácidos 1-640) fueron clonados en un vector de expresión de mamífero que contenía secuencias que codifican la región Fc de IgG1 humana, para generar proteína de fusión con Fc humano. EGFR-IgG1 recombinante humano (2,65 mg/ml), HER3-IgG1 humano (3,35 mg/ml) fueron producidos transfectando transitoriamente células de ovario de hámster chino, y fueron purificados por cromatografía de afinidad con proteína A. ADNc que codifica el dominio extracelular de EGFR

humano (amino ácidos 1-637) fue clonado en un vector de expresión de mamífero que contenía una secuencia Flag N-terminal.

Se determinaron las afinidades de unión de DL11f como un Fab y como un anticuerpo IgG. Para el ensayo de Fab, el Fab DL11f fue el analito y se hizo fluir sobre un chip CM5 donde los diferentes ligandos, EGFR humano-Fc y HER3 humano-Fc, fueron capturados primero usando el kit de captura de anticuerpos humanos de BIAcore (BR-1008-39, Lote 10020611). Una serie de diluciones dobles del Fab DL11f fueron inyectadas en un rango de 0,244-250 nM en PBS, 0,05% de Tween 20, a una velocidad de flujo de 30 μ l/minuto a 25°C. Entre cada inyección de ligandos fusionados con Fc y analito, se usó cloruro de magnesio 3M para regenerar el chip sensor (5 μ l a una velocidad de flujo de 10 μ l/min). Para determinar las constantes de afinidad del Fab DL11f para las proteínas de fusión de EGFR humano y HER3 humano con Fc, la señal proveniente de la celda de referencia fue restada del sensograma de la prueba observado. Las constantes cinéticas se calcularon por ajuste de regresión no lineal de los datos de acuerdo con un modelo de unión 1:1 de Langmuir, usando software de evaluación de BIAcore (GE Healthcare), version 4.1, suministrado por el fabricante. Dos réplicas de una concentración representativa del Fab DL11f (125 nM) dieron un ajuste y constantes cinéticas muy similares para todas las proteínas de fusión con Fc. El Fab DL11f se unió a EGFR humano-Fc con un valor de KD de 1,92 nM y a HER3 humano-Fc con un valor de KD de 0,39 nM.

Una segunda condición experimental fue explorada para obtener la cinética de unión de DL11f como IgG. Aquí, la IgG1 humana DL11f fue inmovilizada en el chip sensor CM5, y EGFR-ecd humano y HER3-ecd humano monoméricos fueron usados como el analito. Una serie de diluciones dobles de EGFR-ecd humano y HER3-ecd humano fueron inyectadas en un rango de 0,244-250 nM en PBS, 0,05% de Tween 20, a una velocidad de flujo de 30 μ l/minuto a 25°C. Las cinéticas de unión se determinaron como para el Fab. DL11f se unió a EGFR-ecd humano y a HER3 humano-Fc con valores de KD de 19,9 nM y 2,63 nM, respectivamente. En ambos experimentos, observamos que el anticuerpo DL11f tiene una afinidad 5-8 veces más alta consistente por HER3 que por EGFR. Las afinidades más débiles encontradas en el experimento 2 para ambos receptores, en comparación con el experimento 1, podrían deberse a una diferencia entre tener EGFR-ecd o HER3-ecd como analitos en solución y el receptor como fusión con Fc inmovilizados en el chip de la celda de flujo. Es posible que estos receptores multi-dominios como ECD libre puedan encontrar

más penalización entrópica para la energía de unión cuando están en solución, resultando así una afinidad más débil.

DL11b mostró afinidades de unión por EGFR y HER3 similares a DL11f bajo condiciones similares en un análisis Biacore separado.

DL3-11b y DL3-11f perdieron la capacidad para unirse específicamente a EGFR, pero mantuvieron la capacidad para unirse específicamente a HER3.

Inhibición de la proliferación de células MDA-175

La inhibición de la proliferación de células MDA-175 por DL11b y DL11f fue investigada como se describió más arriba. Tanto DL11b como DL11f inhibieron la proliferación de las células MDA-175 en un grado similar al anticuerpo DL11. Figura 15. Las IC₅₀s de DL11, DL11f y DL11b fueron todas alrededor de 0,8 – 1,0 µg/ml.

Inhibición de la fosforilación de HER3 inducida por herregulina en células MCF7

Para determinar si DL11f podía inhibir la fosforilación de HER3 inducida por herregulina en células MCF7, se efectuó un ensayo de fosforilación del receptor como se describió en el Ejemplo 6. Los resultados demuestran que DL11f inhibió la fosforilación de HER3 inducida por herregulina de una manera dependiente de la dosis. Figura 16.

Inhibición de la fosforilación de EGFR inducida por TGF- α en células EGFR-NR6 transfectadas en forma estable

Para determinar si DL11f bloquea selectivamente la fosforilación de EGFR inducida por TGF- α , se efectuó un ensayo de fosforilación del receptor como se describió en el Ejemplo 2. Los datos en la Figura 16 demuestran que DL11f inhibe la fosforilación de EGFR inducida por TGF- α de una manera dependiente de la dosis en este ensayo basado en células.

DL11 y DL11f inhiben el crecimiento tumoral en un modelo in vivo

Un ensayo de modelo de trasplante de tumor HCA-7 se usó para determinar el efecto de DL11 y DL11f en el crecimiento tumoral *in vivo*. El ensayo se efectuó como sigue.

Ratones SCID beige (Charles River Laboratories, San Diego, CA) fueron trasplantados por vía subcutánea con trozos de tumor HCA-7. Cuando los

tumores alcanzaron un volumen medio de 100 a 250 mm³, ratones con tumores de tamaño similar fueron asignados aleatoriamente a cohortes de tratamiento (n=9/grupo) como sigue: Vehículo (PBS), Pertuzumab (10 mg/kg), D1.5 (25 mg/kg), D1.5+DL3.6 (25 mg/kg de cada uno), DL11 (25 mg/kg) o DL11f (25 mg/kg). Los tratamientos fueron administrados por vía intraperitoneal, comenzando con una dosis de carga 2x (20 ó 50 mg/kg) el día de la asignación aleatoria, y continuando semanalmente por un total de tres tratamientos. Los tumores se midieron con calibres dos veces a la semana por el período de duración del estudio. Los ratones fueron alojados en jaulas microaislantes estándar para roedores. Se fijaron controles ambientales para las habitaciones de los animales, para mantener una temperatura de aproximadamente 70°F (21°C), una humedad relativa de aproximadamente 40% - 60%, y un ciclo aproximado de 14 horas de luz/10 horas de oscuridad. Los ratones fueron mantenidos de acuerdo con la "ILAR Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", y el estudio fue revisado y aprobado por el "Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)" en Genentech.

DL11 y DL11f fueron igualmente eficaces para reducir el volumen medio del tumor en este modelo de xenoinjerto. Figura 17.

DL11f es activo en un modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas

Los anticuerpos fueron probados en ratones con tumores establecidos derivados de la línea de NSCLC humano H358 (ATCC CRL-5807, Manassas, Va.). 5x10⁶ células H358 fueron inoculadas por vía subcutánea con matrigel en ratones CB17 SCID. Animales con tumores de tamaño similar fueron asignados aleatoriamente a cohortes de tratamiento (n=9/grupo) como sigue: Vehículo (tampón de formulación de DL11f), D1.5 (25 mg/kg), DL3.11b (25 mg/kg), DL11f (30 mg/kg) o D1.5+DL3.11b (25 mg/kg de cada uno). Los tratamientos fueron administrados por vía intraperitoneal, comenzando con una dosis de carga 2x (50 ó 60 mg/kg) el día de la asignación aleatoria, y continuando semanalmente por un total de cuatro tratamientos. Los tumores se midieron con calibres dos veces a la semana por el período de duración del estudio.

Como se ve en la Figura 18, el anticuerpo biespecífico DL11f es activo en este modelo de NSCLC, y es más eficaz para inhibir el crecimiento tumoral que una combinación de un anticuerpo específico anti-EGFR y un anticuerpo específico anti-HER3 (D1.5+DL3.11b).

Ejemplo 10

Maduración de la afinidad de DL3.6

La afinidad de DL3.6 fue madurada adicionalmente como se describió más arriba, dando como resultado anticuerpos anti-HER3 adicionales. DL3.6b exhibió un aumento en la afinidad por su blanco en comparación con el anticuerpo parental DL3.6. Las secuencias de amino ácidos de las cadenas pesada y liviana de DL3.6b se muestran en SEQ ID NOs: 17 y 13, respectivamente.

Como se ve en las Figuras 19 y 20, DL3-11b, DL3.6 y DL3.6b inhibieron la fosforilación de HER3 inducida por HRG y la proliferación de células MDA-175. Los ensayos se efectuaron como se describió más arriba.

Ejemplo 11

Actividad in vivo en un modelo de xenoinjerto de Fadu, un modelo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello

DL11f, un anticuerpo anti-EGFR disponible en el comercio y un anticuerpo anti-HER3 fueron probados en ratones con tumores establecidos derivados de células Fadu (ATCC HTB-43, Manassas, Va.). 5×10^6 células FaDu fueron inoculadas por vía subcutánea en ratones CB17 SCID. Animales con tumores de tamaño similar fueron asignados aleatoriamente a cohortes de tratamiento (n=9/grupo) como sigue: Vehículo (tampón de formulación de DL11f), anticuerpo anti-EGFR (25 mg/kg), anticuerpo anti-HER3 (50 mg/kg) y DL11f (25 mg/kg). Los tratamientos fueron administrados por vía intraperitoneal, comenzando con una dosis de carga 2x (50 ó 100 mg/kg, respectivamente) el día de la asignación aleatoria, y continuando semanalmente por un total de cuatro tratamientos. Los tumores se midieron con calibres dos veces a la semana por el período de duración del estudio.

Como se ve en la Figura 21, DL11f es activo en el modelo de cáncer de cabeza y cuello FaDu, y es más eficaz para inhibir el crecimiento tumoral que un anticuerpo específico anti-EGFR o un anticuerpo específico anti-HER3.

Ejemplo 12

Actividad in vivo en un modelo de xenoinjerto de BxPC3, un modelo pancreático impulsado por HER3

DL11f, un anticuerpo anti-EGFR, pertuzumab y un anticuerpo anti-HER3 fueron probados en ratones con tumores establecidos derivados de la línea celular pancreática BxPC3 (ATCC CRL-1687, Manassas, Va.). 10×10^6 células BxPC3 fueron inoculadas por vía subcutánea en ratones CB17 SCID. Animales con tumores de tamaño similar fueron asignados aleatoriamente a cohortes de tratamiento (n=8/grupo) como sigue: Vehículo (tampón de formulación de DL11f), anticuerpo anti-EGFR (25 mg/kg), pertuzumab (25 mg/kg), anticuerpo anti-HER3 (50 mg/kg) y DL11f (25 mg/kg). Los tratamientos fueron administrados por vía intraperitoneal, comenzando con una dosis de carga 2x (50 ó 100 mg/kg) el día de la asignación aleatoria, y continuando semanalmente por un total de cuatro tratamientos. Los tumores se midieron con calibres dos veces a la semana por el período de duración del estudio.

DL11f es activo en el modelo de cáncer pancreático BxPC3, y es más eficaz para retardar el crecimiento tumoral que un anticuerpo específico anti-EGFR o un anticuerpo específico anti-HER3. (Figura 22).

Ejemplo 13

Actividad in vivo en un modelo de xenoinjerto de Calu-3 de NSCLC

DL11f, un anticuerpo anti-EGFR disponible en el comercio y un anticuerpo anti-HER3 fueron probados en ratones con tumores establecidos derivados de la línea Calu-3 de NSCLC (ATCC HTB-55, Manassas, Va.). 5×10^6 células Calu-3 fueron inoculadas por vía subcutánea en ratones SCID Beige. Animales con tumores de tamaño similar fueron asignados aleatoriamente a cohortes de tratamiento (n=9/grupo) como sigue: Vehículo (tampón de formulación de DL11f), anticuerpo anti-EGFR (25 mg/kg), anticuerpo anti-HER3 (25 mg/kg) y DL11f (25 mg/kg). Los tratamientos fueron administrados por vía intraperitoneal, comenzando con una dosis de carga 2x (50) el día de la asignación aleatoria, y continuando semanalmente (anti-HER3 bisemanalmente) por un total de cuatro (ocho) tratamientos. Los tumores se midieron con calibres dos veces a la semana por el período de duración del estudio.

DL11f es activo en el modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas Calu-3, y es más eficaz para retardar el crecimiento tumoral que un

anticuerpo específico anti-EGFR o un anticuerpo específico anti-HER3. (Figura 23).

Ejemplo 14

Actividad in vivo en un modelo de xenoinjerto de A431 epidérmico

DL11f, un anticuerpo anti-EGFR disponible en el comercio y un anticuerpo anti-HER3 fueron probados en ratones con tumores establecidos derivados de la línea celular epidermoide A431 (ATCC CRL-2592, Manassas, Va.). 5×10^6 células A431 fueron inoculadas por vía subcutánea en ratones SCID Beige. Animales con tumores de tamaño similar fueron asignados aleatoriamente a cohortes de tratamiento (n=8/grupo) como sigue: Vehículo (tampón de formulación de DL11f), un anticuerpo anti-EGFR (12,5 mg/kg), anti-HER3 (50 mg/kg) y DL11f (12,5 y 25 mg/kg). Los tratamientos fueron administrados una vez por vía intraperitoneal el día de la asignación aleatoria. Los tumores se midieron con calibres dos veces a la semana por el periodo de duración del estudio.

Debido a la eliminación más rápida de DL11f en comparación con el anticuerpo anti-EGFR en ratones, DL11f fue dosificado a una concentración 2x en comparación con el anticuerpo anti-EGFR, con el fin de lograr niveles de exposición comparables. Tomado en conjunto, DL11f inhibe el crecimiento tumoral en el modelo de cáncer epidérmico A431 tan bien como el anticuerpo anti-EGFR. (Figura 24).

Ejemplo 15

Actividad in vivo en ratones desnudos portadores de xenoinjertos de cáncer de mama MAXF449 derivados de un paciente

DL11f, un anticuerpo anti-EGFR disponible en el comercio y un anticuerpo anti-HER3 fueron analizados en Oncotest GmbH, Freiburg, Alemania. Oncotest trasplanta tumores de pacientes, como el cáncer mamario MAXF 449, como xenoinjertos subcutáneos en ratones desnudos, después de un trasplante directo de tumores de pacientes donantes. De acuerdo con los protocolos de Oncotest, animales con tumores de tamaño similar fueron asignados aleatoriamente a cohortes de tratamiento (n=10/grupo) como sigue: DL11f (30 mg), anticuerpo anti-EGFR (30 mg/kg), anti-HER3 (60 mg/kg) y Vehículo (tampón de formulación de DL11f). Los tratamientos fueron administrados por vía intraperitoneal, comenzando

con una dosis de carga 2x (60 ó 120 mg/kg, respectivamente) el día de la asignación aleatoria, y continuando semanalmente por un total de cuatro tratamientos.

DL11f y anti-HER3 inhiben el crecimiento del tumor en el modelo de cáncer de mama MAXF449, mientras que el anticuerpo anti-EGFR no tiene ningún efecto (Figura 25).

Ejemplo 16

Actividad in vivo en el modelo de xenoinjerto de DU145 de próstata

DL11f, un anticuerpo anti-EGFR disponible en el comercio y un anticuerpo anti-HER3 fueron analizados en Piedmont Research Center, Morrisville, de acuerdo con los protocolos de Piedmont. Animales con tumores de tamaño similar fueron asignados aleatoriamente a cohortes de tratamiento (n=10/grupo) como sigue: DL11f (25 mg), anticuerpo anti-EGFR (25 mg/kg), anti-HER3 (50 mg/kg) y Vehículo (tampón de formulación de DL11f). Los tratamientos fueron administrados por vía intraperitoneal, comenzando con una dosis de carga 2x (50 ó 100 mg/kg, respectivamente) el día de la asignación aleatoria, y continuando semanalmente por un total de cuatro tratamientos. DL11f es activo en el modelo de cáncer de próstata DU145, y es más eficaz para inhibir el crecimiento tumoral que un anticuerpo específico anti-EGFR o un anticuerpo específico anti-HER3. (Figura 26).

Ejemplo 17

Actividad in vivo en ratones desnudos portadores de xenoinjertos de cáncer de ovario OVXF550 derivados de un paciente

DL11f, un anticuerpo anti-EGFR disponible en el comercio y un anticuerpo anti-HER3 fueron analizados en Oncotest GmbH, Freiburg, Alemania. Oncotest trasplanta tumores de pacientes, como el cáncer de ovario OVXF550, como xenoinjertos subcutáneos en ratones desnudos, después de un trasplante directo de tumores de pacientes donantes. De acuerdo con los protocolos de Oncotest, animales con tumores de tamaño similar fueron asignados aleatoriamente a cohortes de tratamiento (n=10/grupo) como sigue: DL11f (30 mg), anticuerpo anti-EGFR (30 mg/kg), anticuerpo anti-HER3 (60 mg/kg) y Vehículo (tampón de formulación de DL11f). Los tratamientos fueron administrados por vía

intraperitoneal, comenzando con una dosis de carga 2x (60 ó 120 mg/kg, respectivamente) el día de la asignación aleatoria, y continuando semanalmente por un total de cinco tratamientos.

DL11f es activo en el modelo de cáncer de ovario OVXF550. (Figura 27).

Ejemplo 18

DL11f media en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) in vitro e in vivo

DL11f media en la ADCC *in vitro*. Células A431, H292 (ATCC CRL-1848, Manassas, Va.), FaDu, BxPC3 y MDA 468 (ATCC HTB-132, Manassas, Va.) (todas de ATCC) fueron sembradas en placas de 96 pocillos en presencia de concentraciones indicadas de anticuerpos. Después de una pre-incubación por 30 minutos a 37°C, se añadieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas y la incubación continuó por 4 horas más a 37°C. Después de 4 horas, las placas fueron centrifugadas y los sobrenadantes fueron cosechados. La actividad de LDH en los sobrenadantes fue determinada de acuerdo con el procedimiento homogéneo de análisis de integridad de la membrana CytoTox-One de Promega. Para determinar el porcentaje de citotoxicidad mediada por células, se calculó la absorbancia promedio y se le restó el fondo. Como se ve en la Figura 28, DL11f mitiga la ADCC en líneas celulares que expresan EGFR de una manera dependiente de la dosis.

Una sustitución de amino ácido de N297A fue introducida en DL11f para eliminar la función efectora. N297 es necesario para la unión a FcR γ y/o al complemento. DL11f-N297A exhibe una falta de ADCC *in vitro*. Como se esperaba, la función inhibidora del crecimiento de DL11f *in vitro* no es afectada por la mutación. (Figura 29).

DL11f y DL11f-N297A fueron probados en ratones con tumores establecidos derivados de la línea celular H292 de NSCLC (ATCC CRL-1848, Manassas, Va.). 5×10^6 células A431 fueron inoculadas por vía subcutánea en ratones CB17-SCID. Animales con tumores de tamaño similar fueron asignados aleatoriamente a cohortes de tratamiento (n=10/grupo) como sigue: Vehículo (tampón de formulación de DL11f), DL11f (6 mg/kg) y DL11f-N297A (6 mg/kg). Los tratamientos fueron administrados una vez por vía intraperitoneal el día de la asignación aleatoria. Los tumores se midieron con calibres dos veces a la semana

por el periodo de duración del estudio. Inicialmente, DL11f y DL11f N297A inhibieron el crecimiento del tumor en forma equivalente, inhibiendo la señalización de la ruta de HER. Pero a medida que las dosis disminuían, DL11f exhibió una actividad antitumoral prolongada en comparación con DL11f N297A, debido a su capacidad para ADCC. (Figura 30).

Ejemplo 19

DL11f es menos tóxico que cetuximab en monos cinomolgos

Se efectuó un estudio para determinar la toxicidad relativa de DL11f y cetuximab. Monos cinomolgos fueron asignados a tres grupos y tratados ya sea con DL11f o con cetuximab (Capital Wholesale Drug, Columbus, OH) una vez a la semana por seis semanas, como sigue:

Grupo 1: Cetuximab 25 mg/kg;

Grupo 2: DL11f 25 mg/kg;

Grupo 3: DL11f 12,5 mg/kg.

Los 3 animales tratados con cetuximab desarrollaron lesiones cutáneas entre la tercera y la cuarta dosis, lo que indica toxicidad. Este resultado era esperado en base a estudios previos en cinomolgos efectuados durante la aprobación del cetuximab por la FDA. Ninguno de los animales tratados con DL11f mostró signos de toxicidad en este punto del estudio.

Uno de los animales que recibió la dosis de 25 mg/kg de DL11f desarrolló una lesión cutánea una semana después de la sexta dosis. Esta lesión medía aproximadamente 4 cm x 7 cm y era muy leve y limitada a un área más pequeña, en comparación con las lesiones observadas en los animales tratados con cetuximab.

En base al análisis de los parámetros toxicocinéticos en este estudio toxicológico, las exposiciones de cetuximab y DL11f fueron similares en los animales tratados con 25 mg/kg de cada compuesto de prueba.

Se efectuó un segundo estudio a mayor escala bajo las siguientes condiciones.

Monos cinomolgos fueron asignados a seis grupos y tratados, por administración intravenosa, ya sea con DL11f o con un vehículo de control una vez a la semana por doce semanas, como sigue:

Grupo 1:	10 monos (5 machos/5 hembras)	Vehículo de control
Grupo 2:	10 monos (5 machos/5 hembras)	DL11f 5 mg/kg
Grupo 3:	10 monos (5 machos/5 hembras)	DL11f 15 mg/kg
Grupo 4:	10 monos (5 machos/5 hembras)	DL11f 30 mg/kg
Grupo 5:	4 monos (2 machos/2 hembras)	Vehículo de control
Grupo 6:	4 monos (2 machos/2 hembras)	DL11f 30 mg/kg

Ninguno de los animales exhibió toxicidades cutáneas aparentes durante el estudio ni durante el período de recuperación después de la dosificación final con DL11f.

También se efectuó un estudio PK de una sola dosis por administración IV en monos cinomolgos. En este estudio, 3 monos por grupo fueron tratados por vía intravenosa con 1, 10 ó 30 mg/kg de DL11f. La PK a través del rango de dosis explorado fue no lineal, consistente con una eliminación saturable como se ha visto con otros anticuerpos direccionados hacia EGFR.

Todas las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones de solicitudes de patentes y otras publicaciones citadas o mencionadas en esta memoria están expresamente incorporadas aquí por referencia en su totalidad, en la misma medida que si se indicara específica e individualmente que cada patente, solicitud de patente, publicación de solicitud de patente o publicación independiente está incorporada por referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo multiespecífico CARACTERIZADO porque comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde la toxicidad del anticuerpo es menor que la toxicidad de un antagonista de EGFR.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la toxicidad es toxicidad dermatológica.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el antagonista de EGFR es cetuximab.
4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el anticuerpo inhibe una actividad biológica de al menos uno de EGFR y HER3.
5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque el anticuerpo inhibe la unión de EGF a EGFR.
6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque el anticuerpo inhibe la fosforilación de EGFR inducida por TGF- α .
7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el anticuerpo inhibe el crecimiento de las células tumorales.
8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el anticuerpo se une al Dominio III de EGFR.
9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el anticuerpo se une a EGFR y a HER3 con una Kd de menos de 10^{-6} M.

10. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, CARACTERIZADO porque el anticuerpo se une a EGFR con una K_d de menos de 10^{-6} M y se une a HER3 con una K_d de menos de 10^{-7} M.

11. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el anticuerpo comprende:

(a) HVR-H1 que comprende la secuencia de amino ácidos de LSGDWIH (SEQ ID NO: 48);

(b) HVR-H2 que comprende la secuencia de amino ácidos de VGEISAAGGYTD (SEQ ID NO: 51); y

(c) HVR-H3 que comprende la secuencia de amino ácidos de ARESRVSFEEAAMDY (SEQ ID NO: 53); y

(d) HVR-L1 que comprende la secuencia de amino ácidos de NIATDVA (SEQ ID NO: 55);

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de amino ácidos de SASF (SEQ ID NO: 56); y

(f) HVR-L3 que comprende la secuencia de amino ácidos de SEPEPYT (SEQ ID NO: 57).

12. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque comprende:

(a) un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 30;

(b) un dominio variable de cadena liviana que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29; o

(c) un dominio variable de cadena pesada como en (a) y un dominio variable de cadena liviana como en (b).

13. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, CARACTERIZADO porque comprende un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 30.

14. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, CARACTERIZADO porque comprende una secuencia de dominio variable de cadena liviana de SEQ ID NO: 29.

15. Un anticuerpo multiespecífico CARACTERIZADO porque comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 30 y una secuencia de dominio variable de cadena liviana de SEQ ID NO: 29.

16. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 de longitud completa.

17. Ácido nucleico aislado CARACTERIZADO porque codifica el anticuerpo de la reivindicación 1.

18. Una célula huésped CARACTERIZADA porque comprende el ácido nucleico de la reivindicación 17.

19. Un anticuerpo multiespecífico CARACTERIZADO porque comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende:

(a) HVR-H1 que comprende la secuencia de amino ácidos de LSGDWIH (SEQ ID NO: 48);

(b) HVR-H2 que comprende la secuencia de amino ácidos de VGEISAAGGYTD (SEQ ID NO: 51); y

(c) HVR-H3 que comprende la secuencia de amino ácidos de ARESRVSFEEAMDY (SEQ ID NO: 53); y

(d) HVR-L1 que comprende la secuencia de amino ácidos de NIATDVA (SEQ ID NO: 55);

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de amino ácidos de SASF (SEQ ID NO: 56); y

(f) HVR-L3 que comprende la secuencia de amino ácidos de SEPEPYT (SEQ ID NO: 57).

20. Un anticuerpo multiespecífico CARACTERIZADO porque comprende un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR y a HER3, donde el anticuerpo comprende:

(a) un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 30;

(b) un dominio variable de cadena liviana que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 29; o

(c) un dominio variable de cadena pesada como en (a) y un dominio variable de cadena liviana como en (b).

21. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 20, CARACTERIZADO porque comprende un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 30.

22. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 20, CARACTERIZADO porque comprende una secuencia de dominio variable de cadena liviana de SEQ ID NO: 29.

23. Un método para producir un anticuerpo, CARACTERIZADO porque comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 18 de manera que el anticuerpo sea producido.

24. Un inmunoconjugado CARACTERIZADO porque comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 y un agente citotóxico.

25. Una formulación farmacéutica CARACTERIZADA porque comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

26. Un método para tratar a un individuo que tiene cáncer, CARACTERIZADO porque comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo de la reivindicación 1.

27. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 26, CARACTERIZADO porque el cáncer comprende células que expresan EGFR y HER3.

28. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 26, CARACTERIZADO porque el cáncer es seleccionado del grupo consistente en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata y cáncer de pulmón de células no pequeñas.

29. Un método para inhibir una actividad biológica de un receptor HER en un individuo, CARACTERIZADO porque comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo de la reivindicación 1 para inhibir una actividad biológica de un receptor HER.

30. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque se usa como un medicamento.

31. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque se usa para tratar un cáncer.

32. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 31, CARACTERIZADO porque el cáncer es cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata o cáncer de pulmón de células no pequeñas.

33. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque se usa para inhibir una actividad biológica de un receptor HER.

34. Uso del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque sirve para preparar un medicamento.

35. El uso de acuerdo con la reivindicación 34, CARACTERIZADO porque el medicamento es para el tratamiento del cáncer.

36. El uso de acuerdo con la reivindicación 35, CARACTERIZADO porque el cáncer es cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata o cáncer de pulmón de células no pequeñas.

37. El uso de acuerdo con la reivindicación 34, CARACTERIZADO porque el medicamento es para inhibir la actividad biológica de un receptor HER.

RESUMEN

La invención proporciona anticuerpos anti-HER, incluyendo anticuerpos anti-HER multiespecíficos, composiciones que los comprenden y métodos para usar estos anticuerpos. También se proporcionan aquí anticuerpos multiespecíficos contra EGFR/HER3 que son menos tóxicos que los antagonistas de EGFR tradicionales.

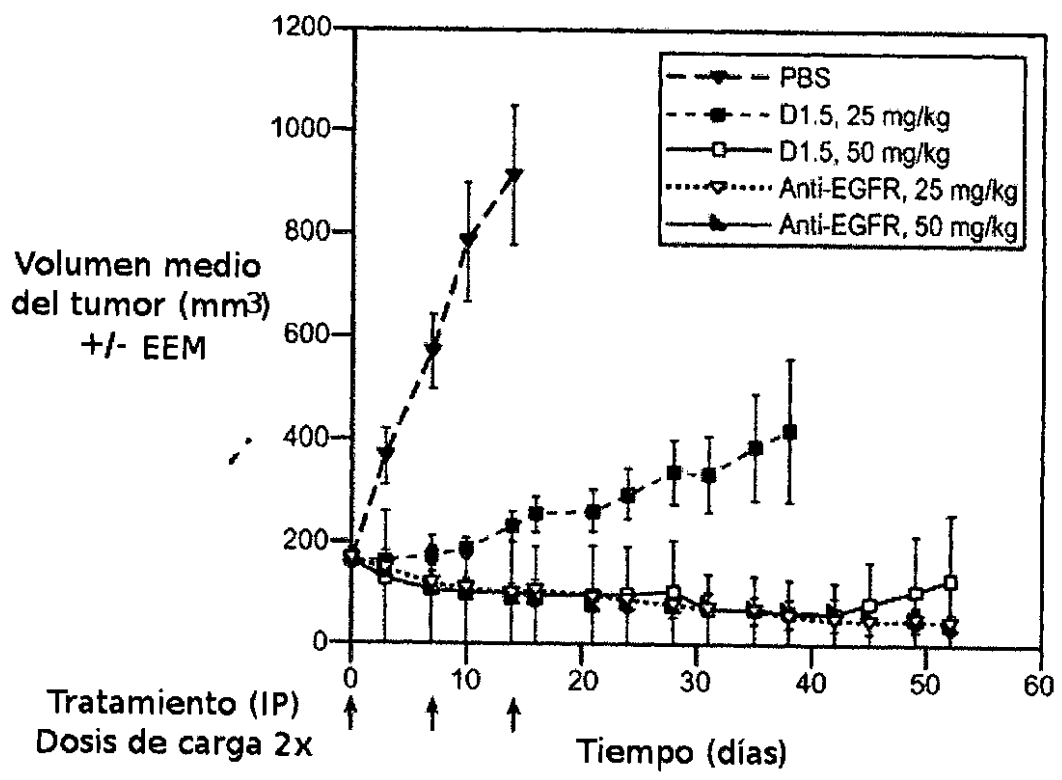
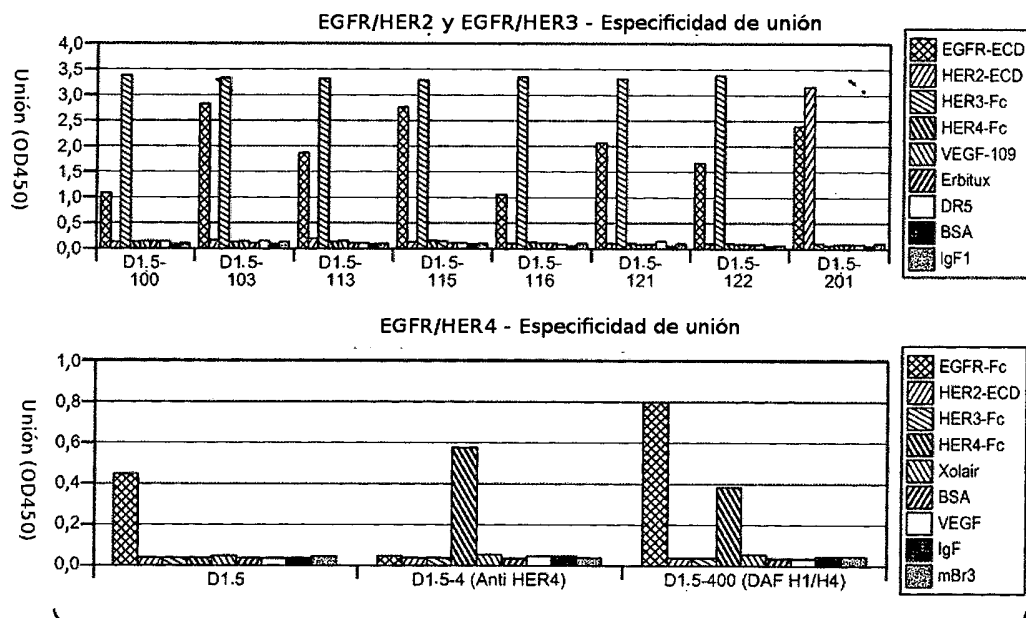


FIG. 1



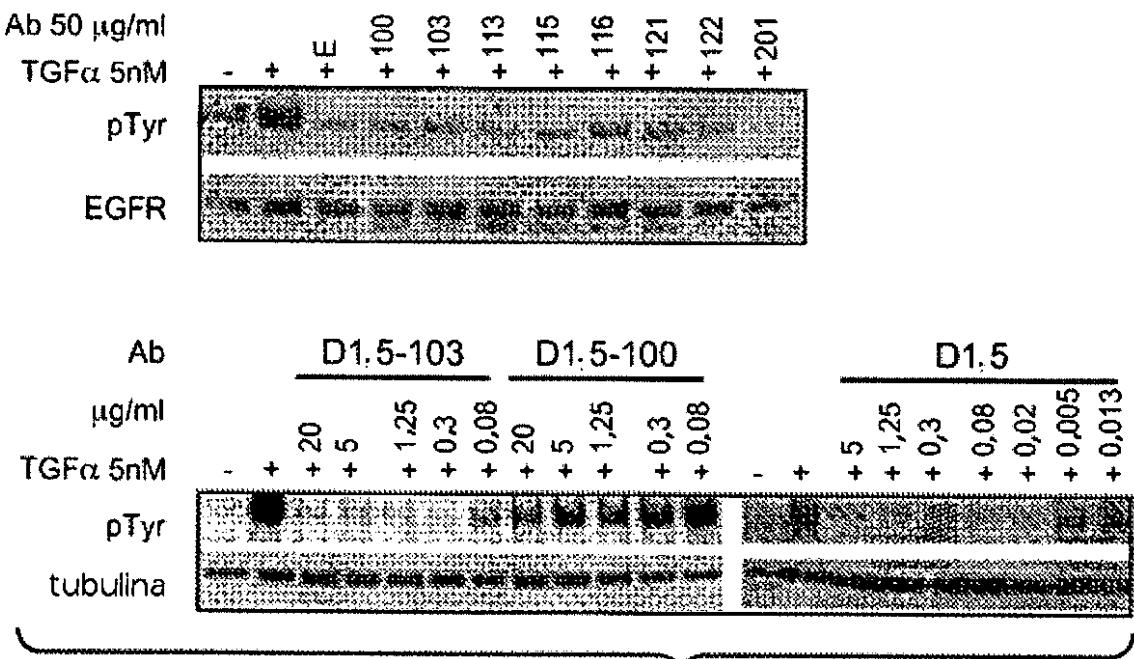


FIG. 3

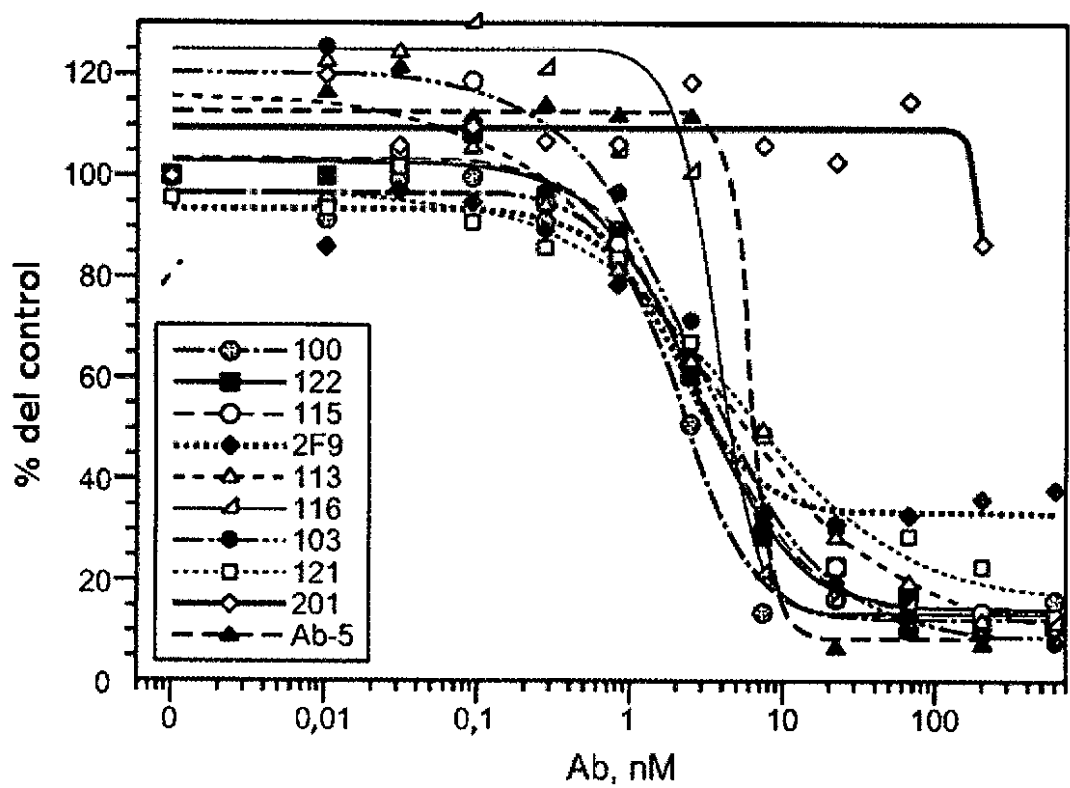


FIG. 4

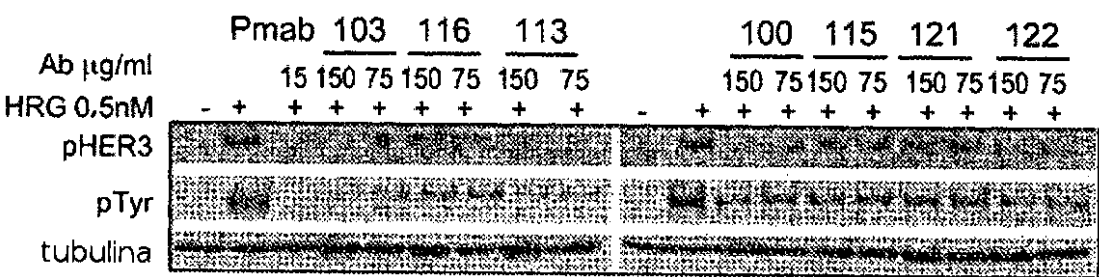


FIG. 5

5 / 29

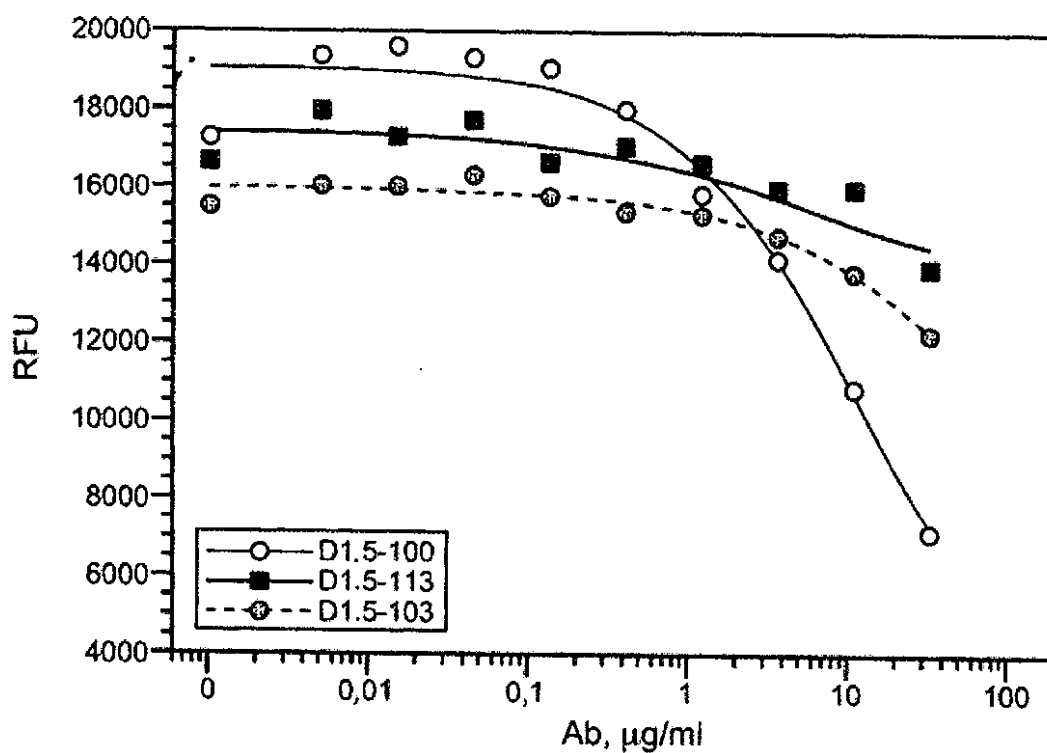
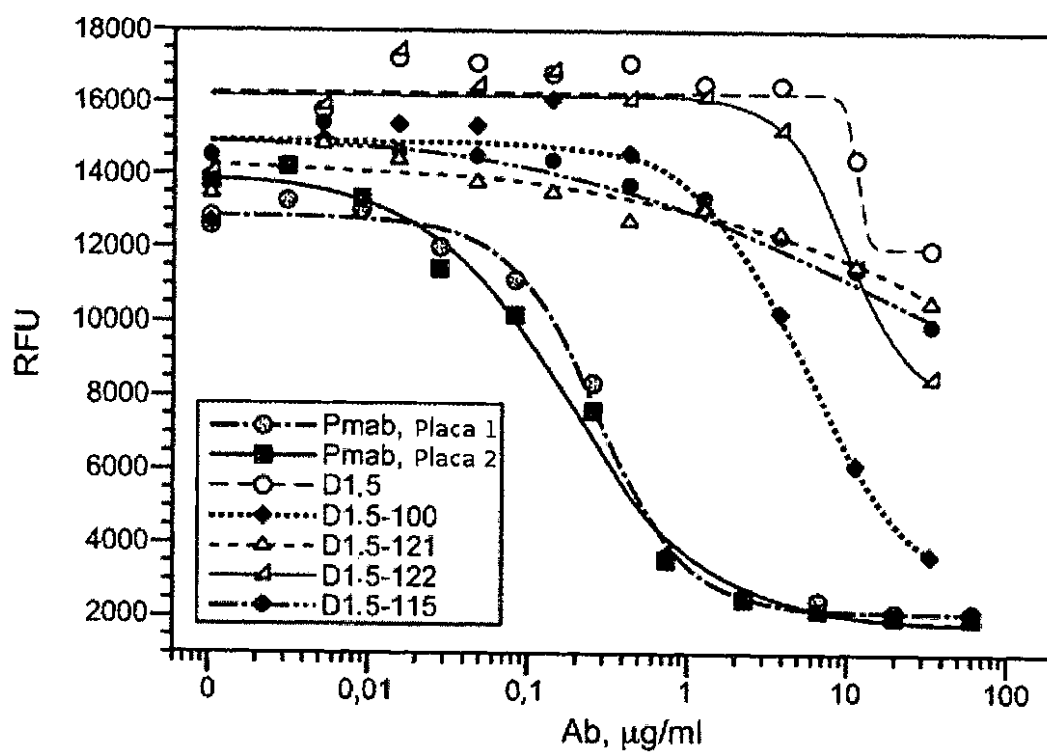


FIG. 6

6 / 29

EGFR
"Cadena pesada domina"

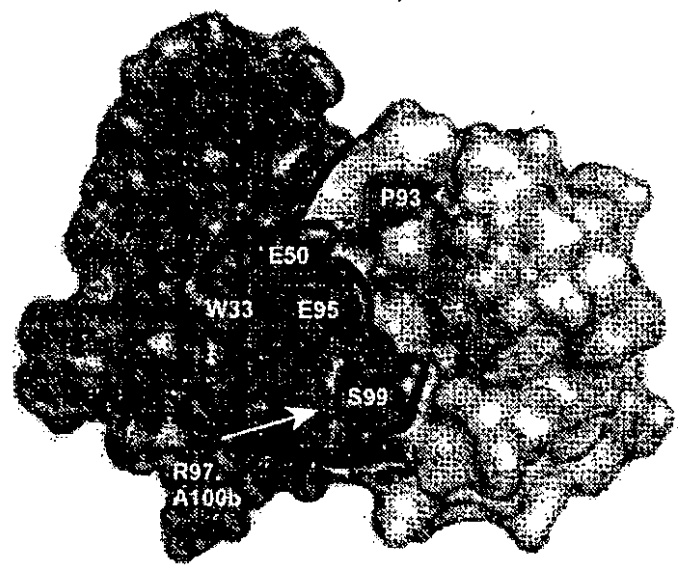
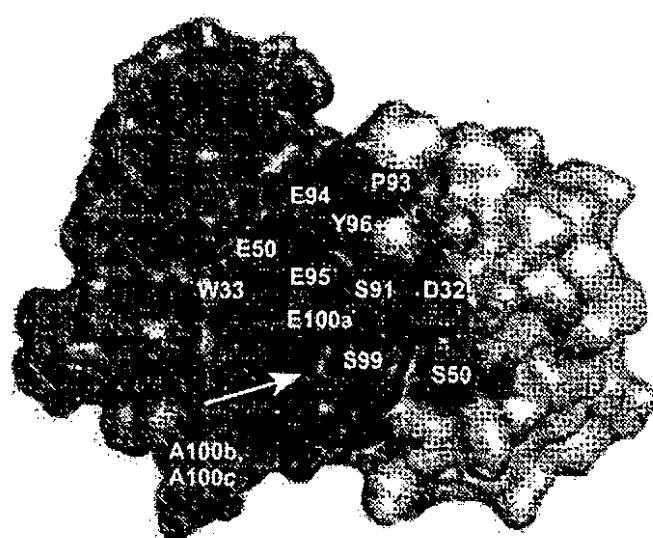


FIG. 7

Cadena pesada

Cadena liviana

HER3
"Las cadenas pesada y liviana trabajan juntas"



Estrategia de maduración de la afinidad del anticuerpo

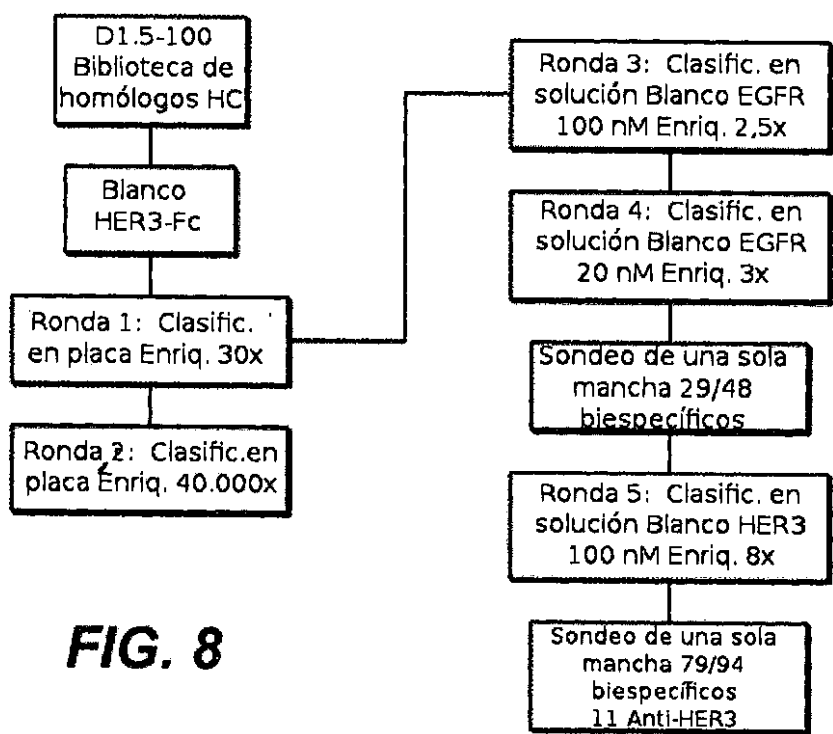


FIG. 8

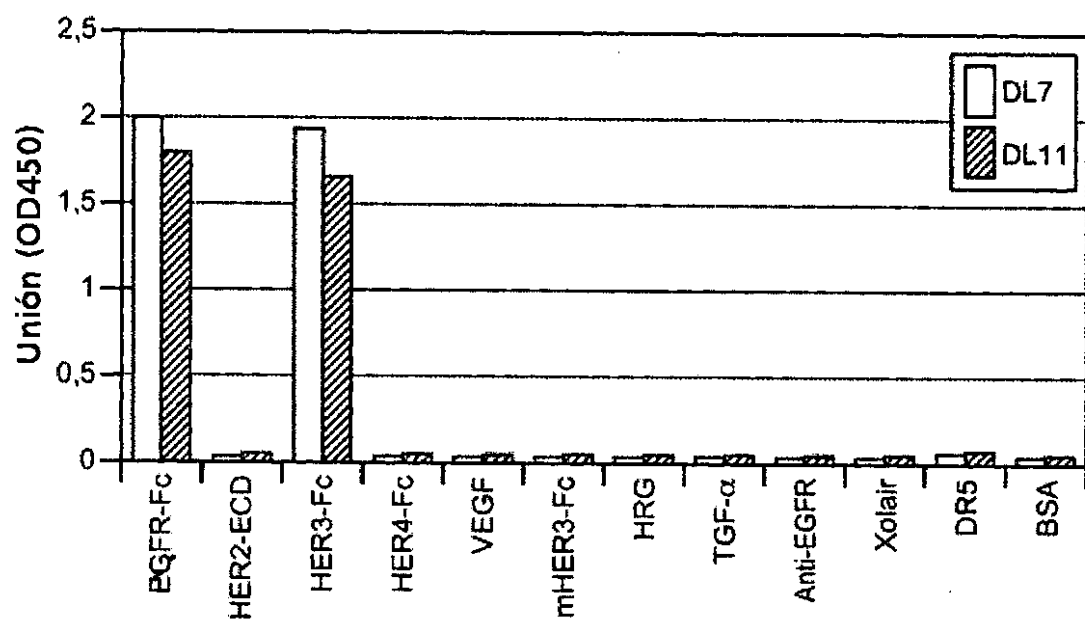


FIG. 9

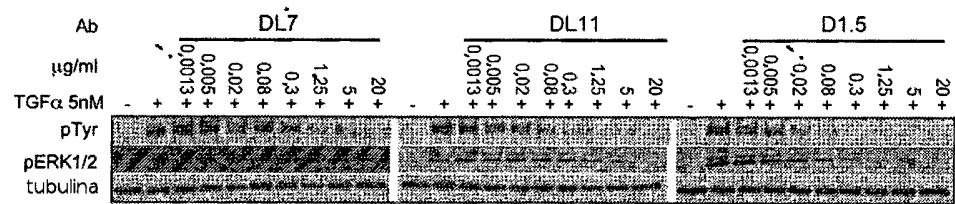


FIG. 10A

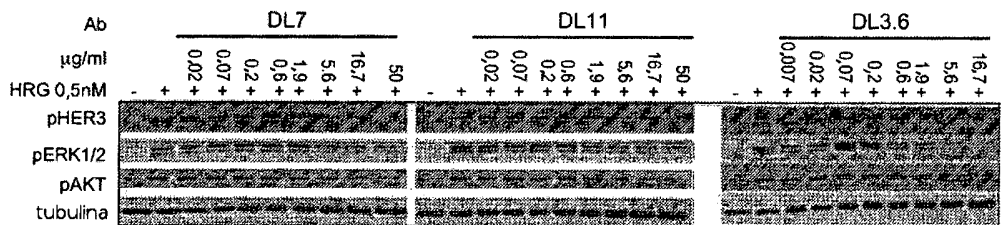


FIG. 10B

9 / 29

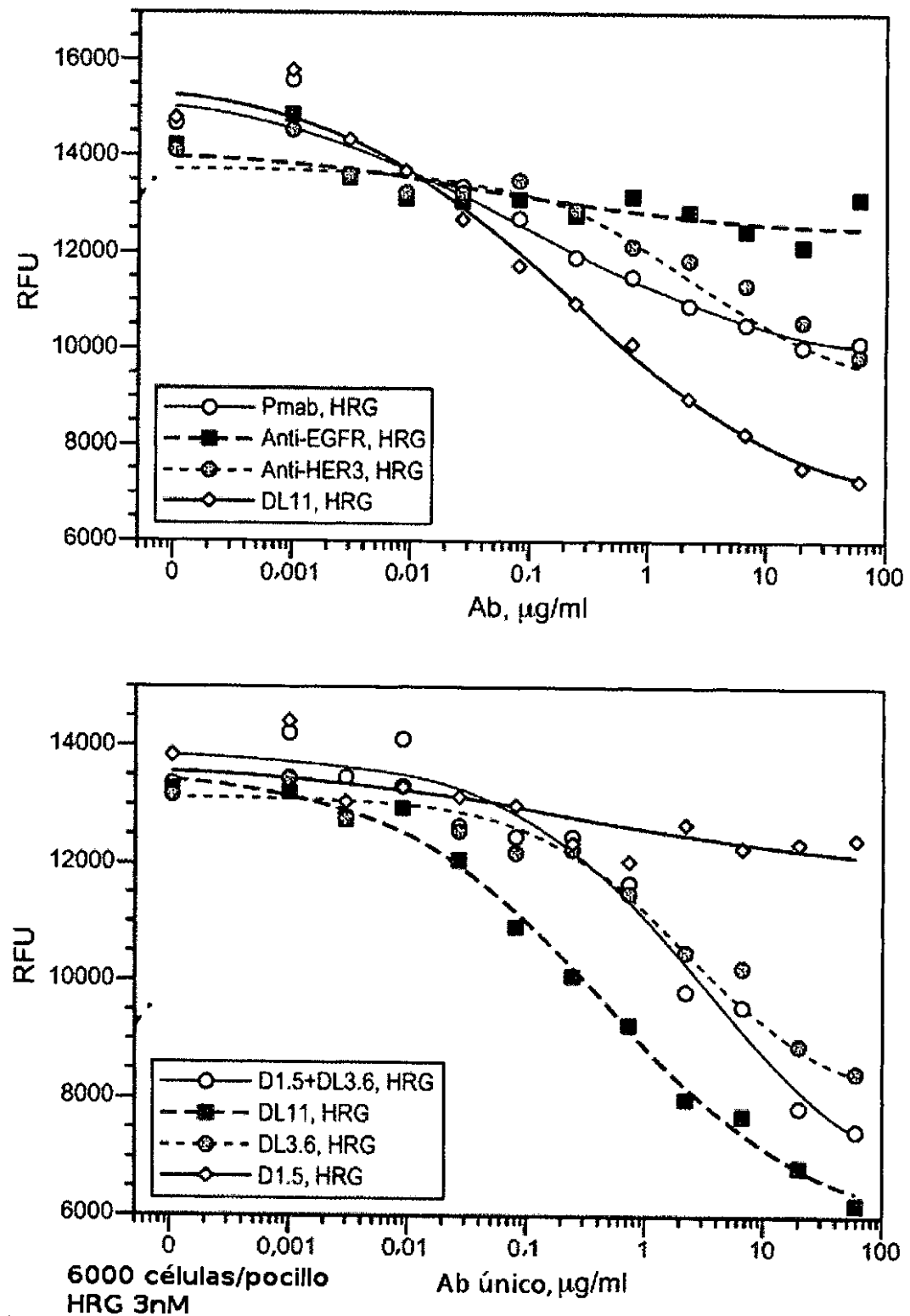


FIG. 11A

10 / 29

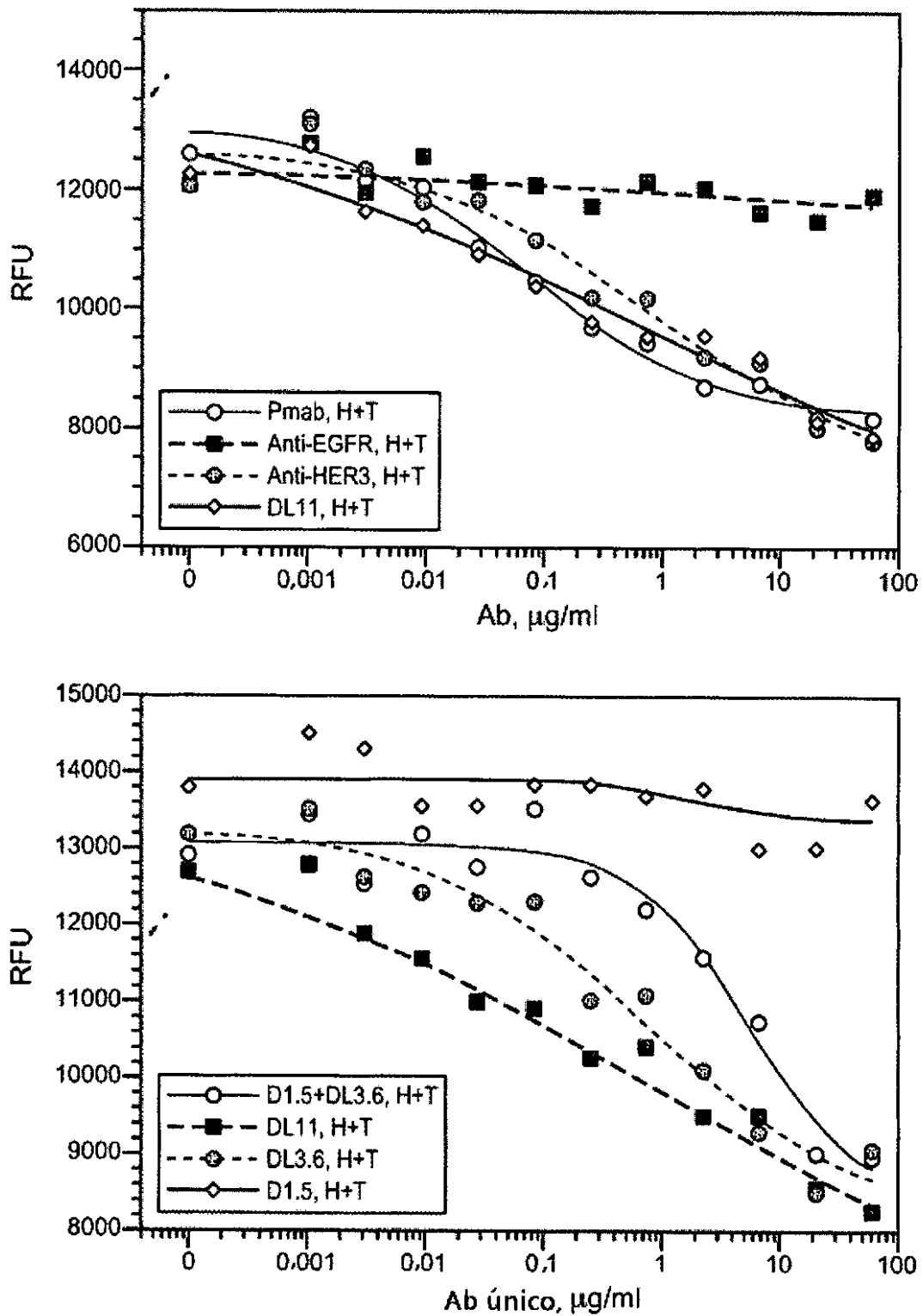
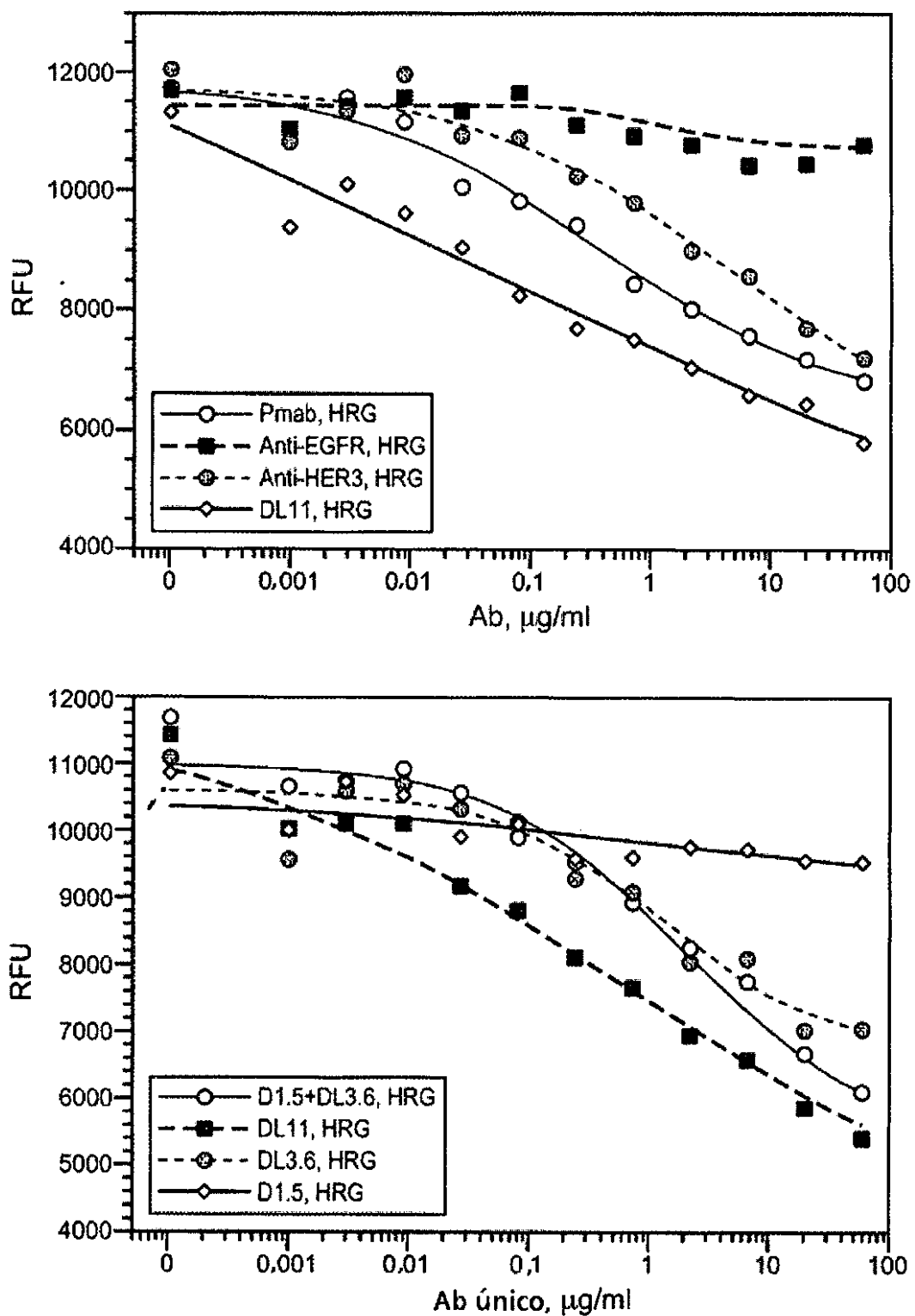


FIG. 11B

11 / 29

**FIG. 12A**

12 / 29

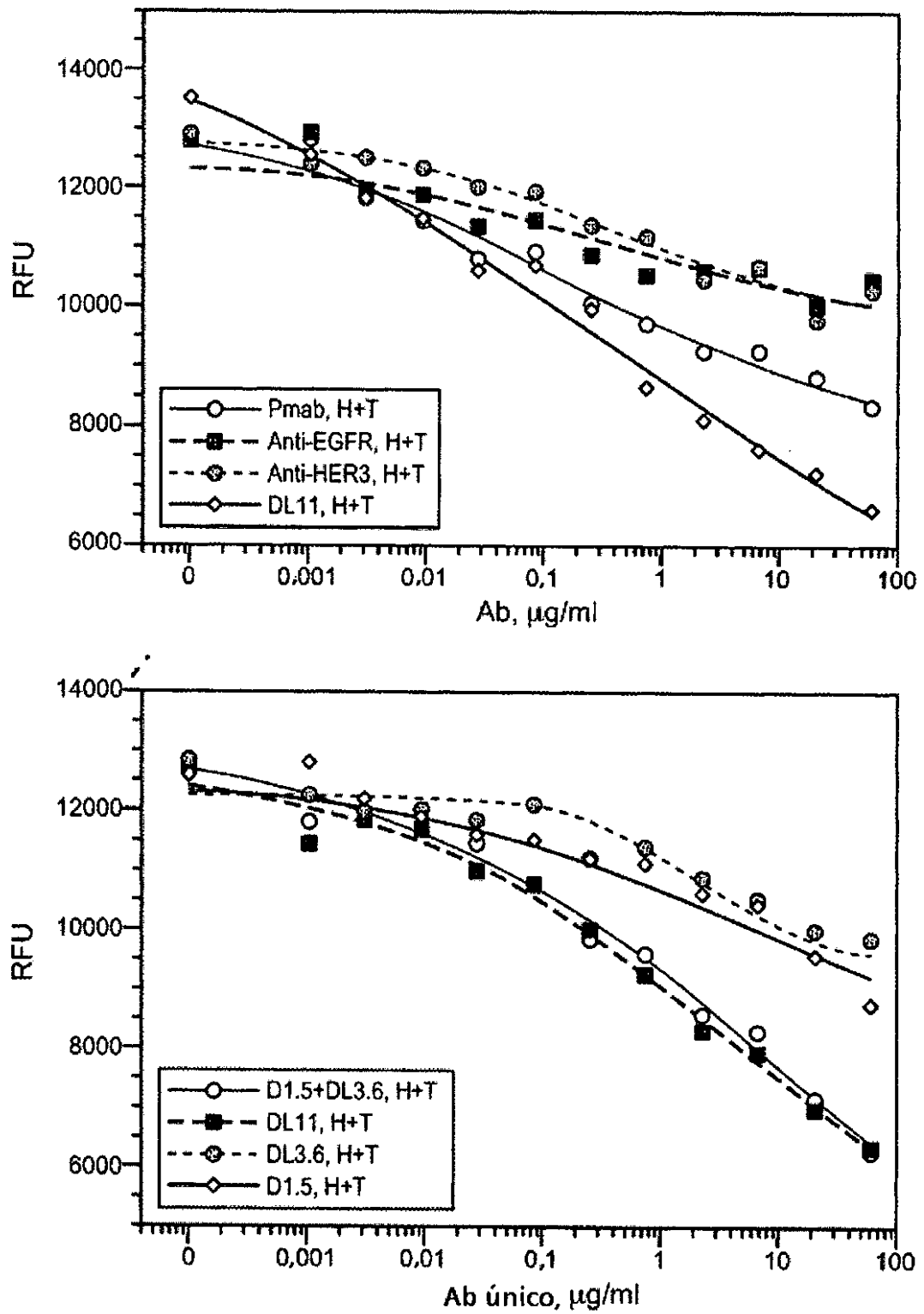


FIG. 12B

13 / 29

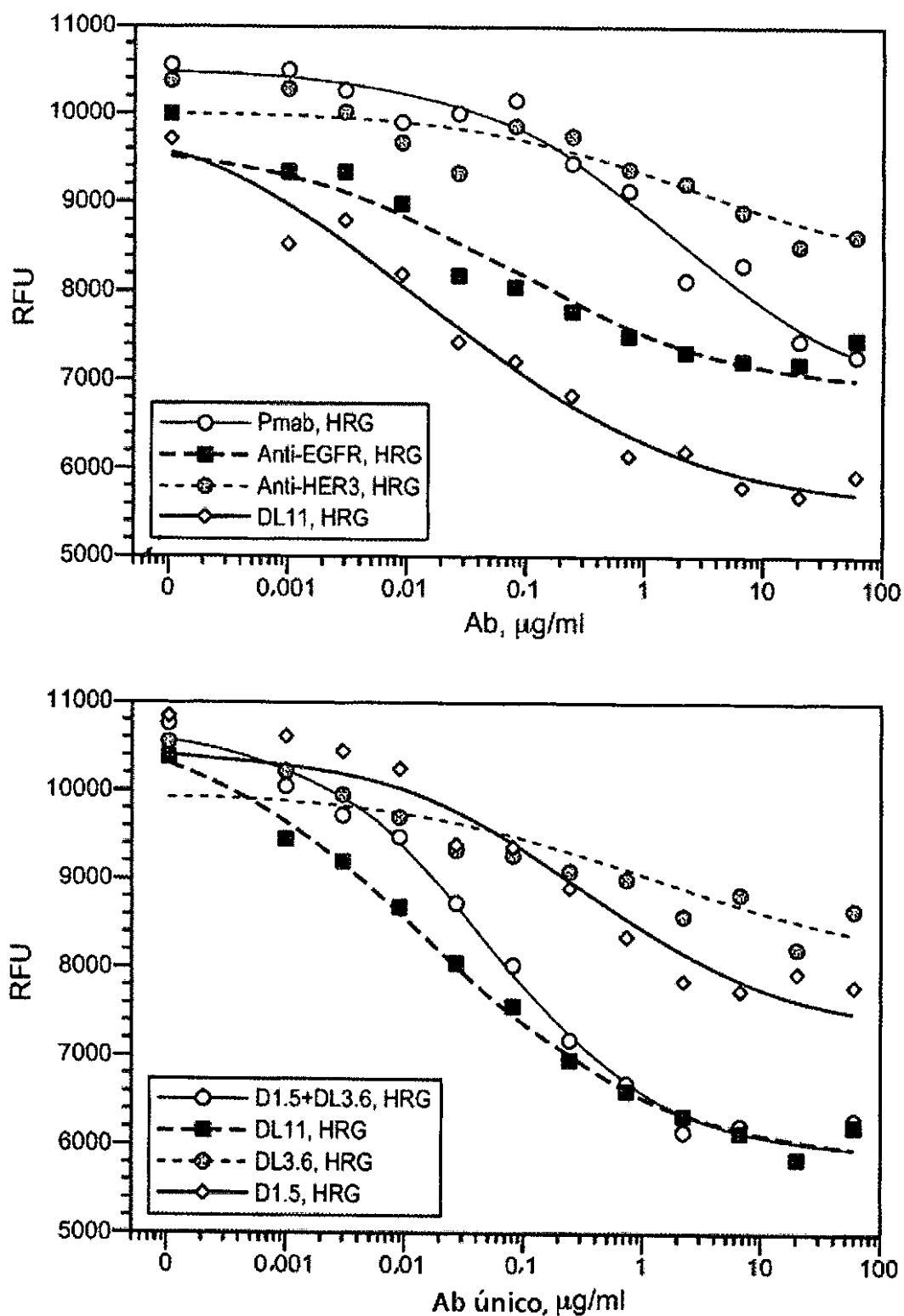


FIG. 13

14 / 29
Estrategia de maduración de la afinidad de anticuerpos D1.5-201 biespecíficos contra EGFR-HER2

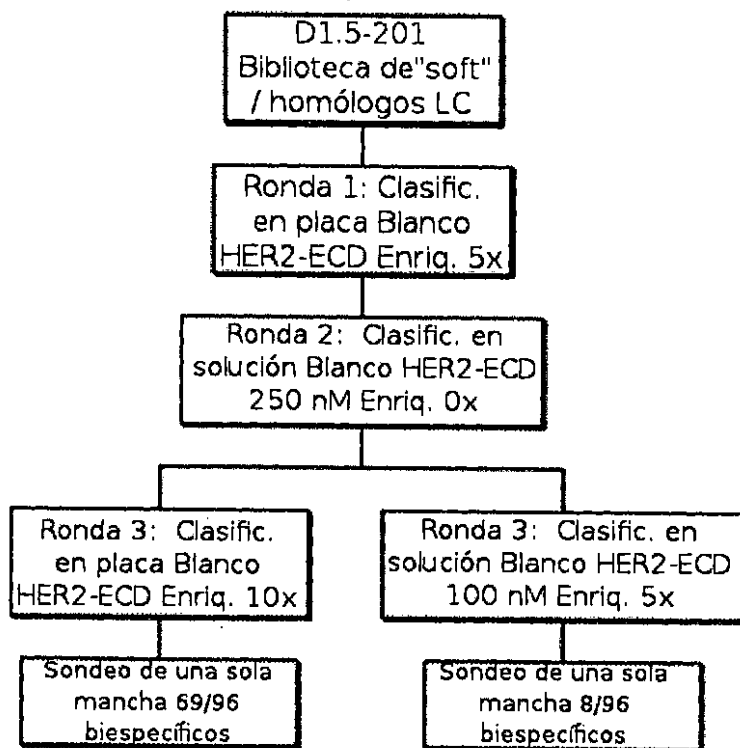


FIG. 14

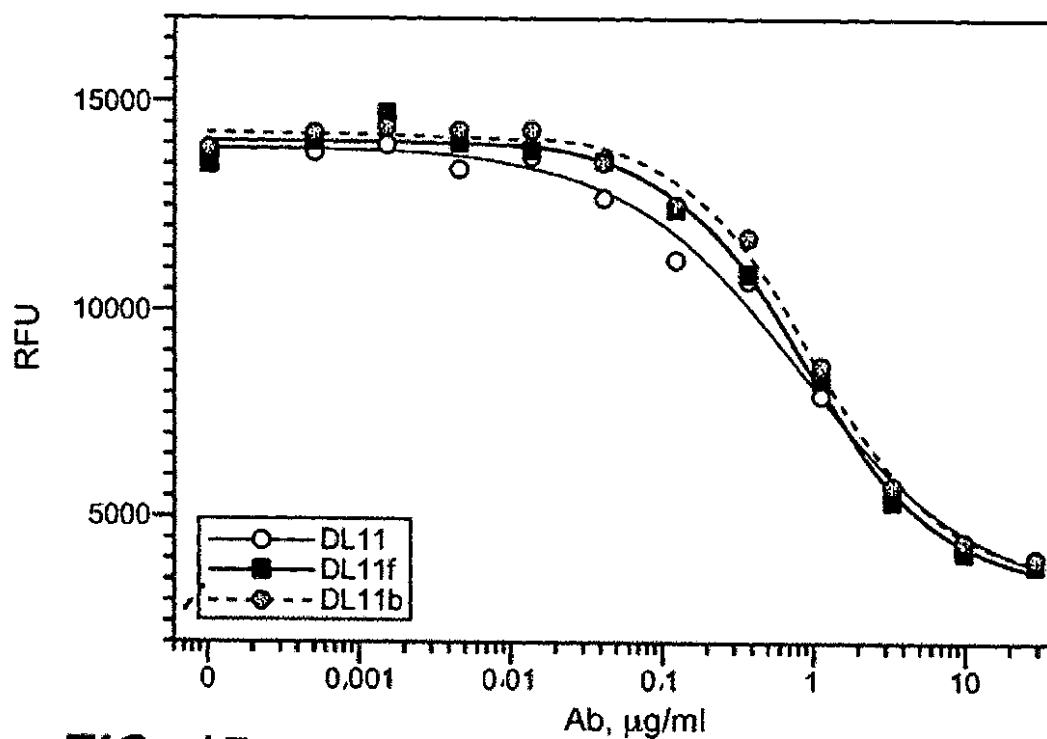


FIG. 15

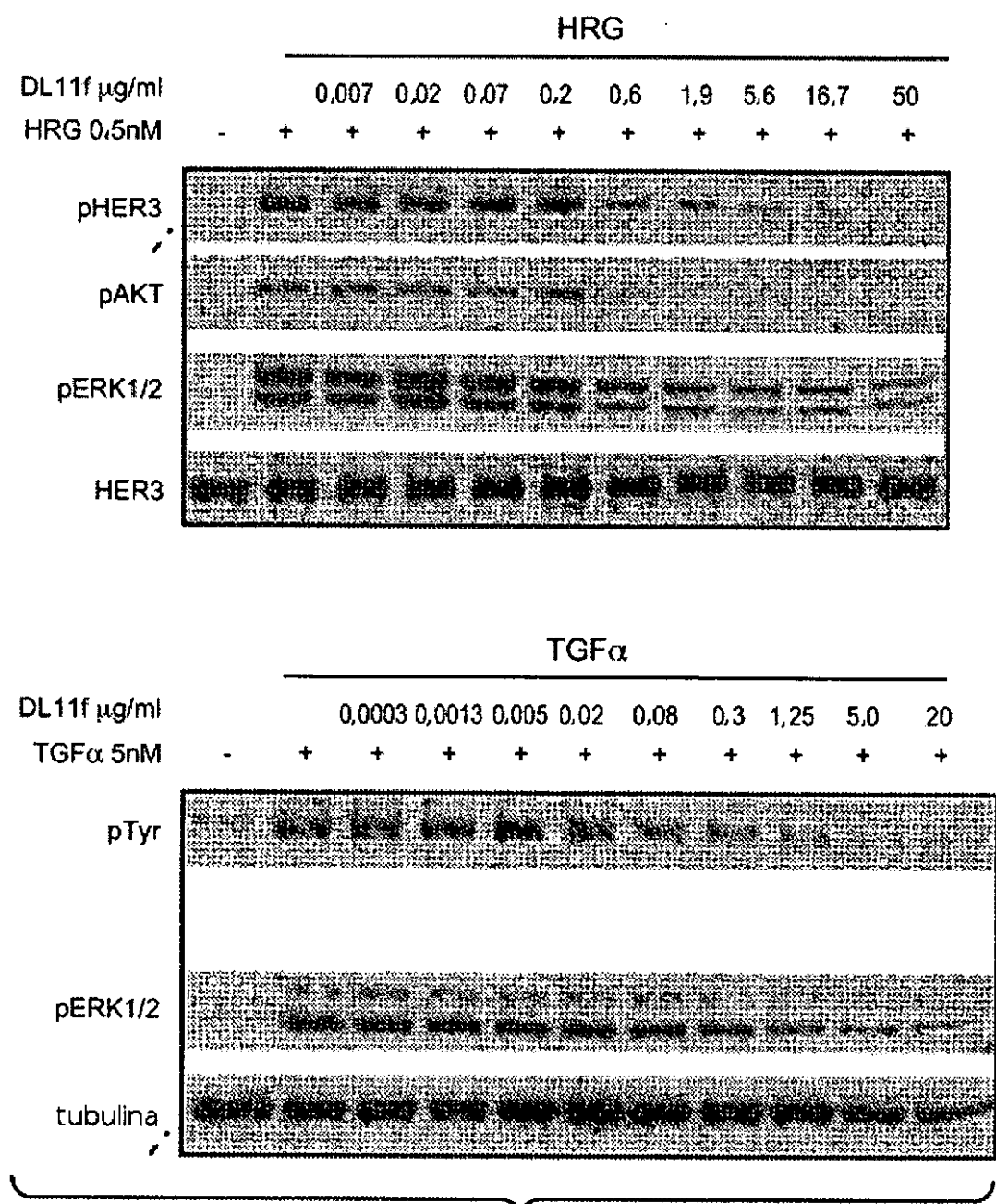


FIG. 16

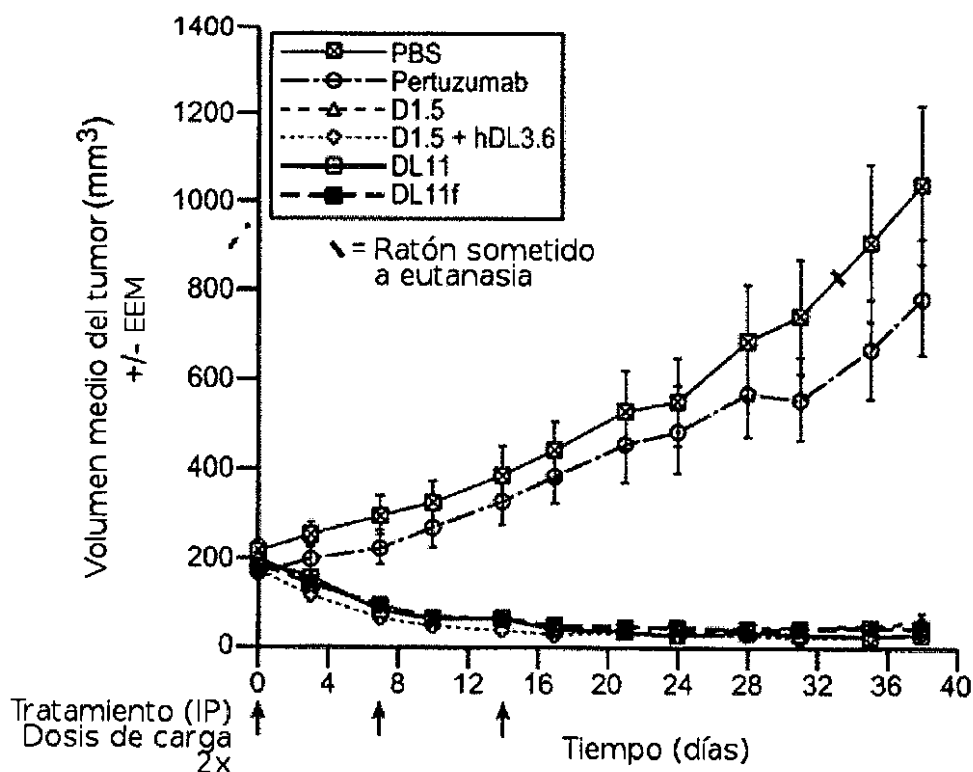


FIG. 17

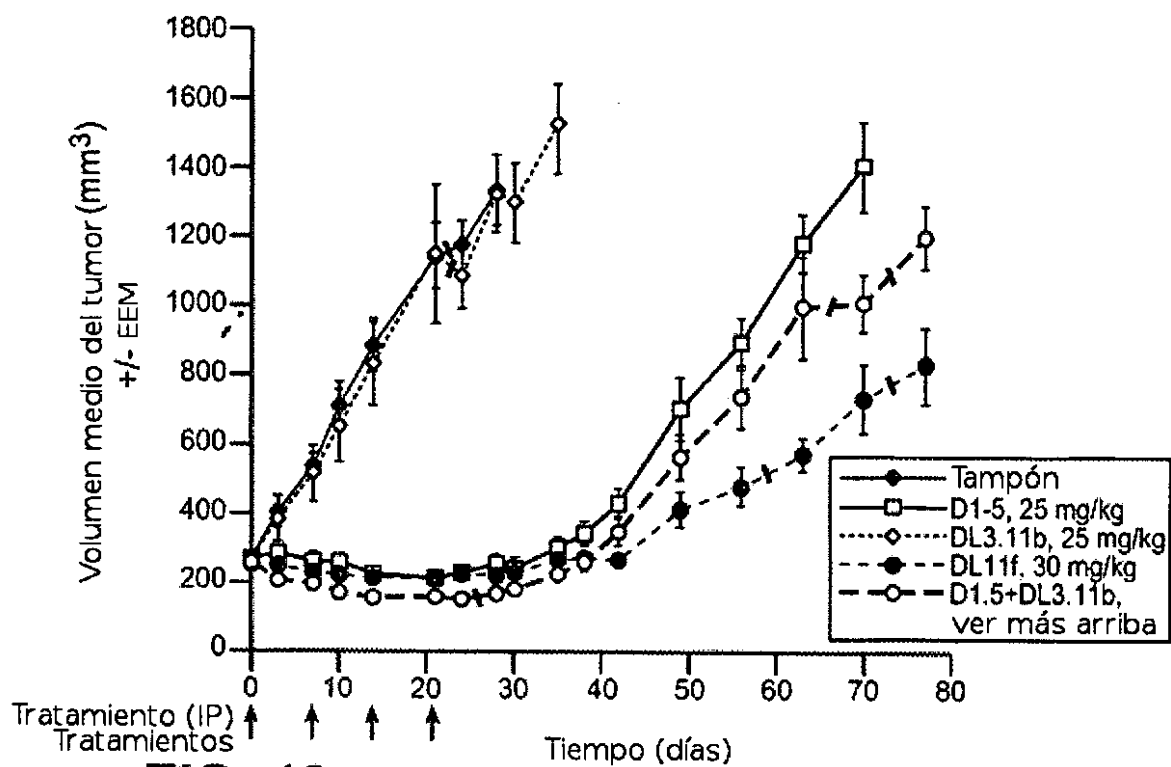


FIG. 18

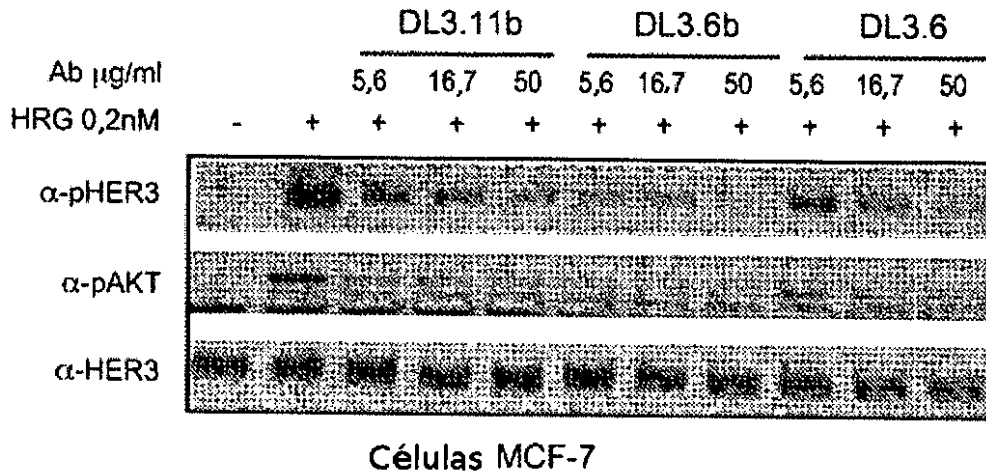


FIG. 19

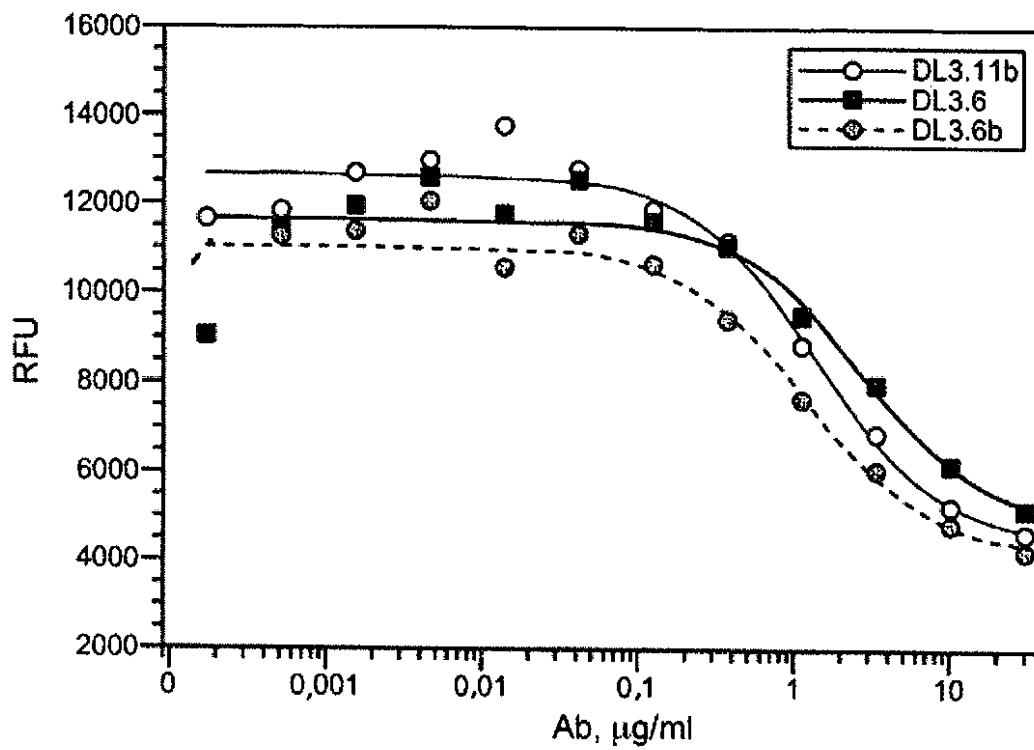


FIG. 20

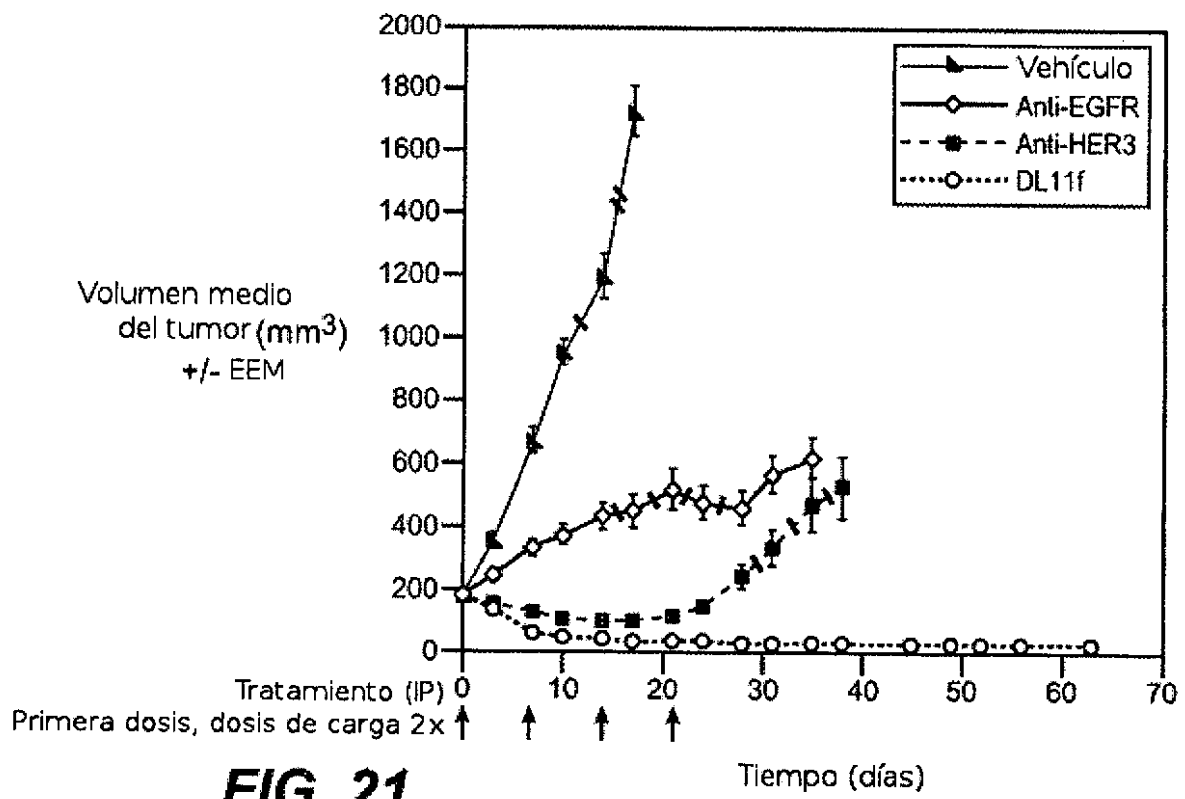


FIG. 21

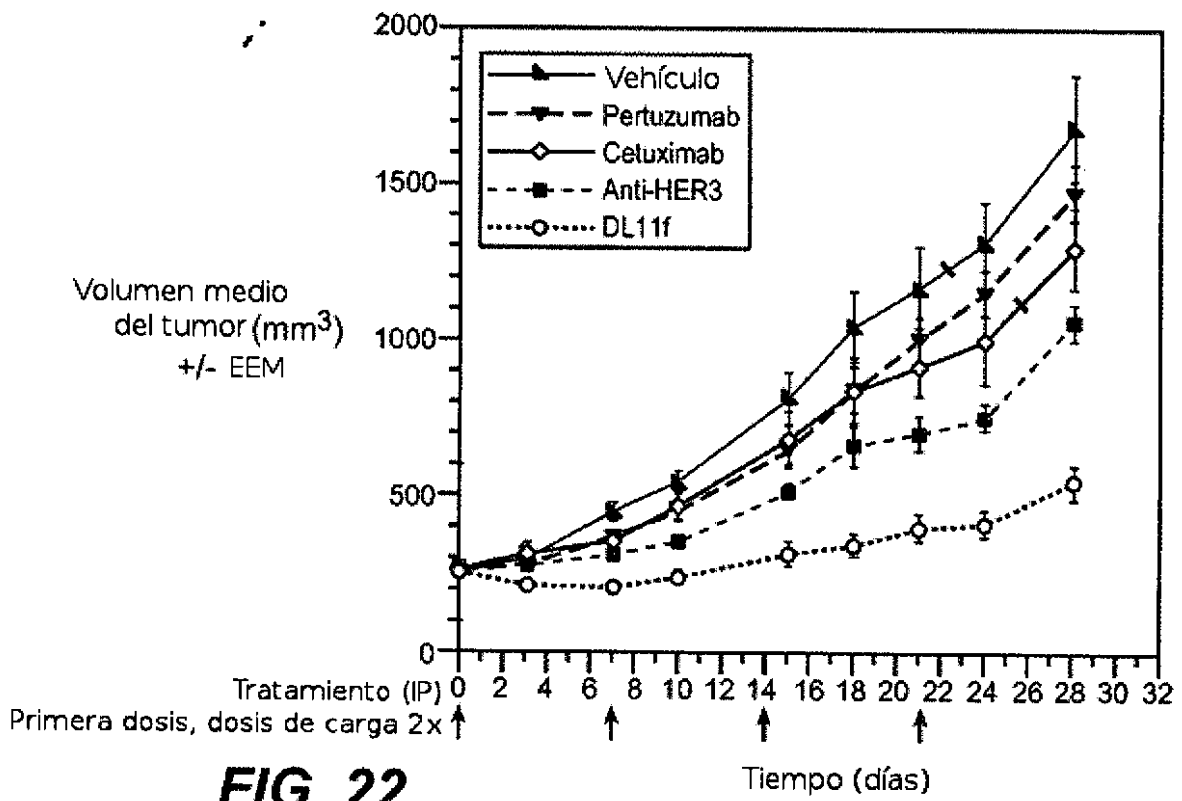
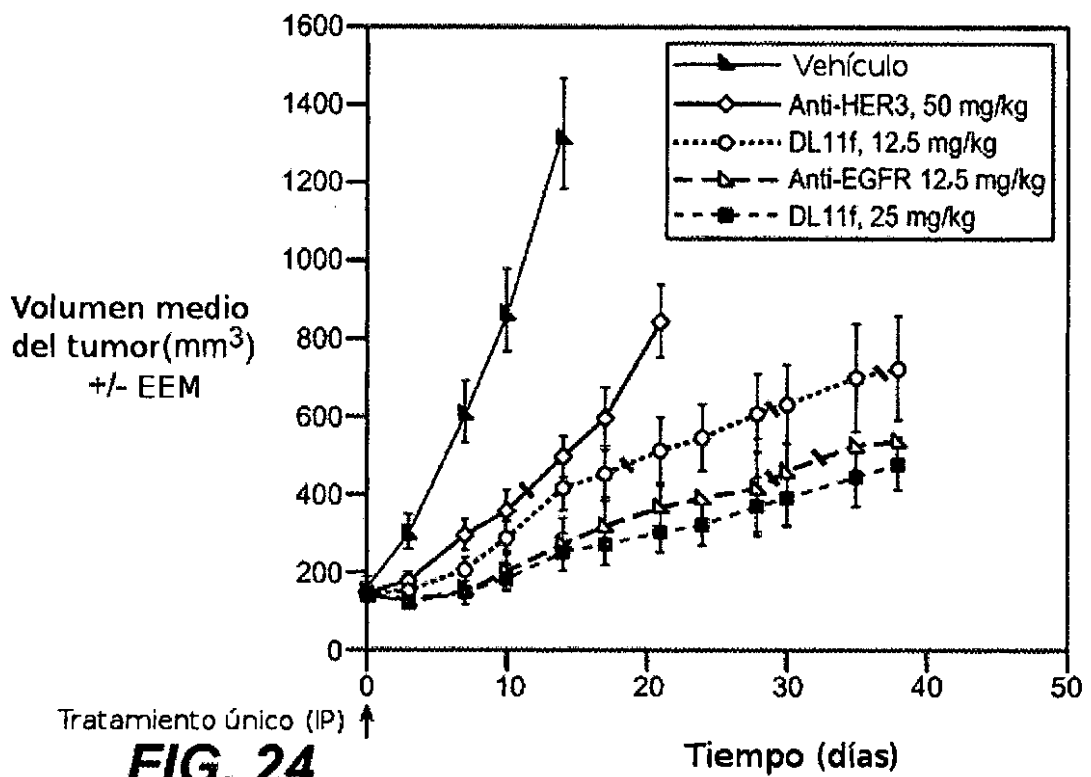
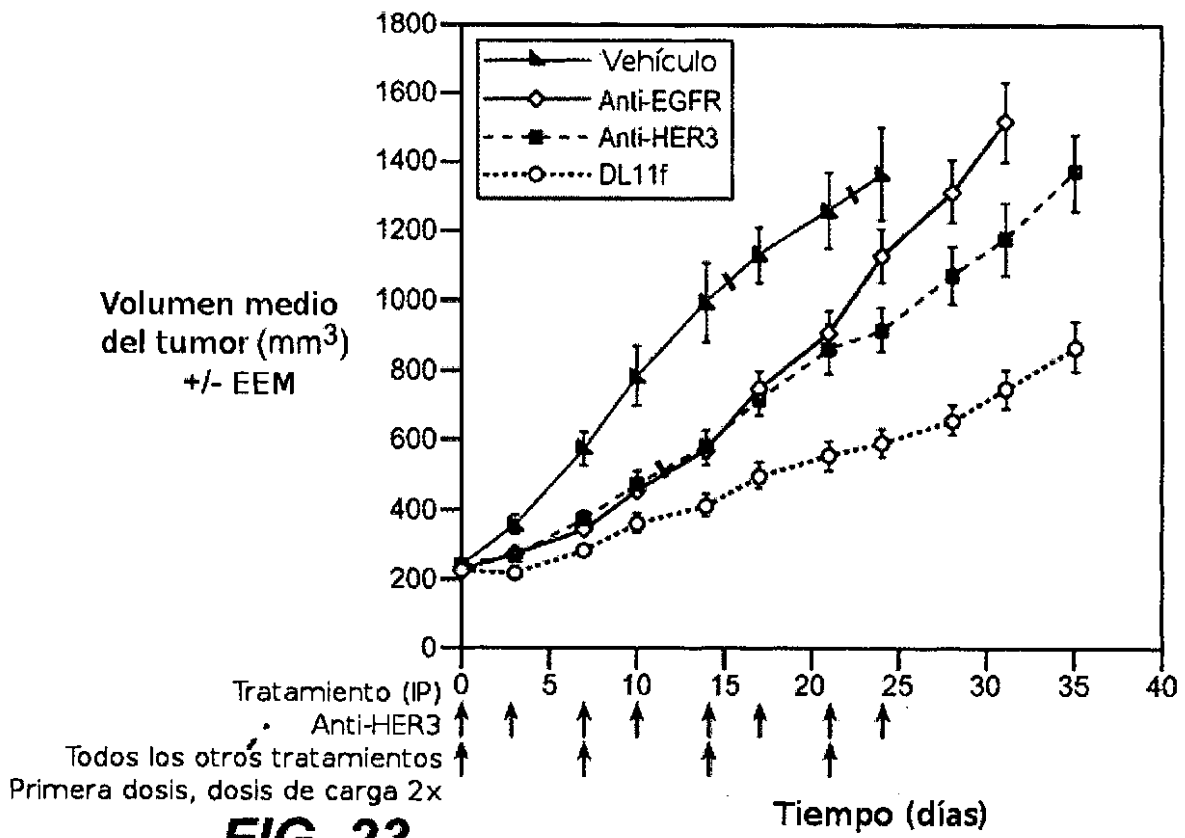


FIG. 22



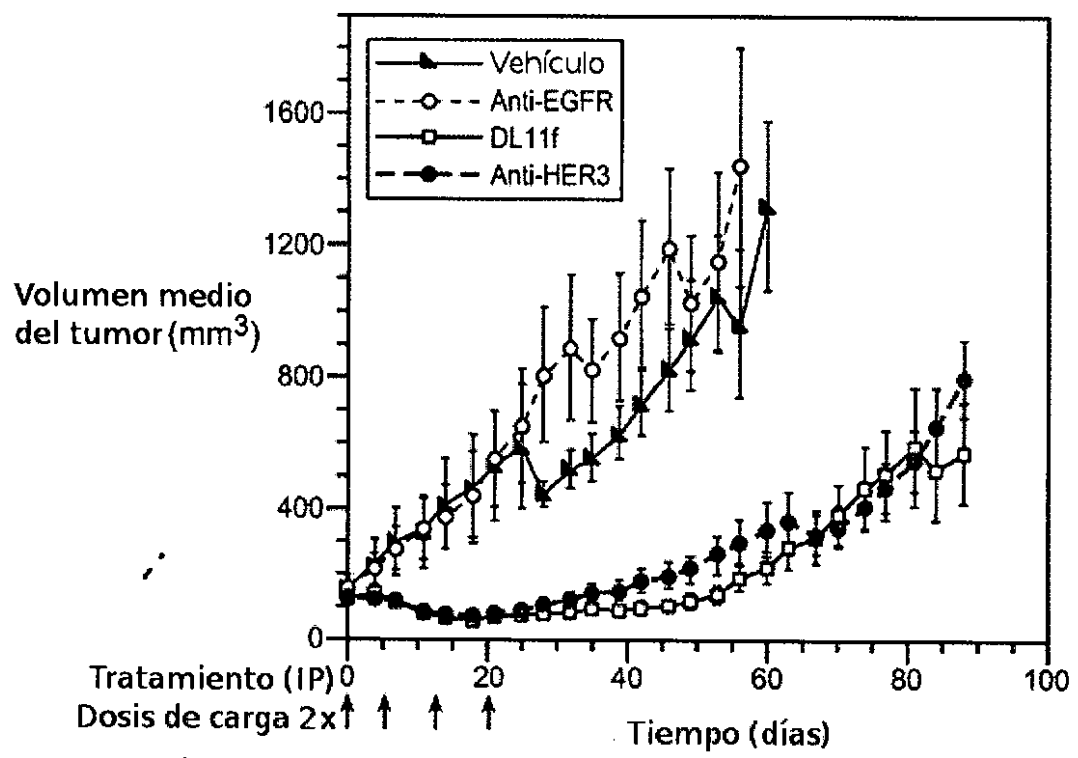


FIG. 25

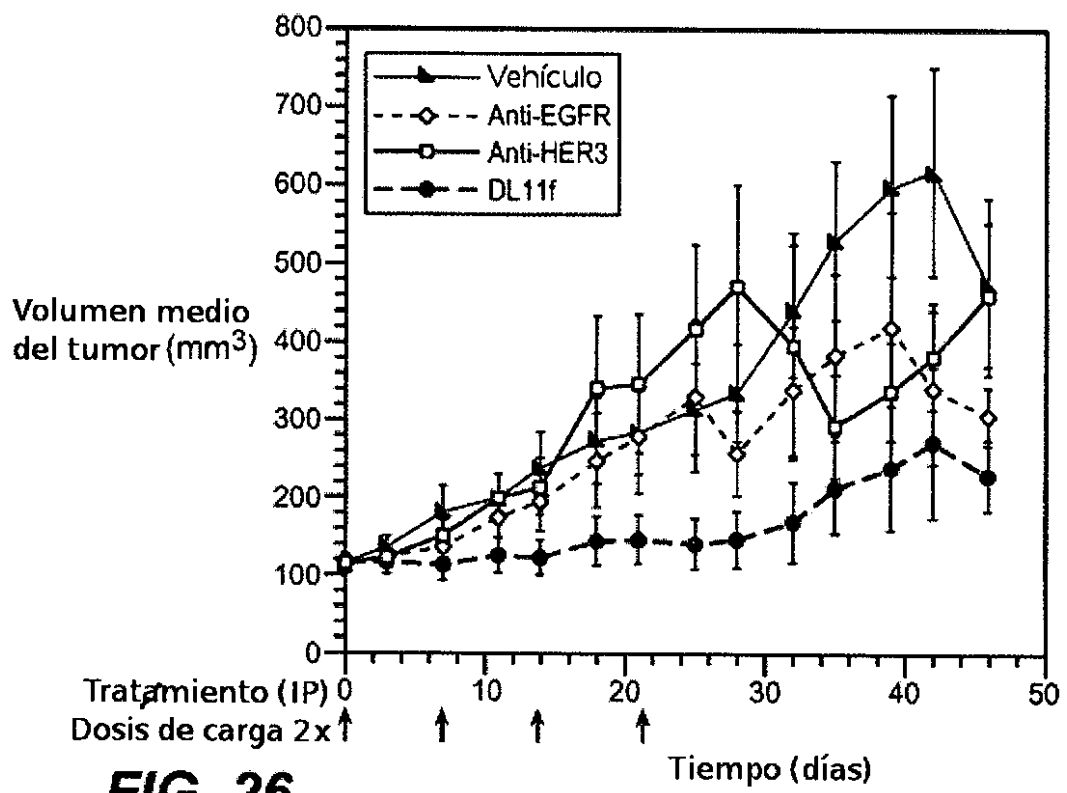
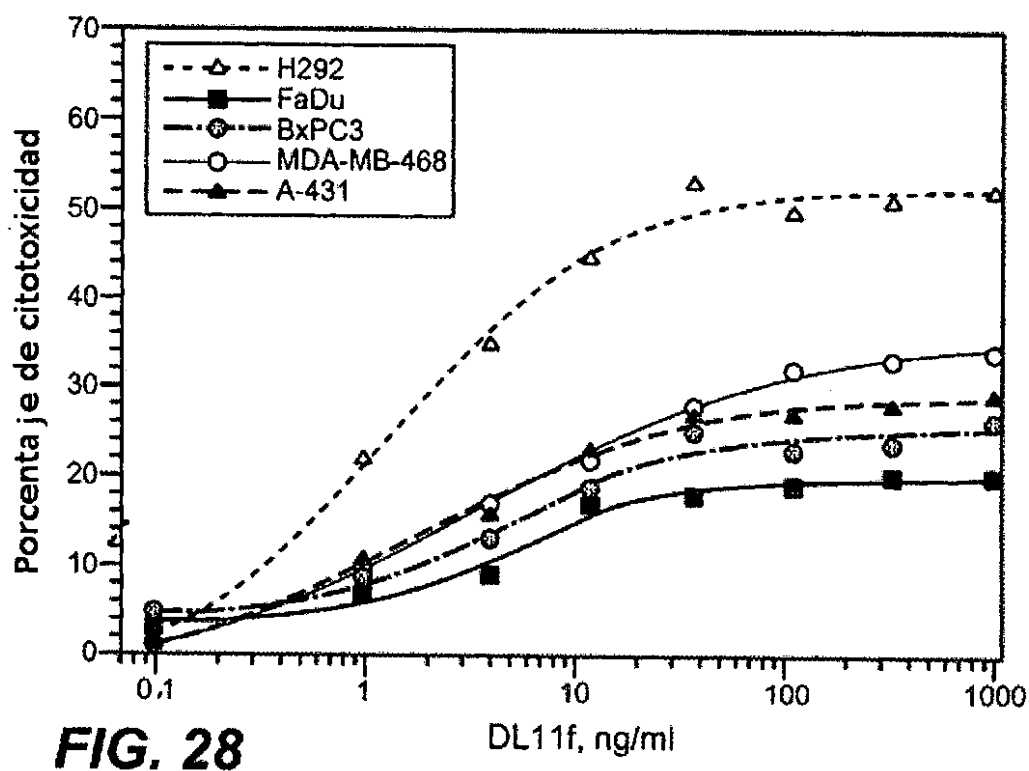
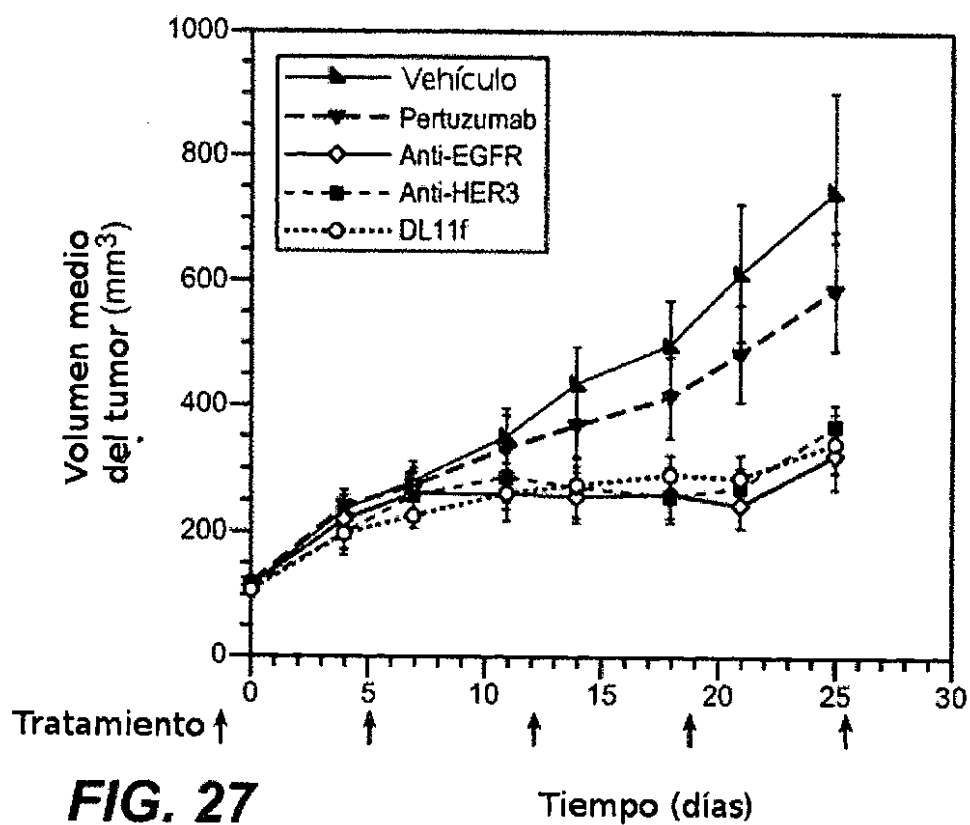


FIG. 26



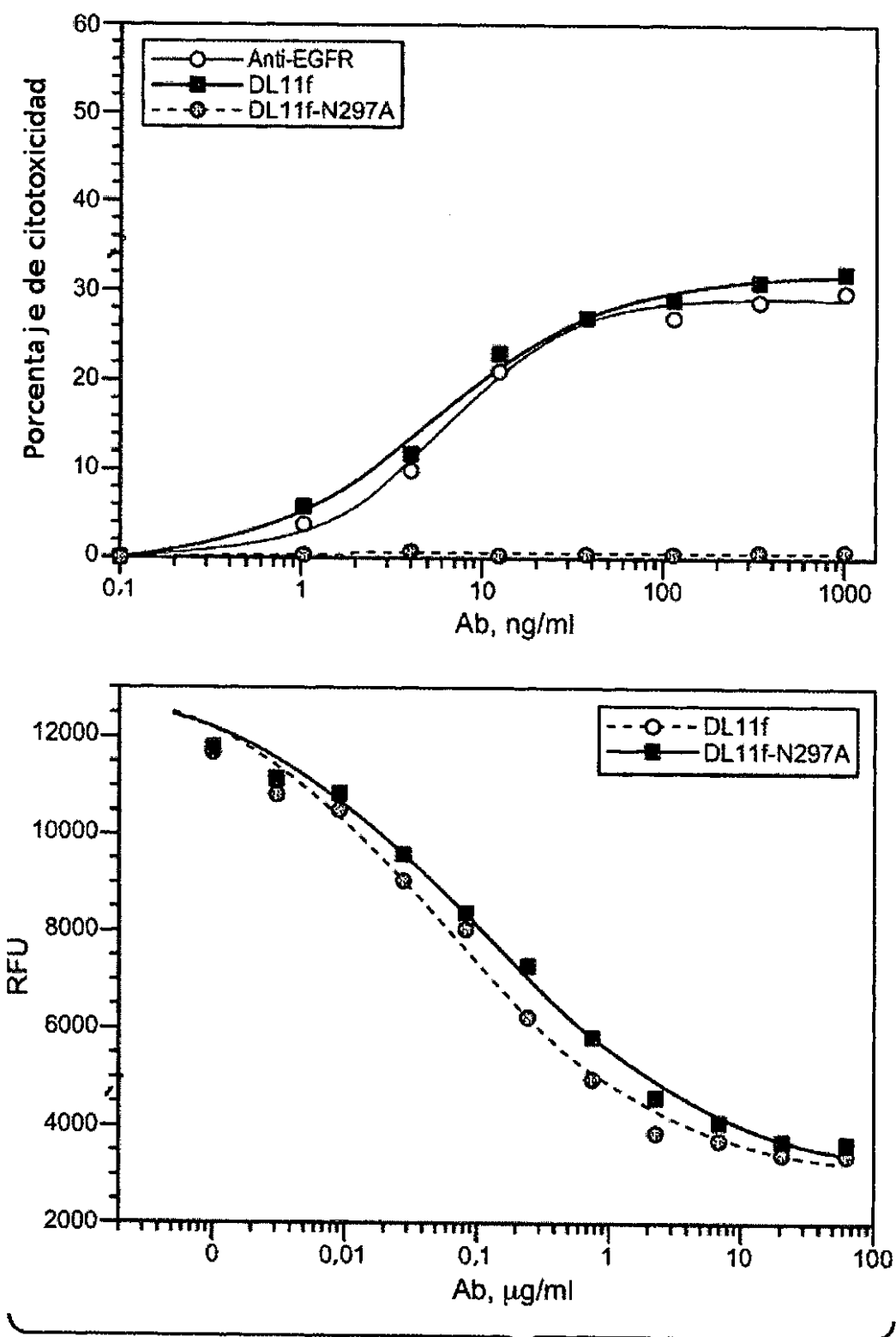


FIG. 29

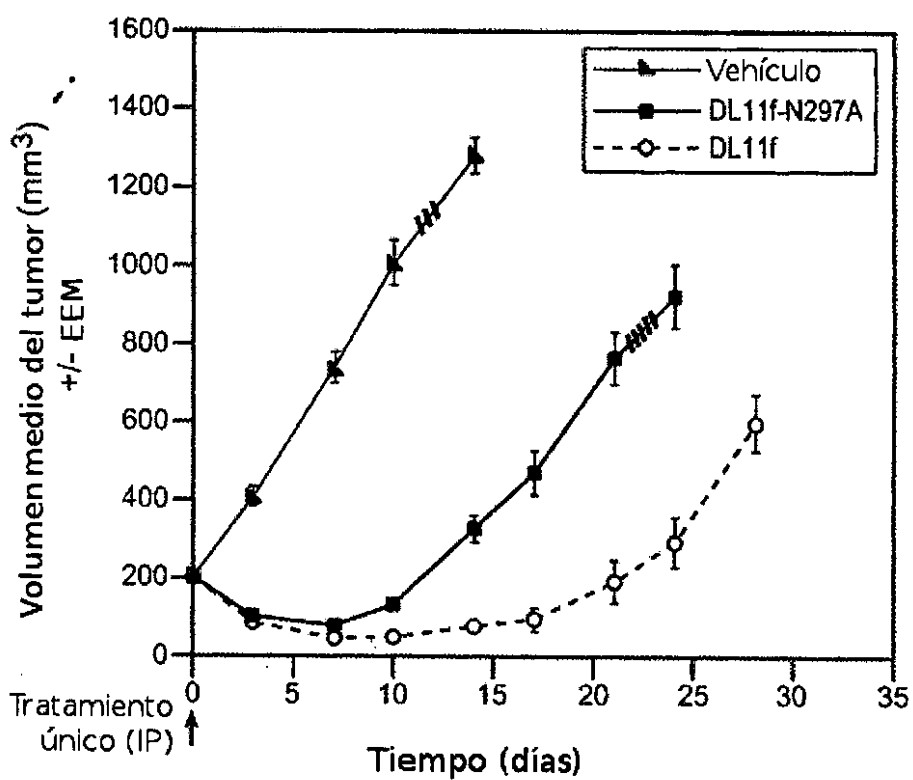


FIG. 30

Antagonista de EGFR	Datos no clínicos	Datos clínicos
ERBITUX® (cetuximab) Imclone. (BLA N° 125084) Anticuerpo monoclonal quimérico humano/ ratón recombinante que se une específicamente al dominio extracelular de EGFR.	Estudio de toxicidad con dosis repetidas por 9 meses efectuado en monos cinomolgos. <u>Dosis y régimen:</u> Administrado una vez a la semana por 9 meses en dosis de aproximadamente 0,4-4 Xs (7,5, 24 y 75 mg/kg/semana) por sobre la exposición humana semanal en base a ASC. <u>Tox. más importante relacionada con el artículo de prueba:</u> Lesiones cutáneas leves a severas (formacion de escamas, eritema, dermatitis, fisuras, heridas, exantema en diversas partes del cuerpo) a todos los niveles de dosis. La severidad y la aparición fueron dependientes de la dosis. La aparición para las dosis alta, media y baja fue en los Días de Estudio 15, 22 y 64, respectivamente. La complicación secundaria de las lesiones cutáneas severas fue infección bacteriana o sepsis con eutanasia subsiguiente del 50% de los animales en condición moribunda en el grupo con alta dosis.	El régimen de dosificación para cetuximab fue el mismo para todos los ensayos: El Día 1, se dio una dosis de prueba de 20 mg, seguida por una dosis inicial de 400 mg/m2 y después una dosis de 250 mg/m2 por toda la duración de la terapia de radiación (6-7 semanas) o hasta la progresión de la enfermedad o toxicidades inaceptables. Toxicidades dermatológicas (sarpullido acneiforme, sequedad de la piel y fisuras y secuelas inflamatorias e infecciosas (por ejemplo blefaritis, queilitis, celulitis, quistes)) también informadas en ensayos clínicos. Se informaron complicaciones secundarias incluyendo sepsis y abscesos por <i>S. aureus</i> que requirieron incisión y drenaje. Resultados del ensayo clínico en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello: se informó de sarpullido acneiforme en el 76% de los pacientes tratados con cetuximab solo de los cuales el 1% se consideró como severo, vs el 10% con terapia de radiación solamente. Resultados del ensayo en cáncer colorrectal; se informó de sarpullido acneiforme en el 89 % de los pacientes tratados con cetuximab, de los cuales el 11% se consideró como severo.

FIG . 31A

24/29

Antagonista de EGFR	Datos no clínicos	Datos clínicos
TARCEVA® (erlotinib clorhidrato) OSI Pharms/ Genentech (NDA N° 021743) Pequeña molécula que inhibe la fosforilación intracelular de tirosina quinasa asociada con EGFR.	Se efectuó un estudio de toxicidad oral de 6 meses en rata Sprague-Dawley y un estudio de toxicidad oral de 12 meses en perro Beagle. En el resumen de los NDA, se enumeraron los sitios blanco de toxicidad, y la dermatológica fue incluida en la lista. <u>Hallazgos del estudio en ratas:</u> Dosis - 1, 5 y 10 mg/kg/día <u>Hallazgos clínicos:</u> Lesión cutánea descrita como costras en el hocico desde el Día 50 en adelante en el grupo con alta dosis. <u>Hallazgos histopatológicos:</u> Degeneración e inflamación de la piel en 2/15 machos y 2/15 hembras con 5 mg/kg/día y en 11/15 machos y 11/15 hembras con 10 mg/kg/día. No hubo hallazgos histopatológicos para la piel en los controles. <u>Hallazgos del estudio en perros:</u> Dosis - 2,5, 7,5 y 15 mg/kg/día <u>Signos clínicos:</u> Todos los grupos de dosis incluyeron enrojecimiento de la piel (en 2/8, 3/8 y 5/8 perros, respectivamente) y enrojecimiento de la membrana mucosa bucal (en 4/8, 6/8 y 8/8 perros, respectivamente). El tiempo hasta la aparición de los hallazgos disminuyó con el aumento de la dosis.	El régimen de dosificación fue de 150 mg diariamente, 2 horas antes de la ingestión de alimentos. <u>Hallazgos del ensayo clínico:</u> Generalmente bien tolerado. Las toxicidades que se producen con mayor frecuencia incluyen sarpullido de la piel y diarrea. Las últimas dos toxicidades a veces dieron como resultado la reducción de la dosis o la discontinuación del tratamiento

FIG. 31B

Antagonista de EGFR	Datos no clínicos	Datos clínicos
VECTIBIX® (panitumumab) Amgen (BLA N° 125147) Anticuerpo monoclonal totalmente humanizado recombinante dirigido contra EGFR humano	Se efectuaron varios estudios de toxicidad con dosis repetidas en el mono cinomolgo. Toxicidades dermatológicas severas fueron informadas en estos estudios a dosis de 7,5, 15, 30 ó 60 mg/kg por 4, 13 ó 26 semanas de duración del tratamiento. <u>Resultados del estudio de 26 semanas:</u> Dosis: 7,5, 15 y 30 mg/kg/dosis, bolo IV una vez a la semana. <u>Resumen de hallazgos:</u> Toxicidades dermatológicas leves a severas (eritema, irritación, costras (frecuentemente asociadas con infecciones secundarias), piel escamosa (de tipo caspa), pérdida de piel, abrasiones y/o hinchazón de los párpados y enrojecimiento de los ojos), esfacelación epidérmica, septicemia y muerte (2, 6 y 6 en DB, DM y DA, respectivamente) en todos los grupos de dosis. Además, pápulas y/o ulceración/necrosis fueron informadas esporádicamente en todos los grupos de dosis. <u>Hallazgos histopatológicos:</u> Hiperqueratosis leve a marcada, acompañada por acantosis epidérmica, paraqueratosis en la piel de los animales en todos los grupos de dosis. La severidad fue la misma para los grupos de dosis 15 y 30 mg/kg y ligeramente reducida en el grupo de dosis 7,5 mg/kg. No se determinó el NOAEL. Las dosis fueron 1,25 a 10 veces mayores que la dosis propuesta para humanos de 6 mg/kg cada 2 semanas, y aproximadamente 3-24 veces más altas que la dosis propuesta de 2,5 mg/kg/semana cuando se ajustaron al peso corporal del ser humano.	El régimen de dosificación fue de 6 mg/kg diariamente cada 2 semanas hasta la progresión de la enfermedad. <u>Hallazgos del ensayo clínico:</u> Uno de los eventos adversos más serios informados fueron las toxicidades dermatológicas complicadas por secuelas infecciosas y muerte séptica. Lesiones cutáneas (sarpullido acneiforme, prurito, piel seca, exfoliación, fisuras en la piel y paroniquia) fueron informadas en el 90% de 789 pacientes con cáncer colorrectal metastásico. Éstas eran de Grado 2 en severidad y el 12% de los pacientes tenía Grado 3 en severidad. En los pacientes (no observados no clínicamente), también se informó de estomatitis y mucositis oral de Grado 1 ó 2 en el 7% de los pacientes. El desarrollo de toxicidades dermatológicas severas condujo a infecciones secundarias (sepsis) y en escasas ocasiones incluso a la muerte, pero más frecuentemente fue necesaria una reducción de la dosis o interrupción. La revisión de la etiqueta incluyó una sección de advertencia resaltada para toxicidades dermatológicas.

FIG. 31C

Evento adverso	Nombre corto	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
Sarpullido/ descamación	Sarpullido	Erupción macular o papular o eritema sin síntomas asociados	Erupción macular o papular o eritema con prurito u otros síntomas	Eritroderma generalizada severa o erupción macular, papular o vesicular; descamación que cubre >50% del ASC	Dermatitis generalizada, exfoliativa, ulcerativa o bulosa	Muerte
Sarpullido: Acné/acneiforme	Acné	Intervención no indicada	Intervención indicada	Asociado con dolor, desfiguración, ulceración o descamación	-	Muerte

FIG. 32

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	
D1	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								D	V	S	T	A	V	A	N	Y	Q
D1.5	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								D	V	S	T	A	V	A	N	Y	Q
D1.5-100	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								D	L	A	T	D	V	A	N	Y	Q
DL11	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								D	L	A	T	D	V	A	N	Y	Q
DL11b	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								N	I	A	T	D	V	A	N	Y	Q
DL11f	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q								N	I	A	T	D	V	A	N	Y	Q

Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	A	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
D1	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
D1.5	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
D1.5-100	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
DL11	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
DL11b	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
DL11f	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I		Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P

28 / 29

Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	C	D	E	F	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
D1	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P							P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
D1.5	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
D1.5-100	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	E	P	E	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
DL11	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	E	P	E	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
DL11b	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	E	P	E	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
DL11f	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	E	P	E	P							Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R

FIG. 33A

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40	41																																						
D1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	T	G	N	W	I	H			W	V	R	Q	A	P																																						
D1.5	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	T	G	N	W	I	H			W	V	R	Q	A	P																																						
D1.5-100	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	T	G	N	W	I	H			W	V	R	Q	A	P																																						
DL11	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	L	S	G	D	W	I	H			W	V	R	Q	A	P																																						
DL11b	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	L	S	G	D	W	I	H			W	V	R	Q	A	P																																						
DL11f	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	L	S	G	D	W	I	H			W	V	R	Q	A	P																																						
Kabat#	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	a	b	c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80																																							
D1	G	K	G	L	E	W	V	G	E	I	S	P			S	G	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L																																							
D1.5	G	K	G	L	E	W	V	G	E	I	S	P			S	G	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L																																							
D1.5-100	G	K	G	L	E	W	V	G	E	I	S	P			S	G	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L																																							
DL11	G	K	G	L	E	W	L	G	E	I	S	A			A	G	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L																																							
DL11b	G	K	G	L	E	W	L	G	E	I	S	A			A	G	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L																																							
DL11f	G	K	G	L	E	W	V	G	E	I	S	A			A	G	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L																																							
Kabat#	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	101	102	103	104	105	106	107	108	109																																						
D1	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	S	R	V	S	Y	B	A	A																																																							
D1.5	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	S	R	V	S	Y	B	A	A																																																							
D1.5-100	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	S	R	V	S	Y	B	A	A																																																							
DL11	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	S	R	V	S	F	B	A	A																																																							
DL11b	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	S	R	V	S	F	B	A	A																																																							
DL11f	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	S	R	V	S	F	B	A	A																																																							

FIG. 33B

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc. et al.

<120> Anticuerpos anti-HER

<130> P4203R1 WO

<150> 61/210562

<151> 2009-03-20

<160> 79

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

<400> 1

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 2
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 2
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Gly Asn
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Tyr Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His
 225
 <210> 3
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Thr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

```
<210> 4
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> sintético
<400> 4
```

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1			5					10						15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Leu	Ala	Thr	Asp
			20					25					30		
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Glu	Pro	Glu	Pro	Tyr
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
			100					105					110		
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
		115					120					125			
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
	130					135					140				
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145					150					155					160
Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp
			165						170					175	
Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr
			180					185					190		
Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser
		195					200					205			
Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys				
	210					215					220				
<210>	6														
<211>	220														
<212>	PRT														
<213>	Secuencia artificial														
<220>															
<223>	sintético														
<400>	6														
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Ala	Ser
			20					25					30		
His	Asp	Gly	Thr	Pro	Trp	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys
		35					40					45			
Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val
	50					55					60				
Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65					70					75					80
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				85					90					95	
Ser	Thr	Phe	Ala	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
			100					105					110		
Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp
		115					120					125			
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn
	130					135					140				
Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu

145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

 <210> 7
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético

 <400> 7

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

 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Phe Pro Asp
 20 25 30

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

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

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

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

 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 8
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

```
<210> 9
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> sintético
<400> 9
```

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1			5					10						15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Gly	Ser	Asp
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asp	Pro	Glu	Pro	Tyr
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
			100					105					110		
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
		115					120					125			
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
	130					135					140				
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln

145					150					155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
			180					185					190		
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
		195					200					205			
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210														
<210>	10														
<211>	214														
<212>	PRT														
<213>	Secuencia artificial														
<220>															
<223>	sintético														
<400>	10														
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asn	Ile	Ala	Ser	Asp
			20					25					30		
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ser	Ala	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asp	Pro	Glu	Pro	Tyr
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
			100					105					110		
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
		115					120					125			
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
	130					135					140				
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln

145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

 <210> 11
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético

 <400> 11

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

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

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

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

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

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

 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

PB

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

```
<210> 12
<211> 228
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

<220>
<223> sintético

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 14
<211> 228
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His
225

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> sintético
<400> 15

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 16
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 16
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Asp
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Ala Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ala Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His
 225
 <210> 17
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 17
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Gly Asp
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Ala Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ala Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
145	150	155
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
	165	170
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
	180	185
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
	195	200
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
	210	215
Asp Lys Thr His		
225		
<210> 18		
<211> 216		
<212> PRT		
<213> Secuencia artificial		
<220>		
<223> sintético		
<400> 18		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Leu Phe Tyr		
	20	25
Gly Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu		
	35	40
Leu Ile Tyr Asp Gly Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe		
	50	55
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu		
65	70	75
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Ala		
		80

85 90 95
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

 <210> 19
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético

 <400> 19

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

85 90 95

Ala Arg Glu Ser Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His
225

<210> 20
<211> 228
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 20

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65					70					75						80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Glu	Ser	Lys	Val	Ser	Phe	Glu	Ala	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	
			100					105					110			
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
		115					120					125				
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	
	130					135					140					
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
145					150				155						160	
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
				165					170					175		
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
			180					185					190			
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
		195					200					205				
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
	210					215					220					

Asp Lys Thr His
225

```
<210> 21
<211> 218
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

<220>
<223> sintético

<400> 21

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

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

Tyr Ile Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile, Tyr Asp Gly Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Leu
 85 90 95
 Pro Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

 <210> 22
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético

 <400> 22

 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Gln Ser Ile Ala Gly Ala
 20 25 30
 Tyr Tyr Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Tyr Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser

50

55

60

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

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

Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 23

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

<400> 23

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

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

Tyr Phe Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Leu
 85 90 95
 Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

 <210> 24
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintético

 <400> 24 /
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Thr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105
 <210> 25
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 25
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Gly Asn
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Tyr Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 26
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 26

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

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

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

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

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

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

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

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

<210> 28
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 29

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

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

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

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

```
<210> 30
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

<220>
<223> sintético

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>	31
<211>	108
<212>	PRT
<213>	Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

<210> 32
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 32

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Ala Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 33

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Ala Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 34

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

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

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

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

```
<210> 35
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

<220>
<223> sintético

<400> 35

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe^{*} Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ser Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 36

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

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

Tyr Ile Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

Pro Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 37
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 37

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

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Tyr Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 38
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 38

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

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

Tyr Phe Ala Pro Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Gly Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 39
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 39

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Leu Phe Tyr
20 25 30

Gly Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

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

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

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

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 40
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

<210> 41
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 41

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

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

Glu Asn Gly Tyr Ala Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Gly Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Pro Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

<210> 42
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 42

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

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

His Asp Gly Thr Pro Trp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Ser Thr Phe Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg

<210> 43
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 43

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Phe Pro Asp
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 44
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 44

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

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

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

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

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

<210> 45
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

<210> 46
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 47

Phe Thr Gly Asn Trp Ile His
1 5

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 48

Leu Ser Gly Asp Trp Ile His
1 5

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 49

Val Gly Glu Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Asp
1 5 10

<210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 50

Leu Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp
1 5 10

<210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 51

Val Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Thr Asp
1 5 10

<210> 52
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 52

Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Tyr Glu Ala Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 53
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 53

Ala Arg Glu Ser Arg Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 54

Asp Leu Ala Thr Asp Val Ala
1 5

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 55

Asn Ile Ala Thr Asp Val Ala
1 5

<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 56

Ser Ala Ser Phe
1

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 57

Ser Glu Pro Glu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 58
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 58

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

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

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 59

Phe Ser Gly Asp Trp Ile His
1 5

<210> 60
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 60

Val Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Ala Tyr Thr Asp
1 5 10

<210> 61
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 61

Ala Arg Glu Ala Lys Val Ser Phe Glu Ala Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 62

<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 62

Phe Thr Gly Asp Trp Ile His
1 5

<210> 63
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 63

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 64
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

```
<210>    65
<211>    121
<212>    PRT
<213>    Secuencia artificial
<220>
<223>    sintético
<400>    65
```

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 66
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 66

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Arg Val Ser Tyr Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 67

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Ala Ala Gly Gly Tyr Ser Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Arg Val Ser Tyr Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 68

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 69

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

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

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

Gly Glu Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Arg Val Ser Tyr Glu Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 70
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<220>
 <221> característica misc.
 <222> (19)..(23)
 <223> n es A, C, G, o T

<220>
 <221> característica misc.
 <222> (24)..(24)
 <223> N es G o T

<220>
 <221> característica misc.
 <222> (25)..(27)
 <223> n es A, C, G, o T

<220>
<221> característica misc.
<222> (28)..(28)
<223> N es A o G

<220>
<221> característica misc.
<222> (28)..(28)
<223> n es A o G

<400> 70
acttattact gtcagcaann nnnnnnnnst ccttacacgt tcgga
45

<210> 71
<211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<220>
<221> característica misc.
<222> (19)..(21)
<223> n es A, C, G, o T

<220>
<221> característica misc.
<222> (25)..(27)
<223> n es A, C, G, o T

<220>
<221> característica misc.
<222> (28)..(28)
<223> n es A o G

<220>
<221> característica misc.
<222> (29)..(29)
<223> n es G o C

<400> 71
acttattact gtcagcaann ntacnnnnnt ccttacacgt tcgga
45

<210> 72
<211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<220>
<221> característica misc.
<222> (19)..(19)
<223> n es A, G, o T

<220>
<221> característica misc.

<222> (22)..(30)

<223> n es A, C, G, o T

<400> 72

acttattact gtcagcaang gnnnnnnnnn ccttacacgt tcgga
45

<210> 73

<211> 45

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

<220>

<221> característica misc.

<222> (19)..(19)

<223> n es G o T

<220>

<221> característica misc.

<222> (20)..(20)

<223> n es A o C

<220>

<221> característica misc.

<222> (22)..(23)

<223> n es A, G, G, o T

<220>

<221> característica misc.

<222> (24)..(24)

<223> n es G o T

<220>

<221> característica misc.

<222> (25)..(39)

<223> n es A, C, G, o T

<400> 73

acttattact gtcagcaann tnnnnnnnnn ccttacacgt tcgga
45

<210> 74

<211> 45

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

<220>

<221> característica misc.

<222> (19)..(23)

<223> n es A, C, G o T

<220>

<221> característica misc.

<222> (24)..(24)

<223> n es G o T

<220>
<221> característica misc.
<222> (25)..(29)
<223> n es A, C, G o T

<220>
<221> característica misc.
<222> (30)..(30)
<223> n es G o T

<400> 74
acttattact gtcagcaann nnnnnnnnnn ccttacacgt tcgga
45

<210> 75
<211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<220>
<221> característica misc.
<222> (19)..(19)
<223> n es A, G, o T

<220>
<221> característica misc.
<222> (22)..(26)
<223> n es A, C, G, o T

<220>
<221> característica misc.
<222> (27)..(27)
<223> n es G, o T

<220>
<221> característica misc.
<222> (28)..(28)
<223> n es A o G

<220>
<221> característica misc.
<222> (29)..(29)
<223> n es G o C

<400> 75
acttattact gtcagcaang gnnnnnnnnt ccttacacgt tcgga
45

<210> 76
<211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<220>
<221> característica misc.
<222> (19)..(19)

<223> n es G o T

<220>

<221> característica misc.

<222> (20)..(20)

<223> n es A o C

<220>

<221> característica misc.

<222> (22)..(23)

<223> n es A, C, G, o T

<220>

<221> característica misc.

<222> (24)..(24)

<223> n es G o T

<220>

<221> característica misc.

<222> (25)..(26)

<223> n es A, C, G o T

<220>

<221> característica misc.

<222> (27)..(27)

<223> n es G o T

<220>

<221> característica misc.

<222> (28)..(28)

<223> n es A o G

<220>

<221> característica misc.

<222> (29)..(29)

<223> n es G o C

<400> 76

acttattact gtcagcaann tnnnnnnnnt ccttacacgt tcgga
45

<210> 77

<211> 36

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

<400> 77

tcttgtgaca aaactcacag tggcgggtggc tctggt
36

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

<400> 78

Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1

5

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintético

<400> 79

Ser Tyr Pro Thr Pro Tyr Thr
1 5

233
JP

Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GÓMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñanzas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GÓMEZ MEJIA**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9; mis (nuestros) apoderados en Colombia con facultades para recibir notificaciones, designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciled in

**South San Francisco, California 94080-4990
USA**

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses; action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and; in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm, desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9; my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

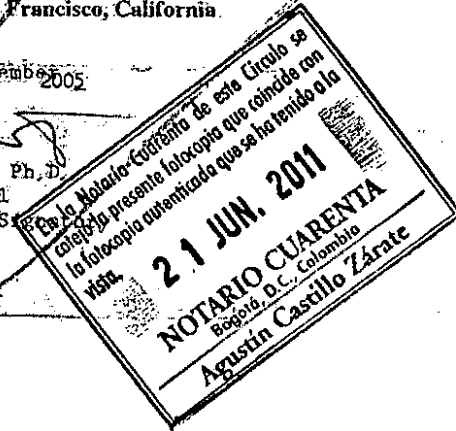
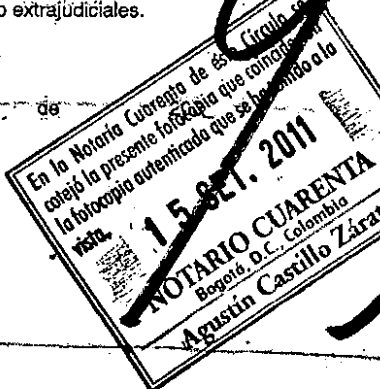
Granted and signed in

**South San Francisco, California
USA**

the 6th day of December 2005

Signature

Name: **Timothy R. Schwartz, Ph.D.**
Title: **Section Patent Counsel
Authorized Corporate Secretary
Genentech, Inc.**



AUTHORIZATION

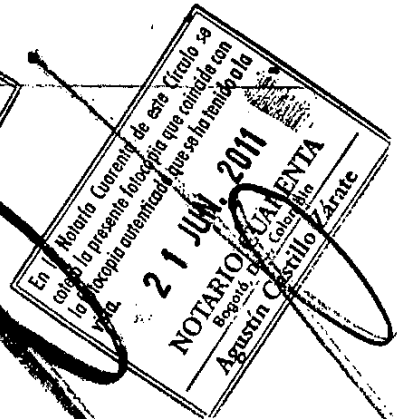
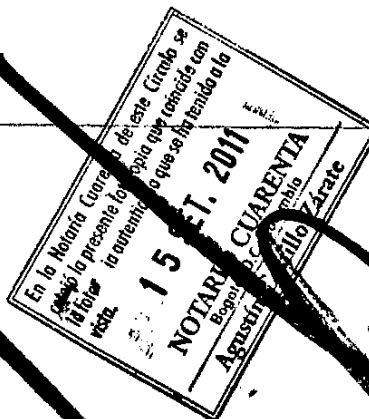
Genentech, Inc. hereby authorizes any of Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec and Timothy R. Schwartz, for so long as they remain employees of Genentech, Inc., to execute, on its behalf, any submissions associated with the filing, prosecution, granting, and extension and maintenance of grant of patent and trademark applications in the U.S. and foreign countries, contracts relating to biological deposits with the American Type Culture Collection, and assignments to publishers of copyrights covering works authored by Genentech employees.

August 27, 2002

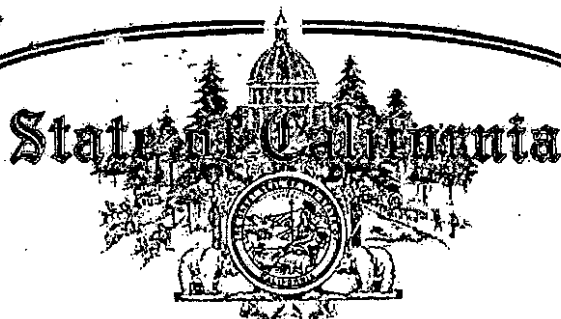
Dated

Sean Johnston

Sean A. Johnston
Vice President, Intellectual Property
Genentech, Inc.



10-771-06



State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by AIDA MICLAT GUIAM
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of AIDA MICLAT GUIAM, Notary Public,
State of California

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 15th day of December 2005
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 267083
9. Seal/Stamp:

10. Signature



[Signature]

Secretary of State

NP-24 (REV. 4-05)

OSP 05 90772



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of San Mateo } ss.

On December 6, 2005 before me,

Aida Midani Guian

personally appeared

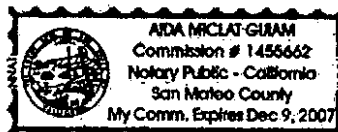
Timothy R. Schwartz

Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me
☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.

Aida Midani Guian
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____

Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

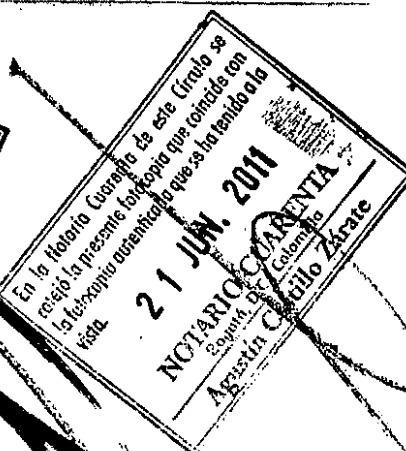
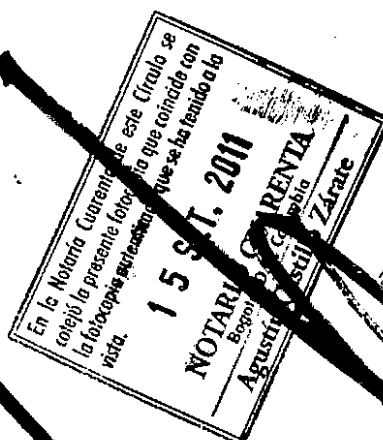
Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

- ☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here



93 33

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por Genentech, Inc. domiciliada en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, Estados Unidos de América.

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Esta documento público
2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público
Estado de California

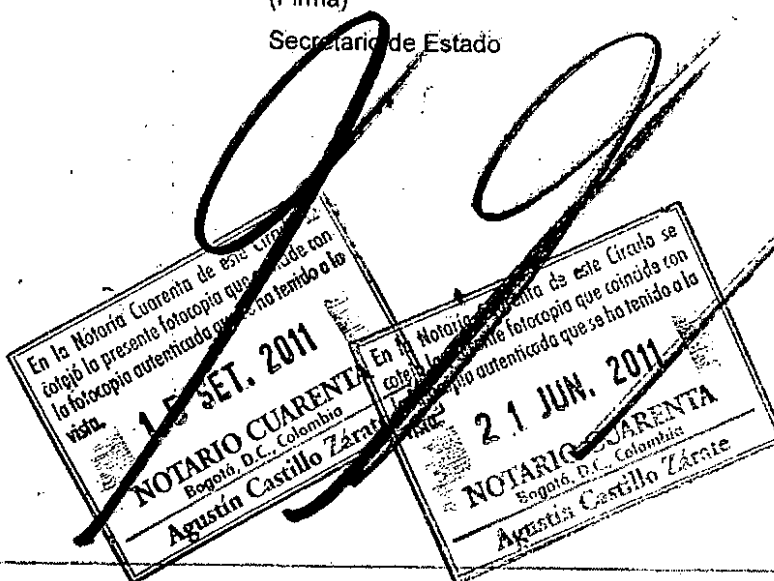
CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el 15 de diciembre de 2005
7. por el Secretario de Estado Delegado, Estado de California
8. No. 267083
9. Sello/Timbre

10. Firma

(Firma)

Secretario de Estado



RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

Estado de California)
) ss.
Condado de San Mateo)

El 6 de diciembre de 2005, ante mi, AIDA MICLAT GUIAM, apareció personalmente
Timothy R. Schwartz

☐ a quien conozco personalmente

☒ quien demostró ante mí en base a
evidencia satisfactoria ser la persona cuyo
nombre esta suscrito en el instrumento y
quien reconoció ante mí que ejecutó el
mismo en su capacidad autorizada, y que
por su firma en el instrumento la persona o
la entidad a nombre de la cual la persona
actuó, ejecutó el instrumento.

Hay un sello que dice:
AIDA MICLAT GUIAM
COMISIÓN # 14556612
Notario Público-California
Condado de San Mateo
Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

OPCIONAL

Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y puede
prevenir la retención y readhesión fraudulenta de esta forma a otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: _____

Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____

Firmante(s) diferente(s) a (los) nombrado(s) arriba: _____

Capacidad(es) Relvindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante: _____

- ☐ Individuo
☐ Funcionario Corporativo -- Título(s): _____
☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de hecho
☐ Fideicomisario
☐ Guardián o conservador
☐ Otro: _____

El firmante representa: _____

Huella Índice derecho del firmante Parte alta del dedo aquí



AUTORIZACION

Genentech, Inc. por la presente autoriza a cualquiera de Janet E. Hasak, Mark T. Kresniak, Jeffrey S. Kubinec y Thomity R. Schwartz, mientras permanezcan como empleados de Genentech, Inc., a ejecutar, a su nombre, cualquier solicitud asociada con presentación, procesamiento, consecución, y extensión y mantenimiento de concesión de solicitudes de patente y marca registrada en los Estados Unidos y países extranjeros, contratos relacionados con depósitos biológicos con la Colección Americana de Tipo de Cultivo, y cesiones a publicistas de derechos de autor que cubran los trabajos de autoría de los empleados de Genentech.

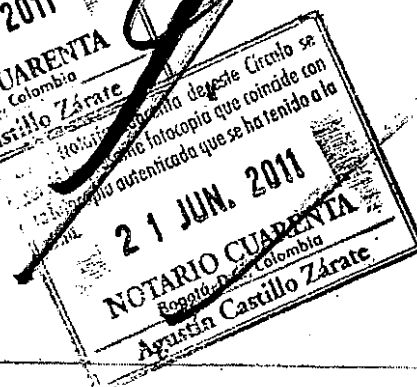
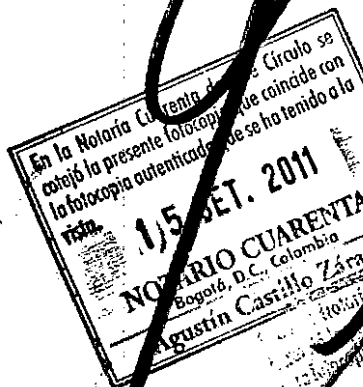
27 de Agosto de 2002

Fechado

(Firma)

Sean A. Johnston

Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc.



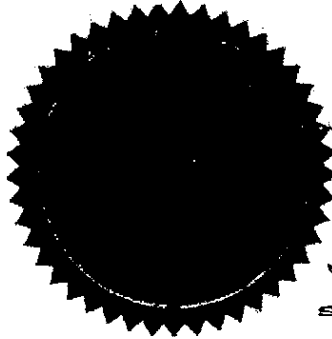
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

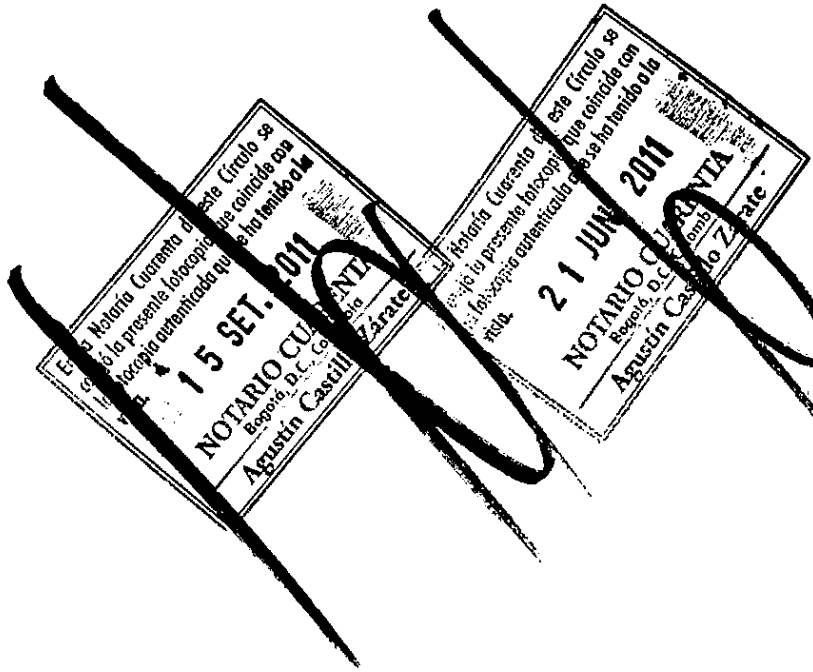
1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254030
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

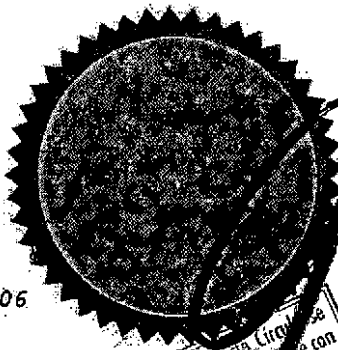
PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.

2112549

050426506



Harriet Smith Windsor
 Harriet Smith Windsor, Secretary of State
 AUTHENTICATION 3900384

DATE: 05-24-05



AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "Corporation"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

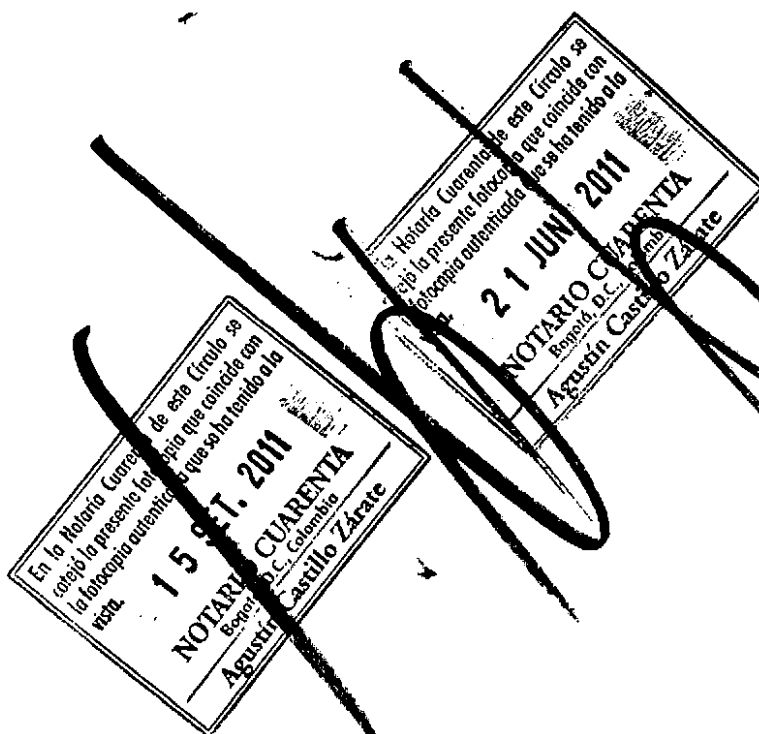
ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("Delaware Law").

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/22/1999
991302331 - 2112549



ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of

En la Notaría Cuarenta de este círculo se
coteja la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido
vista.
15 SET. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Cuatrecasas Zárate

En la Notaría Cuarenta de este círculo se
coteja la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido
vista.
21 JUN. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Cuatrecasas Zárate

the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

(i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;

(ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;

(iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;

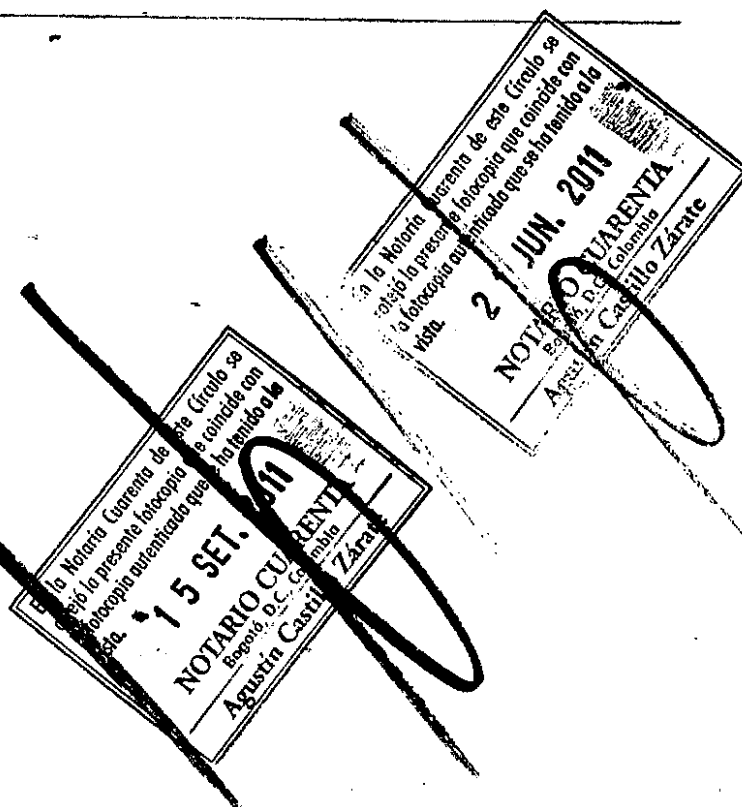
(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;

(vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;

(vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and

(viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.



ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

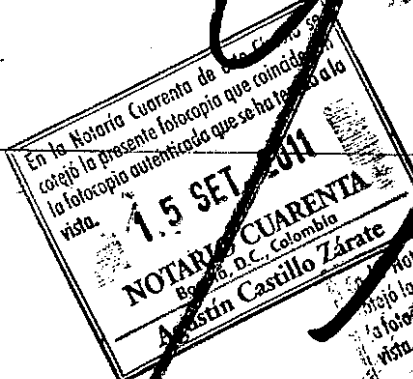
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors; and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are



divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

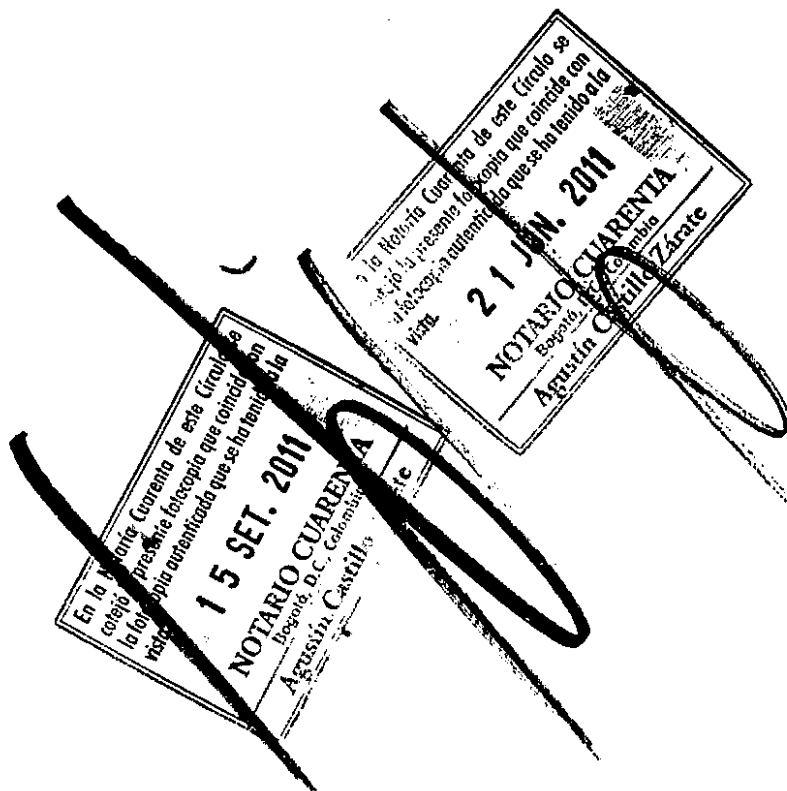
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors.* (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or



not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

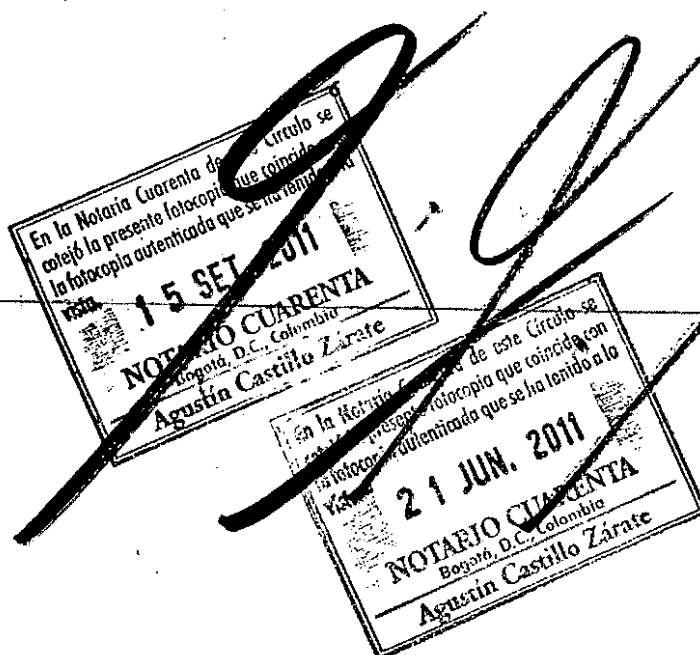
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, rescission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities



of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

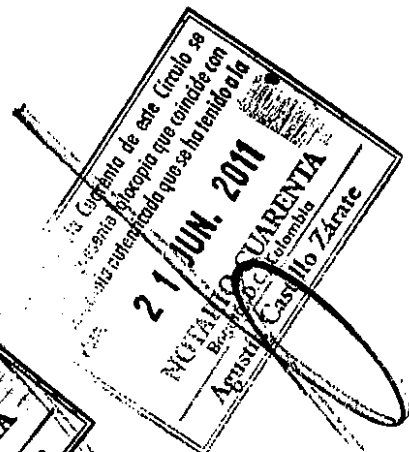
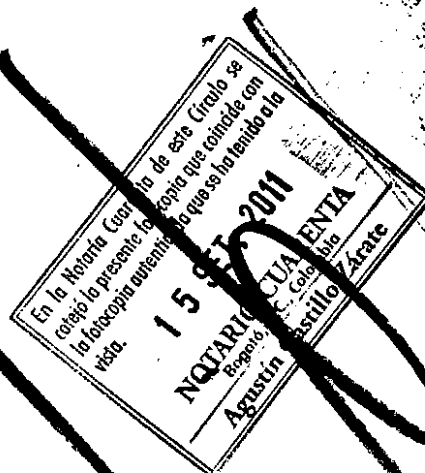
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.



SECTION 8.04. Deemed Consent of Stockholders. Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

SECTION 8.05. Definitions. For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term "Roche" shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are "affiliates" (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. Termination; Binding Effect. Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. Article 9. The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. Contracts Not Void. No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the



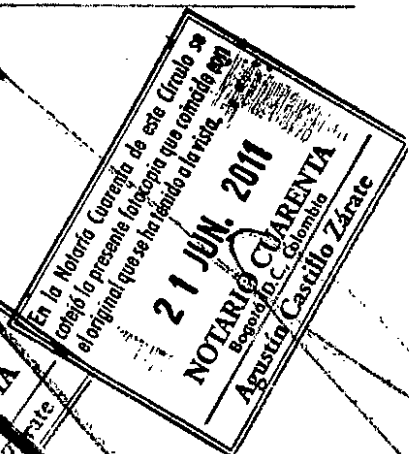
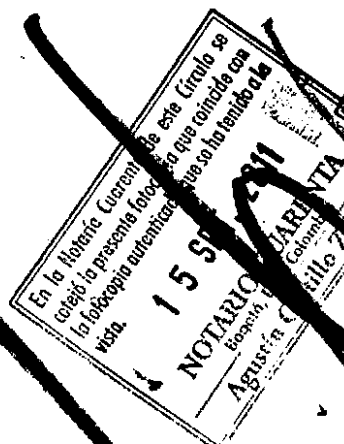
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "Corporation" and "Roche" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer or director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

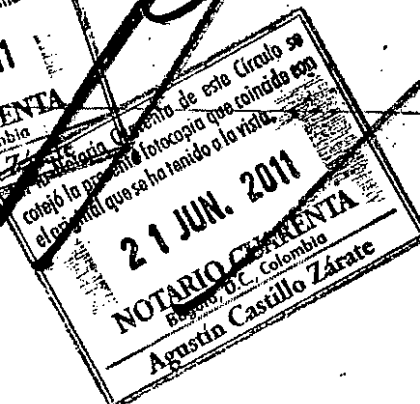
SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.



SECTION 9.06. Binding Effect. Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

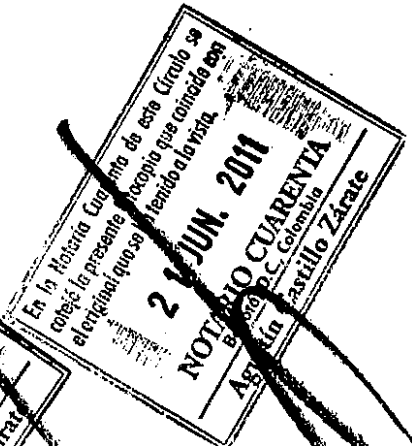
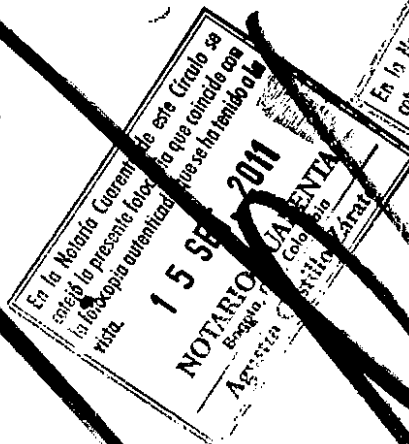
SECTION 9.07. Article 8. The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.



IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 246 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

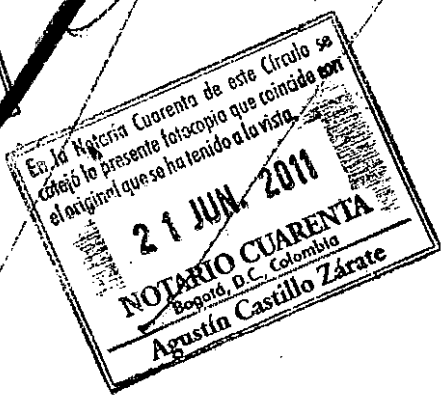
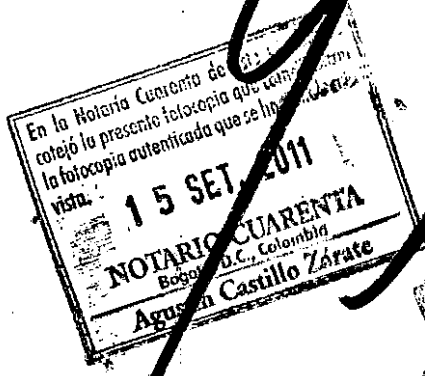
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
- Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware.
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254030
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

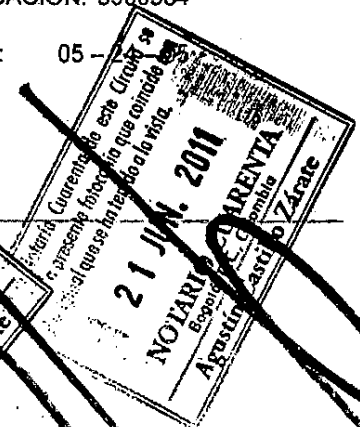
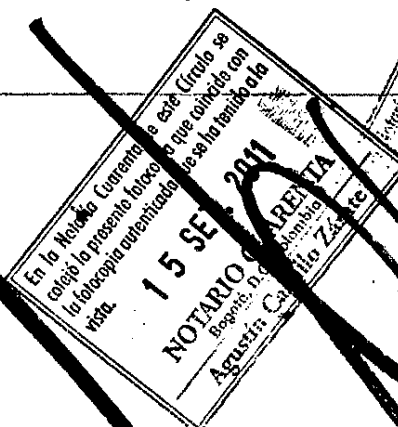


DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL VIGÉSIMO SEGUNDO DÍA DE JULIO, A. D. 1999, A LAS 9 EN PUNTO DE LA MAÑANA.

Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900384

FECHA: 05 -



CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (la "Corporación"), una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, por la presente corrige el Certificado de Incorporación, el fue presentado originalmente el 23 de diciembre de 1986, bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y corregido subsiguientemente.

Por la presente se vuelve a redactar el certificado de incorporación de la Corporación y se corrige aun más para que diga en su totalidad lo que sigue:

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de la Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones pueden ser organizadas bajo la Ley General de Corporación del Estado de Delaware como existe o puede ser modificada la misma en adelante ("Delaware Law").

ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación está autorizada a emitir es de cuatrocientos millones (400,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones



preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Trecientos millones (300,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la Corporación con derecho a votar por la misma independiente de las consideraciones de la Sección 242(b)(2) de la Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción Común.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquier acción sin emitir o del tesoro del las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

(b) *Dividendos.* Sujeto a los derechos de los accionistas de las Acciones Preferenciales, los accionistas de Acciones Comunes deberán tener el derecho a recibir, cuando y como se declare por la Junta Directiva, de los activos de la Corporación los cuales están disponibles para ello por ley, dividendos pagables ya sea en dinero, propiedad, o acciones y los accionistas de la Acción Preferencial no tendrán derecho a participar en tales dividendos (a menos que la Junta Directiva determine lo contrario en cualquier resolución que condiciona la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

(a) *Series y Limites de Variaciones entre Series.* Cualquier acción no emitida o del tesoro de las Acciones Preferenciales puede emitirse cada cierto tiempo en una o más series para tal consideración como pueda ser fijada cada cierto tiempo por la Junta Directiva. Antes de que se emita cualquier acción de las Acciones Preferenciales de cualquier serie particular, se deberá presentar un certificado ante el Secretario de Estado de Delaware estableciendo las designaciones, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones que irán anexas a las Acciones Preferenciales de tal serie y tales otras cuestiones como puedan requerirse, y la Junta Directiva deberá fijar y determinar, y por la presente se expresa explícitamente autorizada para fijar y determinar, en la forma provista por la ley,



particulares de las acciones de tal serie (siempre y cuando no sean inconsistentes con las condiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes:

(i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, número que puede incrementarse (excepto cuando lo determine de otro modo la Junta Directiva al crear tal serie) o reducirse (pero no por debajo del número de acciones de las mismas que están vigentes) cada cierto tiempo por una acción semejante de la Junta Directiva;

(ii) la tasa anual de dividendos a pagar sobre las acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales se pagarán tales dividendos y la fecha a partir de la cual los dividendos serán acumulativos en el evento que la Junta Directiva determine que los dividendos serán acumulativos;

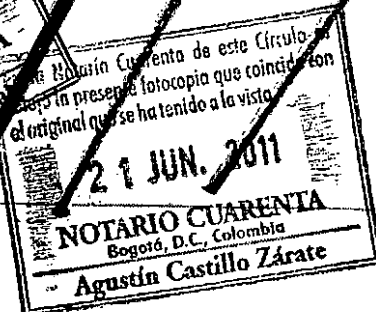
(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(iv) si tal serie tendrá o no privilegios de conversión y, de ser así, los términos y condiciones de tal conversión, incluyendo, pero sin estar limitado a, la condición para ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y de tal forma como la Junta Directiva lo determine;

(v) si las acciones de tal serie serán o no redimibles y, de ser así, los términos y condiciones de tal redención, incluyendo la fecha o fechas en las cuales o después de las cuales pueden ser redimibles, y la cantidad a pagar por acción en caso de redención, cantidad que variará bajo diferentes condiciones y en diferentes fechas de redención;

(vi) si tal serie tendrá o no un fondo de inversión para la redención o compra de acciones de esa serie y, de ser así, los términos y la cantidad de tal fondo de inversión;

(vii) los términos y condiciones de las acciones de tal serie en caso de una liquidación, cierre voluntario o involuntario de la Corporación, y



los derechos relativos de prioridad, de haber, de pago de acciones de esa serie; y

(viii) cualquier otro derecho relativo, preferencia y limitación de tal serie.

ARTICULO 5

SECCION 5.01. *Enmiendas a los estatutos por los Directores.* (a) En adición y no limitando los poderes conferidos por estatutos, la Junta Directiva esta expresamente autorizada para hacer, alterar, enmendar, rechazar y rescindir los estatutos de la Corporación, sujetos a las secciones 5.01(b) y 5.01(c) a continuación.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden ser alteradas, enmendadas, repelidas, o rescindidas por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar las mismas.

SECCION 5.02. *Enmienda del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación solo puede ser alterada, enmendada, repelida, o rescindida por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a voto sobre la misma que representen a más del 60% de las acciones con derecho a votar la misma. La sección 5.01(c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar la misma que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar la misma.

ARTICULO 6

SECCION 6.01. *Elección del Directorio por los Accionistas de Acción Preferencial.* Durante cualquier periodo cuando los accionistas de cualquier



acción preferencial cualquiera de una o más series de las mismas, que voten como una clase, tengan derecho a elegir un número específico de directores, por razón a atrasos en los dividendos u otras condiciones que les dan el derecho a hacerlo, entonces y durante el tiempo que continúe el derecho (i) el número de directores autorizado de otro modo será incrementado por tal número de directores especificado, y los accionistas de tales Acciones Preferenciales o tales series de las mismas, que votan como una clase, tendrán derecho a elegir los directores adicionales para lo que se provee, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones Preferenciales o series; (ii) cada uno de tales directores adicionales servirá durante tal término, y tendrá tales poderes de voto, como se han de otorgar en las provisiones pertinentes a tales Acciones Preferenciales o series; y (iii) siempre que los accionistas de cualquiera de tales Acciones Preferenciales o series de las mismas están desprovistos de tales derechos a elegir un número específico de directores, votando como clase, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones preferenciales o series, los términos de oficio de todos los directores elegidos por los accionistas de tales Acciones preferenciales o series, que votan como clase, de acuerdo con las condiciones o elegidos para llenar cualquier vacante resultante de la muerte, renuncia o remoción de directores así elegidos por los accionistas de tales Acciones Preferenciales o series, terminarán en adelante y el número autorizado de directores será reducido en concordancia.

SECCION 6.02. *Votaciones.* Las elecciones de directores en una reunión anual o especial de accionistas necesaria no serán por votos escritos a menos que los estatutos de la Corporación digan lo contrario.

SECCION 6.03. *Eliminación de cierta responsabilidad personal de los directores.* (a) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por daños monetarios por violación del deber fiduciario como director hasta donde lo permita la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y sus herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quien fue o es una parte o esta amenazado de ser parte de, o esta involucrado en cualquier acción, demanda o proceso amenazado, pendiente, o completado, ya sea civil, criminal, administrativo o investigativo, por razón del hecho de que esa persona es, fue un director de la Corporación o es o estaba sirviendo por solicitud de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa, será indemnizado y completamente protegido por la Corporación hasta donde lo



permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión con cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta tal punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

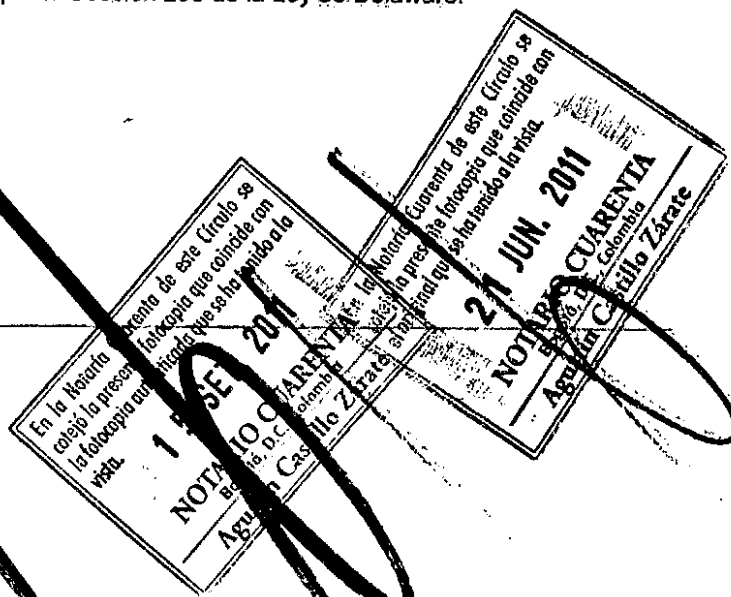
(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurrida por tal persona en cualquier capacidad o que surge de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán exclusivos de ningún otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirir de aquí en adelante.

(f) Ni la alteración, enmienda, rechazo o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de ninguna condición de este Certificado de Incorporación o de los Estatutos de la Corporación, ni, hasta donde lo permite la Ley de Delaware, ninguna modificación de la ley, debe eliminar o reducir el efecto de esta Sección 6.03 respecto a ninguno de los actos u omisiones que ocurran antes de tal alteración, enmienda, rechazo, rescisión, adopción o modificación.

ARTICULO 7

SECCION 7.01, Sección 203 de la Ley de Delaware. Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.



ARTICULO 8

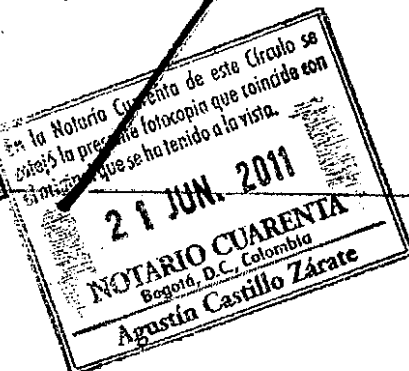
SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este artículo 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionarios y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

SECCION 8.02. *Actividades en Negocios Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc. pueda de otra forma acordarlo por escrito,

(a) Roche no tendrá el deber de abstenerse de entrar directamente o indirectamente en actividades de negocios o líneas de negocios semejantes o similares a las de la Corporación, y

(b) ni Roche ni ninguno de sus funcionarios o director de la misma será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar cualquier deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades de Roche o de la participación de tal persona en las mismas.

En el evento que Roche adquiere conocimientos de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hecho

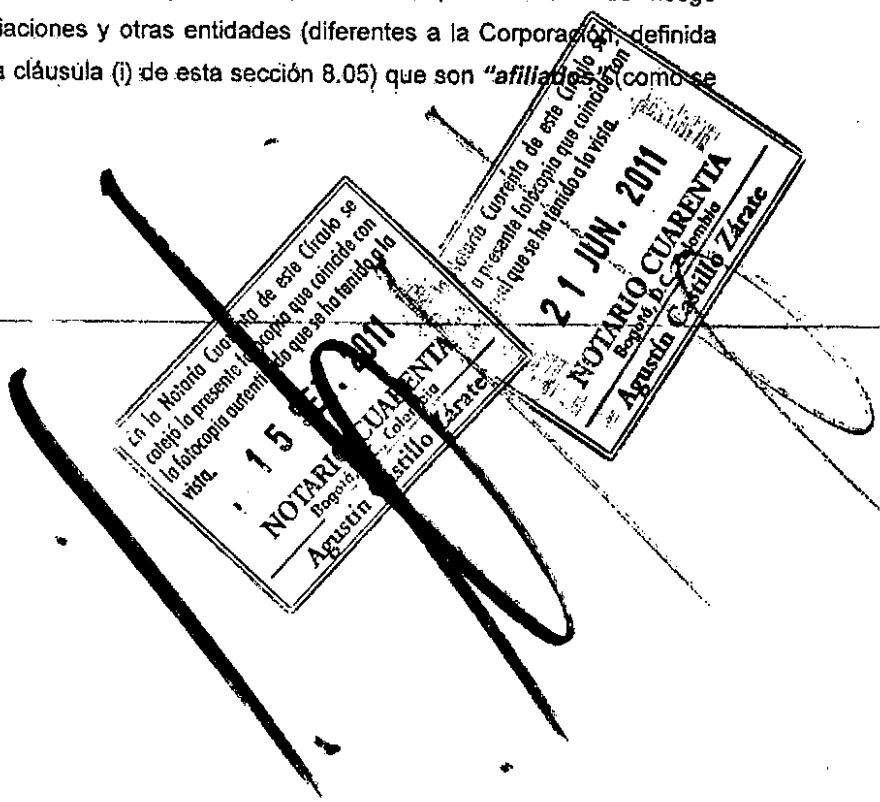


que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya sea si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 8.

SECCION 8.05. *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 8 y el Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término "**Roche**" debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación), definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son "**afiliadas**" (como se



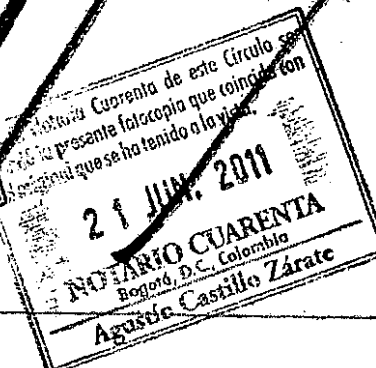
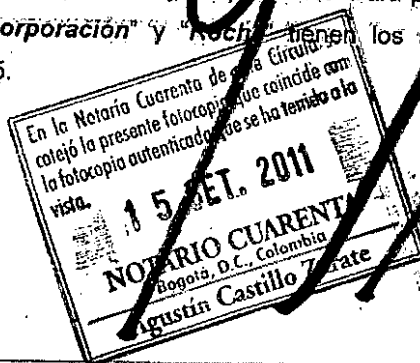
define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc.

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante*. Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cese de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que se director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07. *Artículo 9*. Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos nulos*. Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo u anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernada por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "*Corporación*" y "*Roche*" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

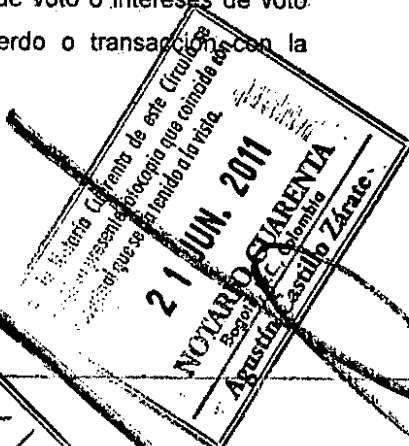
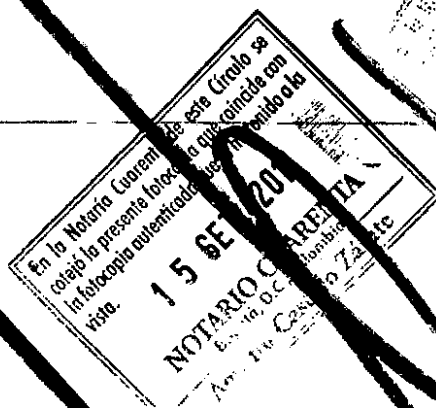


SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo). Las acciones vigentes de las Acciones Comunes de propiedad de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de accionistas que autorice o apruebe tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo).

SECCION 9.03. *No responsabilidad por acciones de buena fe.* Ni Roche ni ningún funcionario o director de la misma será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar cualquiera de los deberes fiduciarios o deberes de lealtad o por fallar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o por derivación de cualquier beneficio personal por razón del hecho que Roche o un funcionario o director de la misma de buena fe tome cualquier acción o ejerza cualquier derecho o de o retenga cualquier consentimiento en conexión con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto dado u otra acción tomada por cualquier persona que es un funcionario, director o representante de Roche, donde el voto o acción es tomado por tal persona en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho o un consentimiento de Roche para los propósitos de cualquiera de tal acuerdo o contrato.

SECCION 9.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 9.

SECCION 9.05. *Contratos cubiertos.* Para propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o cualquier corporación, sociedad, sociedad de riesgo conjunto, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) el cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poderes de voto o intereses de voto similares vigentes se considerará un contrato, acuerdo o transacción con la Corporación.



SECCIÓN 9.06. *Efecto obligante.* Ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 9 ni la adopción de alguna condición inconsistente con cualquier condición de este Artículo 9 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 respecto a cualquier materia que ocurra, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, a no ser por este Artículo 9, pueda acaecer o surgir, antes de tal alteración, enmienda, cambio, rechazo o adopción.

SECCION 9.07. *Artículo 8.* Las condiciones de este Artículo 9 son adicionales a las condiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, el cual ha sido adoptado de acuerdo con las secciones 242 y 245 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware y por consentimiento escrito de el único accionista de la Corporación de acuerdo con la sección 228 de Ley General de Corporación del Estado de Delaware, ha sido ejecutado este 22 de Julio de 1999.

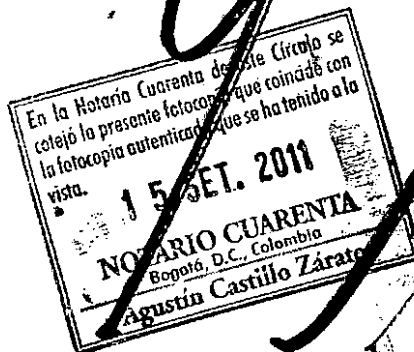
GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

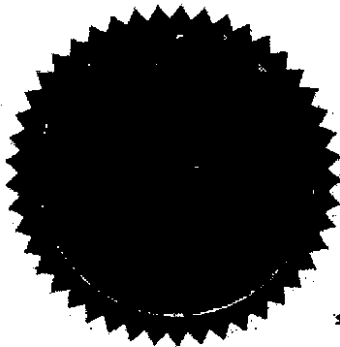
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254031

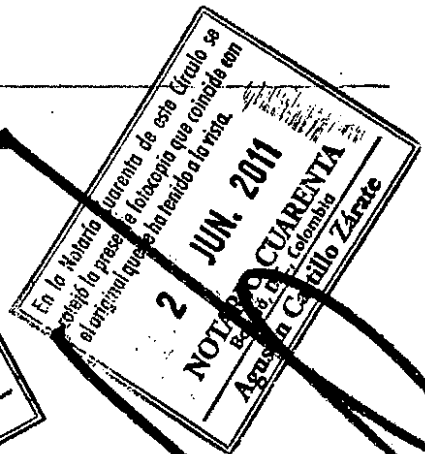
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.

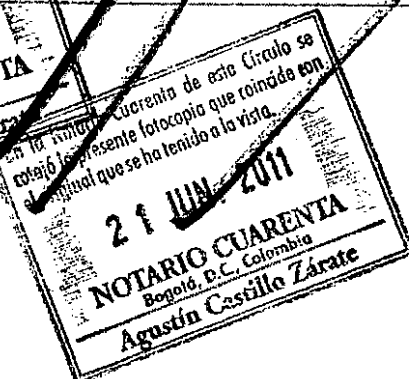
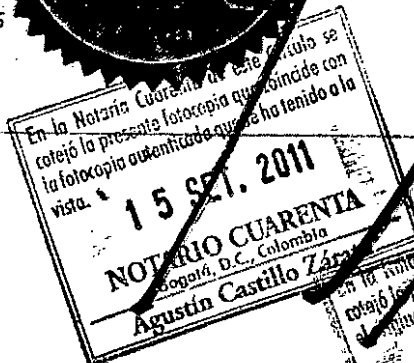
2112549

050426506



Harriet Smith Windsor
Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 990385

DATE: 05-24-05



001245251 - 2112549

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

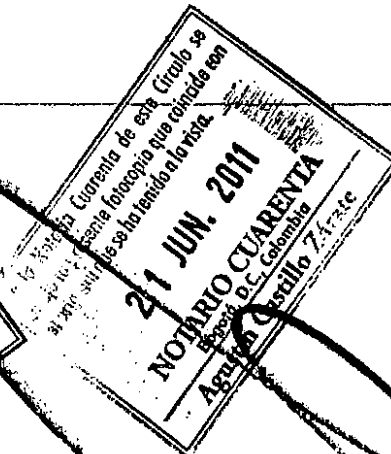
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

75841



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

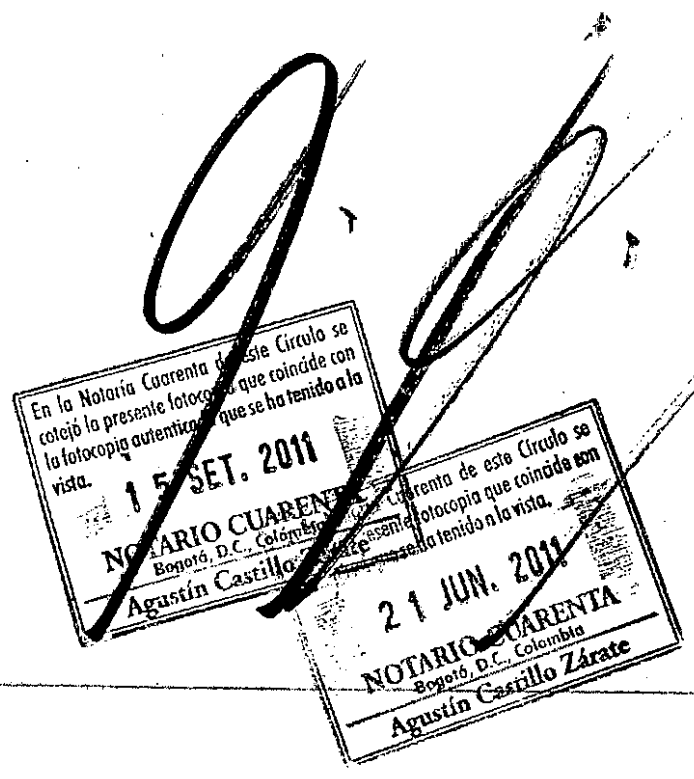
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254031
9. Sello/timbre
10. Firma

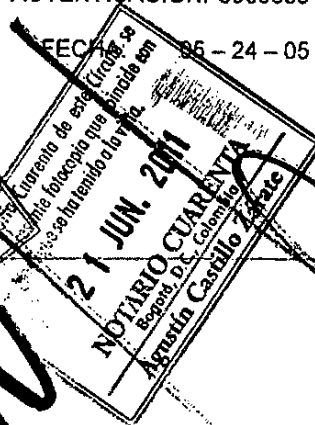
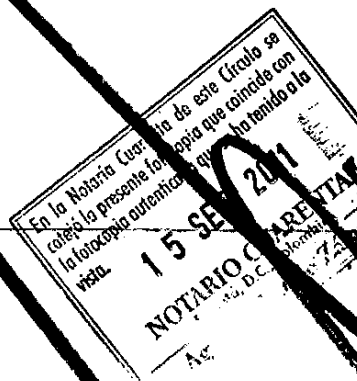
Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO.

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOQUINTO DIA DE MAYO, A. D. 2000, A LAS 5 EN PUNTO DE LA TARDE.

Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385



CERTIFICADO DE ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital*. (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación está autorizada a emitir es de setecientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requiendo por los estatutos votaron a favor de la enmienda.

En la Notaría Cuarenta de este Cirulo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la vista.
15 SET. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaría Cuarenta de este Cirulo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la vista.
21 JUN. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

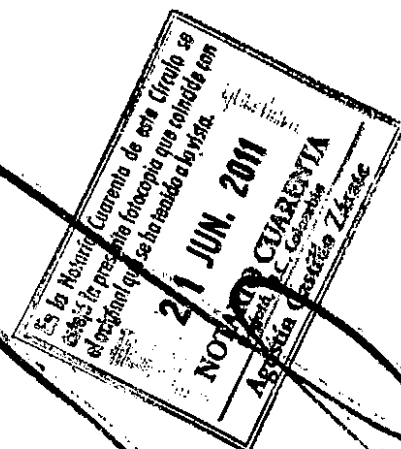
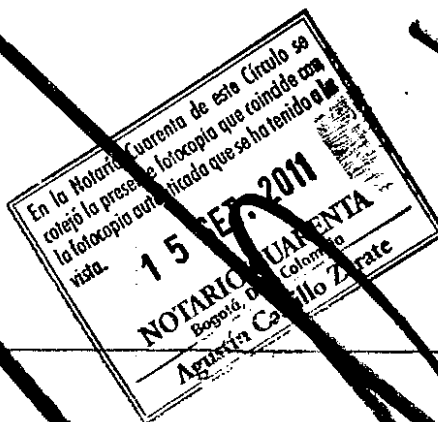
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

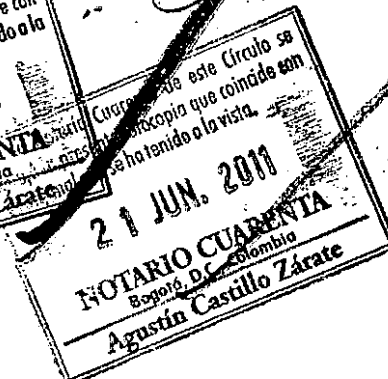
1. Country: United States of America
2. This public document
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254033
9. Seal/Stamp:
10. Signature:

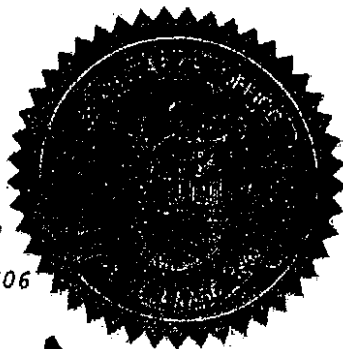


Harriet Smith Windsor
Secretary of State



The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.



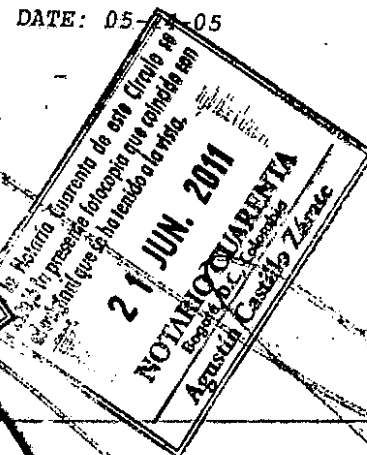
2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-11-05



State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 07:44 PM 04/16/2004
FILED 07:39 PM 04/16/2004
SERV. 040281669 - 2112549 FILE

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Executive Vice President, General Counsel and Secretary

4153087

En la Notaria Cuarenta de este Circulo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
15 SEP. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaria Cuarenta de este Circulo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
la fotocopia autenticada que se ha tenido a la
vista.
21 JUN. 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

APOSTILLA

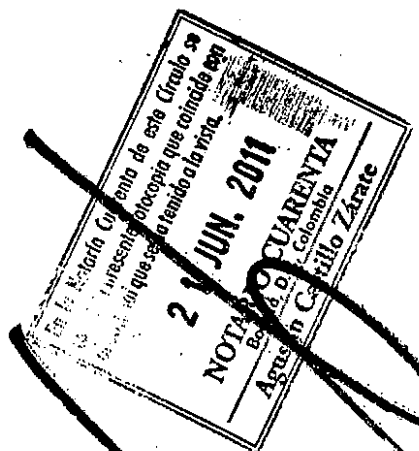
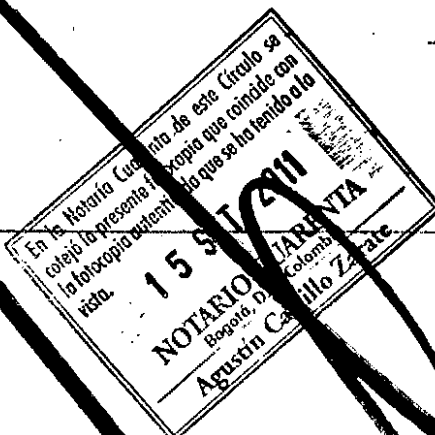
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

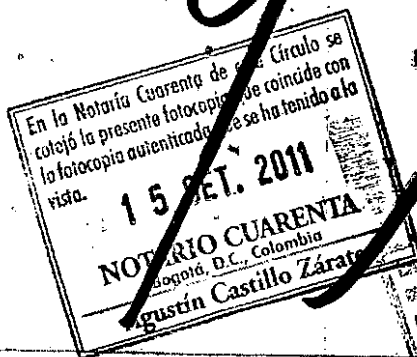
5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

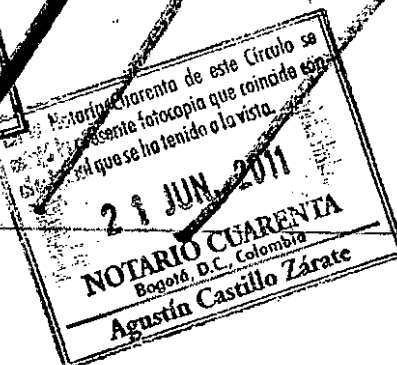


DELAWARE,
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL
ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES
UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE
"GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOSEXTO DIA
DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor Secretaria de Estado



CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

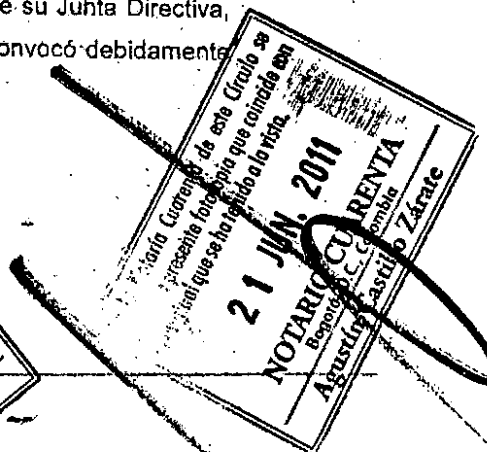
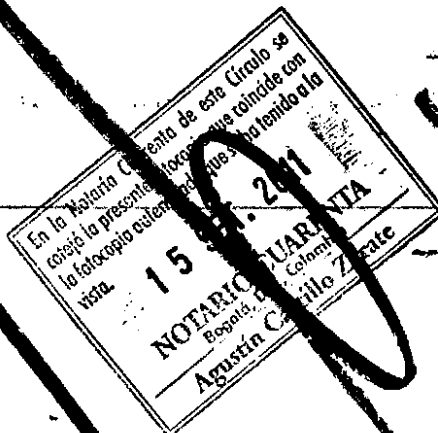
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente



TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda.

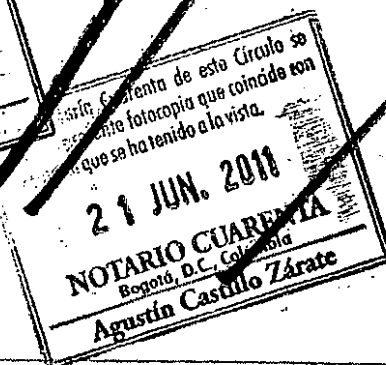
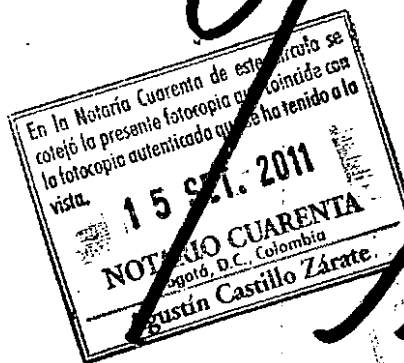
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

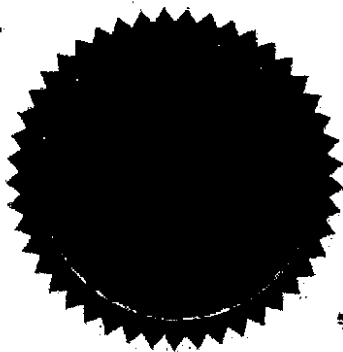
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

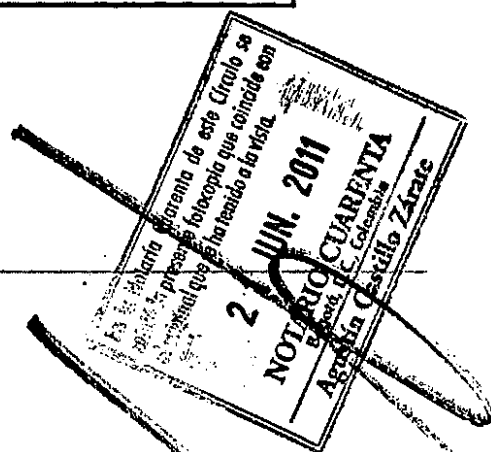
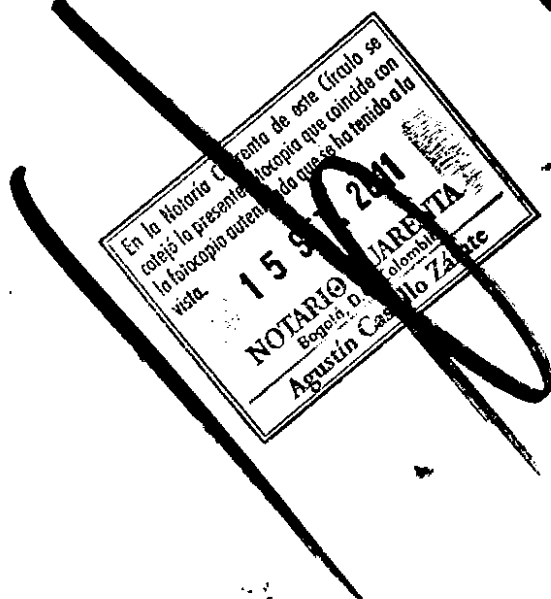
8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

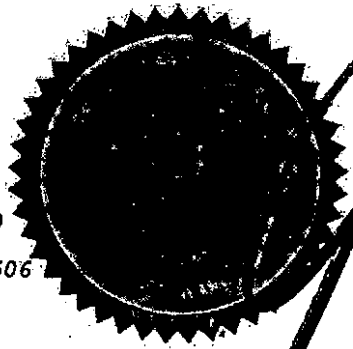
PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.

2112549

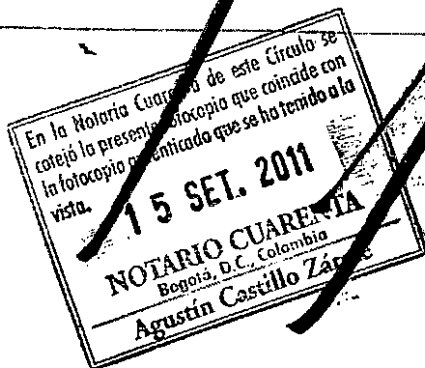
050426506

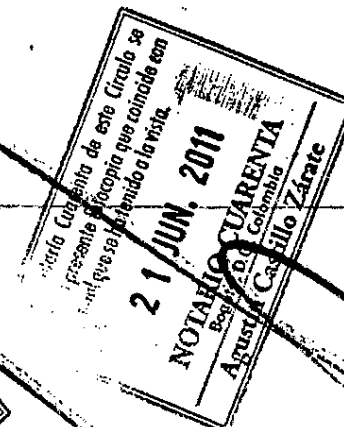


Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 1960386

DATE: 05-24-05





TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público
3. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
4. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
5. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL
ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES
UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE
"GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE
MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.

Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN

FECHA:

05

05

21 JUN. 2011

NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

En la Notaría Cuarenta de esta Ciudad se
paleó la presente fotografía que coincide con
la fotografía autenticada presentando a la
vista.
15 SE 2011
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

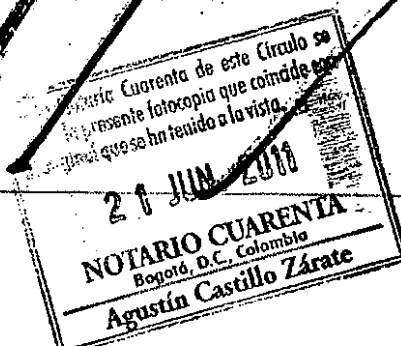
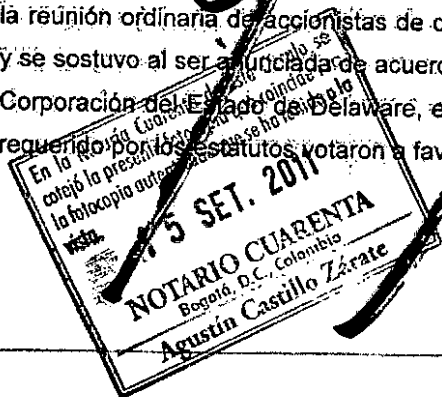
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación está autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

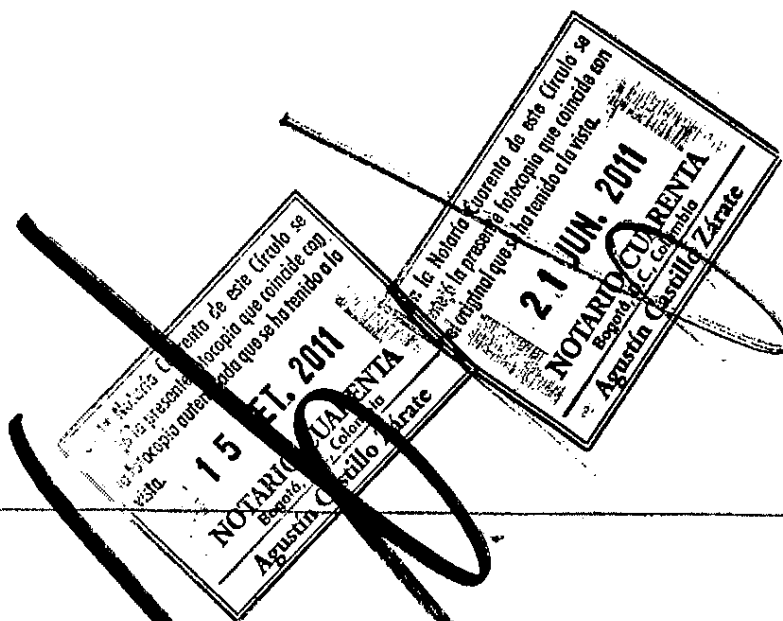
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE U

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 252

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐