

Castillo Grau & Asociados

ABOGADOS

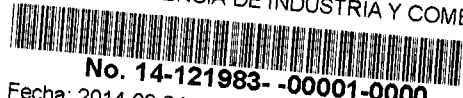
Señores

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá, D.C.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-121983-00001-0000

Fecha: 2014-06-24 14:12:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 2

Re.: Expediente No. 14.121.983

Fase Nacional de Solicitud

de Patente PCT

MEDIMMUNE, LLC

En relación con el Expediente de la referencia y en relación con la solicitud de patente presentada el 06 de Junio del 2014, por medio del presente escrito me permito manifestarle:

1. Acompaño CD con información técnica en formato PDF.

Le solicito se sirva agregar este escrito y su anexo al expediente y continuar el trámite de la solicitud.

De Ustedes Atentamente.

LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE

C.C. No. 79.397.879 de Bogotá

T.P. No. 68.995 C.S.J.

2

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD 2014 6 24	
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		Recorrido:	
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-121983-	1	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

Folio (2) ANEXA CD, el cual contiene un total de (1) Archivo en formato PDF y fue procesado correctamente.

Yanny

MOLÉCULAS DE UNIÓN ESPECÍFICAS PARA HER3 Y USOS DE LAS MISMAS**REFERENCIA PARA LISTADO DE SECUENCIA PRESENTADO****ELECTRONICAMENTE**

- 5 Esta solicitud incorpora para referencia una Lista de Secuencias presentada con esta solicitud como un archivo de texto titulado “Her3-100WO1_SL”, creado el 12 de noviembre de 2012 y que tiene un tamaño de 31.3 kilobytes.

CAMPO DE LA INVENCION

- 10 La presente invención proporciona composiciones que se unen específicamente a HER3 y métodos para el uso de tales composiciones para el tratamiento del cáncer.

TÉCNICA ANTECEDENTE

- 15 El receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3, también conocido como Erbb3) es un receptor de la proteína tirosina y pertenece al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de la subfamilia EGFR/HER de receptor de la proteína tirosina cinasa (RTK), que consiste de EGFR (HER1/Erbb1), HER2/Erbb2, HER3/Erbb3 y HER4/Erbb4. EGFR y HER2 se encuentran entre las RTK oncogénicas
20 bien establecidas que activan la tumorigénesis en varios tipos de tumores sólidos, incluyendo las principales categorías, tal como cánceres de mama, colorrectal y pulmón. Las actividades de la tirosina cinasa de EGFR y HER2 han demostrado ser esenciales para sus actividades oncogénicas.

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

- 30 La Heregulina (HRG) de ligando se une al dominio extracelular de HER3 y activa la ruta de señalización mediada por el receptor al promover la dimerización con

otros miembros de la familia de EGFR (*por ejemplo*, otros receptores de HER) y transfosforilación de su dominio intracelular. Ha sido mostrado que HER3 carece de actividad de tirosina cinasa detectable, probablemente debido a una sustitución no conservadora de ciertos residuos clave en el dominio de tirosina cinasa. Por lo tanto, una
5 consecuencia de esta deficiencia de cinasa, HER3 necesita formar hetero-dímeros con otras RTK, especialmente el EGFR y HER2, para someterse a la fosforilación y ser funcionalmente activo.

El papel central de HER3 en la oncogénesis está actuando como una proteína de andamiaje para permitir la inducción máxima de la ruta PI3K/AKT. El HER3 se
10 ha mostrado que contiene un grupo de seis motivos que contiene un grupo de motivos que contiene tirosina C-terminal que imita el sitio de unión del consenso PI3K/p85. Por lo tanto al formar heterodímeros con HER3, los onco-portadores corriente arriba, EGFR, HER2, cMET y FGFR2, pueden acoplarse de manera más eficiente a la ruta PI3K/AKT. Por lo tanto, es razonable esperar que una pérdida de actividad de HER3 pueda bloquear
15 el progreso del cáncer en diversos sistemas accionados por las RTK divergentes. Los estudios han demostrado que HER3 siRNA interfieren en las células del cáncer de mama del amplificado por HER2 conduciendo a efectos de anti-proliferación similares como interferencia HER2 siRNA, además demuestra la necesidad crítica del cáncer para HER3.

Además de promover el crecimiento del tumor en condiciones no
20 estresadas, se ha encontrado que HER3 está altamente involucrado en conferir resistencias terapéuticas para muchos fármacos objetivos, incluyendo inhibidores del EGFR de tirosina cinasa, anticuerpos monoclonales del HER2 tales como trastuzumab, así como inhibidores de molécula pequeña de PI3K o AKT o MEK. Esto agrega otra capa de atracción para HER3 como un objetivo de cáncer prometedor para la citorreducción de
25 tumor primario, así como combatir la emisión de resistencia al cáncer que invariablemente surge a pesar de las respuestas clínicas iniciales.

HER3 tiene dos maneras diferentes para dimerizar con sus asociaciones RTK: dependientes de ligando (en presencia de HRG) o independiente del ligando. En términos de dímeros de **HER2-HER3**, se sabe que en las células con baja a media
30 expresión de HER2, HER3 puede someter a complejo sólo con HER2 después de la unión al ligando; en contraste, en las células con HER2 amplificado (HER2 IHC 3+), forman

dímeros espontáneos sin HRG (Junttila *et al.* (2009) Cancer Cell. 15 (5):429-40). Los dímeros formados en la presencia o ausencia del ligando son estructuralmente distintos como se demostró por un estudio anterior que muestra que el trastuzumab/Herceptin® (anticuerpo monoclonal HER2 Genentech/Roche aprobado para cánceres de mama
 5 HER2 3+) sólo puede perturbar el dímero independiente de ligando pero no el dímero dependiente de ligando, mientras pertuzumab\Omnitarg® (rhuMAb 2C4, anticuerpo monoclonal Genentech/Roche HER2 en pruebas de 3 fases) sólo puede afectar a los dímeros dependientes del ligando.

La formación de dímero entre los miembros de la familia HER expande el
 10 potencial de señalización de HER3 y es un medio no sólo para la diversificación de la señal, sino también para la amplificación de la señal. HER3 ha mostrado ser fosforilado en una variedad de contextos celulares. Por ejemplo, HER3 es constitutivamente fosforilados en residuos de tirosina en un subconjunto de células de cáncer de mama humano que sobreexpresan HER3 (véase, *por ejemplo*, Kraus *et al.* (1993) Proc Natl Acad Sci EE.UU.
 15 90, 2900-2904;... Kim *et al.* (1998), Biochem J. 334, 189-195; Schaefer *et al.* (2004) Cancer Res. 64, 3395-3405; Schaefer *et al.* (2006) Neoplasia 8, 612-622). Por consiguiente, las terapias que interfieren efectivamente con Fosforilación HER3 se desean.

Además, se ha encontrado que HER3 se sobreexpresa y/o sobreactiva en
 20 varios tipos de cánceres tales como cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cánceres de riñón y de vejiga urinaria, cáncer de páncreas, cánceres de cerebro, neoplasias hematopoyéticas, retinoblastomas, melanomas, cánceres colorrectales, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, etc. (véase, *por ejemplo*, Sithanandam y Anderson (2008) Cancer Gene Ther. 15, 413-448).
 25 En general, HER3 se activa con frecuencia en EGFR, HER2, C-Met, y los cánceres que expresan FGFR1.

Una correlación entre la expresión de HER2/HER3 y el progreso de uno no-invasivo a una etapa invasiva se ha mostrado (Alimandi *et al.*, Oncogene 10, 1813-1821; DeFazio *et al.*, Cancer 87, 487-498; Naidu *et al.*, Br. J. Cancer 78, 1385-1390). Por lo
 30 tanto, HER3 se puede utilizar como un marcador de diagnóstico para la agresividad de tumor incrementada y la supervivencia escasa. La activación de HER3 sostenida de

PI3K/AKT se ha demostrado repetidamente para tener en cuenta la resistencia del tumor a los inhibidores de EGFR/HER2.

Aunque el papel de HER3 en el desarrollo y progreso del cáncer ha sido explorado (véase, *por ejemplo*, Horst *et al.* (2005) Int. J. Cancer 115, 519-527; Xue *et al.* (2006) Cancer Res. 66, 1418-1426), HER3 sigue siendo mayormente poco apreciado como un objetivo para la intervención clínica. La mayoría de las inmunoterapias actuales se centran principalmente en la inhibición la acción de HER2 y, en particular, la heterodimerización de complejos HER2/HER3 (véase, *por ejemplo*, Sliwkowski *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269, 14661-14665). Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar agentes inmunoterapéuticos mejorados que inhiben eficazmente la señalización de célula Mediada por HER3 que puede utilizarse para el diagnóstico, la predicción del pronóstico, y el tratamiento de una variedad de cánceres.

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La descripción proporciona moléculas de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales capaces de suprimir la actividad de HER3 en ambos ajustes de dependiente e independiente de ligando. En contraste, otros anticuerpos monoclonales anti-HER3 en la técnica (*por ejemplo*, Ab #6 (Publicación de Patente Internacional WO 2008/100624) y U1-59 (Publicación de Patente Internacional WO 2007077028; también referida aquí como AMG), sólo puede suprimir el actividad HER3 dependiente de ligando. También descritas están las moléculas unidad a anti-HER3 de afinidad madurada con un potencia incrementada y media vida extendida, que en consecuencia puede administrarse con menos frecuencia, en un intervalo de inter-dosis incrementado, y en volúmenes de dosis más pequeñas. La descripción también proporciona métodos de tratamiento de enfermedades como el cáncer en un sujeto humano que comprende la administración de una molécula de unión anti-HER3. En algunos aspectos específicos se utiliza un anticuerpo humano mutante YTE derivado de 2C2.

La descripción proporciona una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a un epítipo dentro del dominio extracelular de HER3, en donde la molécula de unión se une específicamente al mismo

epítopo HER3 como un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo que comprende la región variable de cadena pesada (VH) y la región variable de cadena ligera (VL) de CL16 o 2C2. También se proporciona una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3, e inhibe competitivamente HER3 que se une por un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo que comprende el VH y VL de CL16 o 2C2.

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

[FW₁]X₁GSX₂SNIGLNYVS[FW₂]RNNQRPS[FW₃]AAWDDX₃X₄X₅GEX₆

[FW₄] en donde [FW₁], [FW₂], [FW₃] y [FW₄] representan regiones de estructura VL, y en donde

- (a) X₁ representa residuos de aminoácido de la Arginina (R) o Serina (S),
- (b) X₂ representa residuos de aminoácidos Serina (S) o Leucina (L),
- (c) X₃ representa residuos de aminoácidos Serina (S) o Glicina (G),
- (d) X₄ representa residuos de aminoácidos Leucina (L) o Prolina (P),
- (e) X₅ representa residuos aminoácidos Arginina (R), Isoleucina (I), Prolina (P) o Serina (S), y
- (f) X₆ representa residuos de aminoácidos Valina (V) o Alanina (A).

Además, la descripción proporciona una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 que comprende un anticuerpo VH, en donde VH comprende la secuencia de aminoácidos:

[FW₅]YYMQ[FW₆]X₇IGSSGGVTNYADSVKG[FW₇]VGLGDAFDI[FW₈]

en donde [FW₅], [FW₆], [FW₇] y [FW₈] representan regiones de estructura VH, y en donde X₇ representa residuos de aminoácidos Tirosina (Y), Isoleucina (I) o Valina (V).

La descripción proporciona una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 que comprende un anticuerpo de VL y un anticuerpo VH, en donde VL comprende la secuencia de aminoácidos:

[FW₁]X₁GSX₂SNIGLNYVS[FW₂]RNNQRPS[FW₃]AAWDDX₃X₄X₅GEX₆ [FW₄]

en donde [FW₁], [FW₂], [FW₃] y [FW₄] representan regiones de estructura VL, y en donde

(a) X₁ representa residuos de aminoácido de la Arginina (R) o Serina (S),

(b) X₂ representa residuos de aminoácidos Serina (S) o Leucina (L),

5 (c) X₃ representa residuos de aminoácidos Serina (S) o Glicina (G),

(d) X₄ representa residuos de aminoácidos Leucina (L) o Prolina (P),

(e) X₅ representa residuos aminoácidos Arginina (R), Isoleucina (I), Prolina (P) o Serina (S), y

(f) X₆ representa residuos de aminoácidos Valina (V) o Alanina (A), y en

10 donde la VH comprende la secuencia de aminoácidos:

[FW₅]YYMQ[FW₆]X₇IGSSGGVTNYADSVKG[FW₇]VGLGDAFDI[FW₈]

en donde [FW₅], [FW₆], [FW₇] y [FW₈] representa regiones de estructura VH,

y en donde X₇ representa residuos de aminoácidos Tirosina (Y), Isoleucina (I) o Valina (V).

15 La descripción también proporciona una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 que comprende un anticuerpo de VL, en donde VL comprende una región-1 determinante de complementariedad VL (VL-CDR1) secuencia de aminoácidos idéntica a, o idénticas, excepto para cuatro, tres, dos o una sustituciones de aminoácidos en: SEQ ID NO: 18, 20 SEQ ID NO: 19, o SEQ ID NO: 20. También, la descripción proporciona una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 que comprende un anticuerpo de VL, en donde VL comprende una región-2 determinante de complementariedad VL (VL-CDR2) secuencia de aminoácidos idéntica a, o idéntica excepto de cuatro, tres, dos o una sustituciones de aminoácidos en SEQ ID NO: 25 21.

Además, la descripción proporciona una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 que comprende un anticuerpo de VL, en donde VL comprende una región-3 determinante de complementariedad (VL-CDR3) secuencia de aminoácidos idéntica a, o idéntica, excepto 30 para cuatro, tres, dos, una o sustituciones de aminoácidos a: SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28,

SEQ ID NO: 29, o SEQ ID NO: 30. Además, la descripción proporciona una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 que comprende un anticuerpo VH, en donde el VH comprende una región-1 determinante de complementariedad (VH-CDR1) secuencia de aminoácidos idéntica a, o
 5 idéntica excepto para cuatro, tres, dos, una o sustituciones de aminoácidos en SEQ ID NO: 31.

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

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

Además, la descripción proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 que comprende VL y VH que comprende VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 de aminoácidos de secuencias idénticas o idénticas a excepción de cuatro, tres, dos, una o

5 sustituciones de aminoácidos en una o más de las CDR en: SEQ ID NO: 18, 21, 22, 31, 32, y 35, SEQ ID NOS: 18, 21, 26, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 18, 21, 27, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 20, 21, 22, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 19, 21, 22, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 18, 21, 25, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 18, 21, 28, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 18, 21, 29, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 18, 21, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 18, 21, 23, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 19, 21,

10 23, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 20, 21, 23, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 18, 21, 24, 31, 32 y 35, o SEQ ID NO: 18, 21, 25, 31, 32 y 35, respectivamente. También se proporciona una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 que comprende un anticuerpo de VL y un anticuerpo VH, en donde VL comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90% a

15 aproximadamente 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17. La descripción también proporciona una molécula de unión aislada o fragmento de unión

20 de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 que comprende un anticuerpo de VL y Un anticuerpo VH, en donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90% a aproximadamente 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13. Además, la descripción proporciona un

25 anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3, en donde el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno comprende una VL que comprende una secuencia de al menos aproximadamente 90% a aproximadamente 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4,

30 SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17, y

en donde el fragmento de unión a anticuerpo o antígeno comprende una VH que comprende una secuencia de al menos aproximadamente 90% a aproximadamente 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

20 La **Figura 1** muestra la internalización de anticuerpos monoclonales anti-HER3 de Clon 16 en las células KPL4 mostradas como la reducción de la tinción fluorescente de superficie. El **Panel** superior muestra la internalización en el tiempo = 0. Los paneles inferiores muestran la internalización después de 2.5 horas.

La **Figura 2A** muestra una alineación de secuencia múltiple
25 correspondiente con las secuencias VL de anticuerpos monoclonales de anti-HER3 Clon 16 (CL16, clon padre, original), Clon 16 (GL; clon de línea germinal), 5H6, 8A3, 4H6, 6E.3, 2B11, 2D1, 3A6 y 4C4. Se indica la ubicación de CDR1, CDR2, y CDR3. Los residuos de aminoácidos que difieren con respecto al anticuerpo CL16 (GL) se destacan.

La **Figura 2B** muestra una alineación de secuencia múltiple
30 correspondiente con las secuencias VH de anticuerpos monoclonales de anti-HER3 Clon 16 (CL16, clon padre), y clones 15D12.1 (también referido como 15D12.I) y 15D12.2

(también referida como 15D12.V). Las ubicaciones de CDR1, CDR2, y CDR3 se indican. Los residuos de aminoácidos que difieren con respecto al anticuerpo padre CL16 se destacan.

La **Figura 2C** muestra una alineación de secuencia múltiple que
 5 corresponde a las secuencias de VL de anticuerpos monoclonales anti-HER3 CL16 (original, clon padre), CL16 (GL; clon de línea germinal), 1A4, 2C2, 3E.1, 2F10, y 2B11. Se indica la ubicación de CDR1, CDR2, y CDR3. Los residuos de aminoácidos que difieren con respecto al anticuerpo CL16 (GL) se destacan.

La **Figura 3** muestra la supresión de fosforilación HER3 (pHER3) en MCF-7
 10 células impulsadas por ligando, donde HER3 sólo se activa por HRG exógena (ligando). El anti-HER3 monoclonal 2C2, anticuerpos monoclonales anti-HER3 publicados anti-HER3 AMG y MM, y anticuerpo control R347 se analizaron. Se presentan los porcentajes máximos de inhibición pHER3 e IC_{50} .

La **Figura 4** muestra la supresión de crecimiento en células MDA-MB-175,
 15 un modelo impulsado de bucle HRG-autocrino establecido en donde el endógeno HRG activa HER3 y el crecimiento celular. Se analizaron los anticuerpos anti-HER3 monoclonales publicados anti-HER3 monoclonal 2C2, anti-HER3 AMG y MM, y anticuerpo control R347. Se presentan los porcentajes máximos de inhibición de crecimiento e IC_{50} .

La **Figura 5** muestra supresión de crecimiento en células HMCB, un
 20 modelo de activación de bucle autocrino-HRG establecido en donde el endógeno HRG activa la actividad HER3 y el crecimiento celular. El anti-HER3 monoclonal 2C2, anticuerpos monoclonales anti-HER3 publicados anti-HER3, AMG y MM, y anticuerpo control R347 se analizaron. Se presentan los IC_{50} .

La **Figura 6** muestra que 2C2 no sólo inhibe el crecimiento de células
 25 HMCB, sino también suprime la fosforilación HER3 (pHER3) y la fosforilación de AKT (pAKT) en este melanoma dependiente de ligando.

La **Figura 7** muestra que la fosforilación HER3 suprime 2C2 (pHER3) y la fosforilación AKT (pAKT) en el ligando dependiente A549 NSCLC.

La **Figura 8** muestra la supresión de fosforilación HER3 (pHER3) en
 30 modelos celulares para cáncer de Pulmón Gástrico y de Mama. El **Panel A** muestra la supresión de pHER3 en la línea celular HCC827, un modelo NSCLC EGFR impulsada

mutante con EGFR/HER3 diafonía. El **Panel B** muestra la supresión de pHER3 en un modelo HCC827 NSCLC de **EGFR-TKI**-resistente obtenido a través de un tratamiento a largo plazo con EGFR TKI. El **Panel C** muestra la supresión de pHER3 en la línea celular MKN45, un modelo de cáncer gástrico cMET-amplificado con diafonía cMET-HER3. El

5 **Panel D** muestra la supresión de pHER3 en la línea celular Kato III, un modelo de cáncer gástrico FGFR2-amplificado con diafonía FGFR2-HER3. El **Panel E** muestra la supresión de pHER3 en la línea celular BT-474, un modelo independiente de ligando cáncer de mama amplificado por HER2 (es decir, las células carecen de expresión HRG). El anti-HER3 monoclonal 2C2, anticuerpos monoclonales anti-HER3 publicados anti-HER3 y

10 AMG y MM, y el anticuerpo control R347 el control se analizaron. Se presentan los porcentajes máximos de inhibición pHER3 e IC₅₀.

La **Figura 9** muestra la supresión de la fosforilación de Akt (pAKT) en modelos celulares para cáncer gástrico y de mama. El **Panel A** muestra la supresión de pAKT en la línea celular MKN45. El **Panel B** muestra la supresión de pAKT en la línea

15 celular Kato III. El **Panel C** muestra la supresión de pAKT en la línea celular BT-474, un modelo independiente de ligando de cáncer de mama amplificado por HER2 (es decir, las células carecen de expresión HRG). El anti-HER3 monoclonal 2C2, anticuerpos monoclonales anti-HER3 publicados anti-HER3 AMG y MM, y los anticuerpos control R347 se analizaron. Se presentan los porcentajes máximos de inhibición pAKT e IC₅₀.

20 La **Figura 10** muestra 2C2 que suprime la señalización y proliferación celular en MDA-MB-361 células. El **Panel A** muestra que 2C2 suprime la fosforilación de HER3 (pHER3) en células MDA-MB-361 amplificadas por HER2. El **Panel B** muestra que el crecimiento celular suprimió 2C2 de una manera dependiente de dosis. El porcentaje de inhibición se muestra para tratamientos de 6 y 14 días (**Panel** superior e inferior,

25 respectivamente).

La **Figura 11** muestra que 2C2 suprime la fosforilación de HER3 (pHER3) en células HARA-B que expresan altos niveles de HRG.

La **Figura 12** muestra que 2C2 y rhuMab 2C4, pero no los antagonistas EGFR cetuximab o gefitinib, señalización dependiente de ligando inhibe HRG (parte

30 inferior de los **Paneles A y B**). La parte superior de los **paneles A y B** son las células basales, SW620 (**Panel A**, izquierdo), SW480 (**Panel A**, centro), Colo205 (Panel A,

derecha), LOVO (**Panel B**, izquierda), HCT15 (**Panel B**, medio) y Caco-2 (**Panel B**, derecha).

La **Figura 13** muestra un ensayo de unión de HRG-HER3 ELISA que mide el bloqueo directo de la unión de HRG a HER3 por el Clon 16, publicado AMG y MM anticuerpos monoclonales anti-HER3, anticuerpos monoclonales de ligando de bloqueo anti-HER3 control positivo, y el anticuerpo control R347.

La **Figura 14** muestra dimerización HER2-HER3 de bloques 2C2. El **Panel A** muestra el ensayo de dimerización **HER2-HER3** que evalúa el grado de formación del complejo **HER2-HER3** en las células T-47D, un modelo dependiente de ligando muestra la asociación **HER2-HER3** inducida por HRG, pre-tratados con 2C2, Anticuerpos monoclonales CL16, AMG y MM anti-HER3. Todos los anticuerpos anti-HER3 comandos esta inducida por ligando de **HER2-HER3** dimerización. El **Panel B** muestra un ensayo de dimerización **HER2-HER3** de ligando-independiente que evalúa el grado de **HER2-HER3** compleja formación en Células BT-474, pre-tratadas con 2C2 o CL16 bloquearon este dimerización HER2-HER3 independiente ligando.

La **Figura 15** muestra la internalización HER3 y la degradación inducida por 2C2. El **Panel A** muestra un ensayo de internalización basado en FACS que cuantifica el curso de tiempo y el grado de internalización objeto en respuesta a dos concentraciones de anticuerpos monoclonales 2C2 diferentes. El **Panel B** muestra la degradación de HER3 en células de cáncer colorrectal modelo Lovo, HCT15, y SW620 tratadas previamente con anticuerpo monoclonal anti-HER3 2C2, o el anticuerpo control R347.

La **Figura 16** muestra un análisis del ciclo celular basado en FACS que demuestra que en las células SKBR3, una línea celular de cáncer de mama amplificado por HER2 similar a BT-474, tanto Herceptin® (trastuzumab) y el anticuerpo monoclonal CL16 (conductor original para el anticuerpo monoclonal 2C2) causó la detención del ciclo celular en la fase G1. Resultados correspondientes a las células tratadas con el anticuerpo control R347 y con el anticuerpo monoclonal anti-HER2 de rhuMAb 2C4 (pertuzumab/Omnitarg®) también se muestran.

La **Figura 17** muestra la inhibición de la secreción VEGF Inducida HRG por los anticuerpos anti-HER3. El **Panel A** muestra los cambios en la secreción de VEGF en

células de cáncer de mama BT-474 pretratadas con anticuerpos CL16 monoclonales anti-HER3 y Merrimack MM, anticuerpo monoclonal anti-HER2 Herceptin® (trastuzumab), o el anticuerpo control R347. El **Panel B** muestra los cambios en la secreción de VEGF en las células de cáncer de mama modelo MCF-7 pretratadas con anticuerpos monoclonales anti-HER3 CL16 y Merrimack MM, anticuerpo anti-HER2 monoclonal Herceptin® (trastuzumab), o el anticuerpo control R347.

La **Figura 18** muestra que el anticuerpo 2C2 monoclonal anti-HER3 se une a la superficie celular basada en cysin HER3 ectópicamente expresada en células Ad293 y modula su actividad. El **Panel A** muestra un análisis de transferencia Western de las células Ad293 transfectadas con un vector de control (lado izquierdo) o un vector que expresa cysin HER3 (lado derecho). Las células se trataron con 2C2 o un anticuerpo control (R347) con o sin la co-estimulación con HRG y se sondaron con blot (parte inferior) anticuerpos anti-HER3 (transferencia intermedia), anti-pHER3 (transferencia superior), y anti-GAPDH. El **Panel B** representa la cuantificación basada en la densitometría de pHER3 en los cuatro carriles del **Panel A**

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

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

La **Figura 21** muestra el beneficio anti-tumoral de una dosis de carga de 10 mg/kg del anticuerpo monoclonal 2C2 utilizando el modelo de xenoinjerto de cabeza y

cuello de la FADU humana. La administración de una dosis de carga de 2C2 para saturar el sumidero habilitado 2C2 para ratón HER3 3mg/kg para demostrar una fuerte actividad anti-tumor, mientras que 3 mg/kg de 2C2 y sin una dosis de carga tiene sólo una actividad modesta.

5 La **Figura 22** muestra que el tratamiento con 2C2-YTE reduce los niveles de pHER3 y pAKT en extractos de tumor de xenoinjerto FADU. En este experimento los niveles de pHER3 y pAKT se redujeron en 59.5% y 51.7%, respectivamente. Ningún cambio se observó en los niveles totales de HER3 en este experimento.

10 La **Figura 23** muestra una reducción dependiente de dosis en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal 2C2 utilizando el modelo de xenoinjerto de cabeza y cuello Detroit562 humano. El **Panel A** muestra que 10 mg/kg de 2C2 administrado dos veces por semana se maximizó eficazmente en 72% dTGI. El **Panel B** muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración combinada del anticuerpo monoclonal 2C2 con el cetuximab anticuerpo
15 monoclonal anti-EGFR utilizando modelo de xenoinjerto de cabeza y cuello Detroit562 humano. El tratamiento combinado produjo 9 de cada 10 regresiones parciales mientras cetuximab sola produjo 5/10 de regresiones parciales. El modelo de xenoinjerto Detroit562 contiene una mutación PIK3CA.

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

25 La **Figura 25** muestra una reducción dependiente de dosis en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal 2C2 utilizando el modelo de xenoinjerto de A549NSCLC humano. El **Panel A** muestra que 30 mg/kg de 2C2 administrado dos veces por semana fue de manera máxima eficaz en dTGI al 91% hasta el último día de la fase de tratamiento (día 33; después del rebrote). 2C2-YTE y 2C2 tanto a 10 mg/kg tienen una actividad comparable. El **Panel B** muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración combinada del anticuerpo monoclonal 2C2 con el cetuximab anticuerpo monoclonal anti-EGFR utilizando el modelo de
30 xenoinjerto de NSCLC humano A549. La adición de cetuximab a 2C2 aumentó la actividad de 2C2 durante la fase de tratamiento y el retraso en el nuevo crecimiento del

tumor durante la fase de crecimiento tumoral. El modelo de xenoinjerto A549 contiene una mutación KRAS y una supresión LKB-1.

La **Figura 26** muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal 2C2-YTE utilizando el modelo de xenoinjerto de carcinoma de célula escamosa HARA-B humana. 30 mg/kg de 2C2-YTE administrado dos veces por semana fue de manera máxima eficaz en 64.6% dTGI. 2C2-YTE a 10 mg/kg no tuvo actividad comparable mientras 2C2-YTE en 3 mg/kg no fue activo.

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

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

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

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

La **Figura 31** muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal 2C2 utilizando el modelo de xenoinjerto ortotópico de cáncer de mama BT-474 humano. El **Panel A** muestra 30 mg/kg de 2C2

administrado dos veces por semana fue de manera máxima eficaz en dTGI al 55%. El **Panel B** muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración combinada del anticuerpo monoclonal 2C2 con lapatinib del fármaco de molécula pequeña utilizando el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama ortotópico BT-474 humano. La adición de 2C2 en lapatinib aumentó la actividad de lapatinib durante la fase de tratamiento y modestamente retrasó el nuevo crecimiento del tumor durante la fase de crecimiento tumoral. 2C2-YTE y 2C2 tanto a 30 mg/kg tienen una actividad comparable durante la fase de tratamiento como tratamientos monoeficaces. El **Panel C** muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración del anticuerpo monoclonal 2C2 que utiliza el modelo de xenoinjerto ortotópico de cáncer de mama BT-474 humano. Trastuzumab solo fue muy activo en este modelo y poca mejora fue visto por la adición de 2C2 en este modelo. El modelo de xenoinjerto BT-474 contiene HER2 amplificado (3+ por HercepTest).

La **Figura 32** muestra que el tratamiento con Clon 16 (2C2 precursor) reduce los niveles de pHER3 y pAKT en extractos de tumor de xenoinjerto BT-474. En este experimento los niveles fueron de pHER3 y pAKT se redujeron en un 50% y 46.1%, respectivamente. Ningún cambio se observó en los niveles totales de HER3 en este experimento.

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

La **Figura 34** muestra una reducción en el volumen del tumor después de la administración de 2C2-YTE utilizando el modelo de xenoinjerto ortotópico de cáncer de mama MDA-MB-361 humano (**Paneles A-C**). La adición de 2C2-YTE en el anticuerpo

monoclonal trastuzumab aumentó la actividad de trastuzumab durante la fase de tratamiento y el retraso en el nuevo crecimiento del tumor durante la fase de crecimiento tumoral (**Panel A**). La adición de 2C2-YTE al anticuerpo monoclonal de rhuMAb 2C4 aumentó moderadamente la actividad de rhuMAb 2C4 pero no retrasó el nuevo
5 crecimiento de los tumores (**Panel B**). La adición de 2C2-YTE en el lapatinib de fármaco de molécula pequeño aumenta la actividad de lapatinib, pero no tardó el nuevo crecimiento de los tumores (**Panel C**).

La **Figura 35** muestra los niveles de exposición prolongada del anticuerpo monoclonal 2C2-YTE en el suero de los ratones transgénicos FcRn SCID humanos naïve en comparación con 2C2 y Clon 16-GL después de una dosis única de estos anticuerpos
10 a 60 mg/kg.

La **Figura 36** muestra los niveles de proteína HER3 aumentada en respuesta al tratamiento con el inhibidor MEK (MEKi) selumetinib (indicado por una estrella). El tratamiento con el MEKi en combinación con 2C2 reduce los niveles de HER3
15 regresando a la normalidad en los modelos de cáncer de células HT-29 (izquierda), LOVO (centro) y Colo205 (derecha). Los niveles de pHER3 También se examinaron en los modelos HT-29 y LOVO y mostraron responder de manera similar.

La **Figura 37** muestra que la combinación de 2C2-YTE y selumetinib aumenta la eficacia anti-tumoral de cualquier agente solo en modelos de xenoinjerto de
20 cáncer de subcutáneos y A549 (**Panel A**, superior), HT-29 (**Panel B**, superior), LOVO (**Panel C**, superior). Análisis de transferencia Western de lisatos tumorales (A549, modelos xenoinjerto HT-29 y LOVO) de los ratones tratados con la combinación mostrada que fosfo-HER3 y fosfo-ERK se inhibieron por completo (**Paneles A-C**, inferior).

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona moléculas y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a HER3. En algunos aspectos, tales moléculas son anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a HER3. También se proporcionan los polinucleótidos relacionados, las
30 composiciones que comprenden los anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y métodos de fabricación de los anticuerpos anti-HER3 y

fragmentos de unión a antígeno. Los métodos de uso de los nuevos anticuerpos anti-HER3, tales como métodos de tratamiento de cáncer en un sujeto y usos de diagnóstico, se proporcionan además.

Con el fin de que la presente invención puede ser entendida más fácilmente, ciertos términos se definen primero. Las definiciones adicionales se establecen a lo largo de la descripción detallada.

I. Definiciones

Antes de describir la presente invención en detalle, se debe entender que esta invención no se limita a las composiciones específicas o etapas del proceso, tal como puede variar. Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “una” y “el” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Los términos “un” (o “una”), así como los términos “una o más”, y “al menos uno” pueden utilizarse indistintamente en el presente documento.

Por otra parte, “y/o”, donde se usa en la presente se tomará como una descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin los otros. Por lo tanto, el término “y/o”, como se usa en una frase tal como “A y/o B” en el presente documento se pretende que incluya “A y B”, “A o B”, “A” (solo), y “B”. (solo). Del mismo modo, el término “y/o”, como se usa en una frase tal como “A, B, y/o C” pretende abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B, y C; A, B, o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo), B (solo), y C (solos).

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica el que que esta descripción se relaciona. por ejemplo, el Diccionario Conciso de Biomedicina y Biología Molecular, Juo, Pei-Show, 2nd ed, 2002, CRC Press; El Diccionario de Biología Celular y Molecular, 3rd ed, 1999, Academic Press.; y el Diccionario de Oxford de Bioquímica y Biología Molecular, revisada, 2000, Oxford University Press, proporcionar a una persona con experiencia con un diccionario general de muchos de los términos usados en esta invención.

Unidades, prefijos y símbolos se representan en su forma aceptada

Système International de Unites (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el rango. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación de amino a carboxi. Los encabezamientos proporcionados en la presente no son limitaciones de los diversos aspectos, que se pueden tener mediante referencia a la especificación como un todo. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente a continuación están más definidos plenamente por referencia a la descripción en su totalidad.

Se entiende que, en cualesquier aspectos se describen en el presente documento con el lenguaje “que comprende”, contrario a los aspectos análogos descritos en los términos de “que consiste de” y/o “que consiste esencialmente de” también se proporcionan.

Los aminoácidos se denominan en la presente por cualquiera de sus comúnmente conocidos símbolos de tres letras o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Los nucleótidos, del mismo modo, se refieren por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

Los términos “HER3” y “receptor de HER3” se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a la proteína Erbb3 (también conocido como receptor de HER3, Erbb3 en la literatura) como se describe en la Patente E.U. No. 5,480,968 y en Plowman *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU. 87, desde 4905 hasta 4909; véase también, Kani *et al.* (2005) Biochemistry 44, 15842 a 15857, y Cho & Leahy (2002), Science 297, 1330-1333. La secuencia de proteína madura HER3, de longitud completa, (sin secuencia líder) corresponde a la secuencia que se muestra en la **Figura 4** y SEQ ID NO: 4 de la Patente E.U. No. 5,480,968 menos la secuencia líder de 19 aminoácidos que se divide de la proteína madura.

Los términos “inhibición” y “supresión” se utilizan indistintamente en la presente y se refieren a cualquier disminución estadísticamente significativa en la actividad biológica, incluyendo el bloqueo completo de la actividad. por ejemplo, “inhibición” se puede referir a una disminución de aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de la actividad biológica. Por consiguiente, cuando los términos “inhibición” o “supresión” se aplican para describir, por ejemplo, un

efecto sobre ligando mediada por fosforilación de HER3, el término se refiere a la capacidad de un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo para disminuir estadística y significativamente la fosforilación de HER3 inducida por un ligando de similar a EGF, con relación a la fosforilación en una célula (control) no tratada. La célula que expresa HER3 puede ser una célula de origen natural o línea celular (*por ejemplo*, una célula de cáncer) o puede ser producida de forma recombinante mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica HER3 en una célula huésped. En un aspecto, la molécula de enlace de anti-HER3, por ejemplo, un fragmento, anticuerpo o antígeno de unión del mismo inhibe la fosforilación mediada por ligando de HER3 por lo menos 10%, o al menos 20%, o al menos 30%, o al menos 40%, o al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o aproximadamente 100%, como se determina, por ejemplo, mediante transferencia Western seguida por el sondeo con un anticuerpo anti- fosfotirosina o por ELISA, como se describe en los Ejemplos *infra*.

El término “supresión del crecimiento” de una célula que expresa HER3, como se usa aquí, se refiere a la capacidad de la molécula de unión anti-HER3, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo para disminuir estadística y significativamente la proliferación reducida de una célula que expresa HER3 con respecto a la proliferación en ausencia de la molécula de unión anti-HER, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno. En un aspecto, la proliferación de una célula que expresa HER3 (*por ejemplo*, una célula de cáncer) puede disminuirse por al menos 10%, o al menos 20%, o al menos 30%, o al menos 40%, o al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o aproximadamente 100% cuando se ponen en contacto las células con una molécula de unión anti-HER3, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de la presente invención, en relación con la proliferación medida en ausencia de la molécula de unión anti-HER3, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo (condiciones de control). La proliferación celular se puede ensayar utilizando técnicas reconocidas en la técnica con la proporción medida de la división celular, la fracción de células dentro de una población de células que se somete a la división celular, y/o la tasa de pérdida de células de una población de células debido a la diferenciación terminal o la muerte celular (*por ejemplo*, incorporación de timidina).

Los términos “anticuerpo” o “inmunoglobulina”, como se usa indistintamente en la presente, incluyen anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión de antígeno o cadenas simples de ella.

Un anticuerpo típico comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2, y CH3. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructura (FW). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FW, dispuestas desde el extremo amino-terminal a carboxi-terminal en el siguiente orden: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos huésped o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (*por ejemplo*, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Anticuerpos ejemplares de la presente descripción incluyen el Clon 16 (CL16) anticuerpos anti-HER3 (original y a la línea germinal), de afinidad clones optimizadas incluyendo, por ejemplo, el anticuerpo 2C2 anti-HER3, y anticuerpos anti-HER3 optimizados por la vida media en suero, incluyendo por ejemplo el anticuerpo 2C2 anti-HER3.

El término “en línea germinal” significa que los aminoácidos en las posiciones específicas de un anticuerpo se mutan de nuevo a los de la línea germinal. por ejemplo, el anticuerpo en “línea germinal” se genera a partir del anticuerpo CL16 original mediante la introducción de tres mutaciones en tres punto, Y2S, E3V y M20I, en FW1 de las regiones VL.

El término “anticuerpo” significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a un objetivo, tal como una proteína, polipéptido,

péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido, o combinaciones de lo anterior a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa aquí, el término “anticuerpo” abarca anticuerpos intactos policlonales, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv), Fv de cadena sencilla (scFv), los mutantes de anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, las proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación de antígeno de un anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno tanto tiempo como los anticuerpos exhiben la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, o subclases (isotipos) de los mismos (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2), sobre la base de la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada conocidos como alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen diferentes y bien conocidas estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales. Los anticuerpos pueden ser desnudos o conjugados a otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, etc.

Un anticuerpo “bloqueante” o un anticuerpo “antagonista” es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno que se une, tal como HER3. En un cierto aspecto los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. Deseablemente, la actividad biológica se reduce en un 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, o incluso 100%.

El término “anticuerpo HER3” o “un anticuerpo que se une a HER3” o “anti-HER3” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a HER3 con afinidad suficiente tal que el anticuerpo es útil tal como un agente terapéutico o reactivo de diagnóstico en el ensayo de HER3 objetivo. El magnitud de la unión de un anticuerpo anti-HER3 a una proteína no relacionada, sin HER3 es menor que aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo a HER3 como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoensayo (RIA), BIACORE™ (utilizando HER3 recombinante como el analito y el anticuerpo como ligando, o *vice versa*), o de otros ensayos de unión conocidos en la técnica. En ciertos aspectos, un

anticuerpo que se une a HER3 tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ pM}$, $\leq 1 \text{ pM}$ o $< 0.1 \text{ pM}$.

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

Un “anticuerpo monoclonal” se refiere a una población homogénea de anticuerpos implicados en el reconocimiento altamente específico y la unión de un único determinante antigénico, o epítipo. Esto es en contraste a los anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra los diferentes determinantes antigénicos. El término “anticuerpo monoclonal” abarca tanto anticuerpos intactos y monoclonales de longitud completa, así como fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), de cadena sencilla (scFv) mutantes, proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo porción, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, “anticuerpo monoclonal” se refiere a tales anticuerpos producidos en cualquier número de formas incluyendo, pero no limitados a, por hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, y animales transgénicos.

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

humana que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

El anticuerpo humanizado se puede modificar aún más por la sustitución de residuos adicionales ya sea en la región de estructura Fv y/o dentro de los residuos no humanos remplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad, y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos o tres, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden con la inmunoglobulina no humana mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Ejemplos de métodos utilizados para generar anticuerpos humanizados se describen en la Patente E.U. Nos. 5,225,539 y 5,639,641.

Una “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea solo o en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten cada uno en cuatro regiones estructurales (FW) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDRs en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FW y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos. Existen por lo menos dos técnicas para determinar CDRs: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia de especies cruzadas (*por ejemplo*, Kabat *et al.* Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico, (5th ed, 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); y (2) un enfoque basado en los estudios de cristalografía de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani *et al.* (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). Además, las combinaciones de estos dos enfoques se utilizan a veces en la técnica para determinar CDRs.

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

Institutes of Health, Bethesda, Md (1991)).

La numeración de la posición de aminoácidos como en Kabat, se refiere al sistema de numeración utilizado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991). El uso de este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal actual puede contener menos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento de, o inserción en, un FW o CDR del dominio variable. por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una inserción de un solo aminoácido (residuo 52a de acuerdo a Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (*por ejemplo*, los residuos 82a, 82b, y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de la cadena pesada FW.

15

TABLA 1

20

Bucle	Kabat	AbM	Cotia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32-34
		(Numeración Kabat)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(Numeración Cotia)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

25

La numeración de Kabat de los residuos se puede determinar por un anticuerpo dado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat “estándar”. Cotia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). El final del bucle de CDR de Chothia-H1 cuando se numera utilizando la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 en función de la longitud del

30

bucle (esto es porque el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B están presentes, el bucle termina en 32, si sólo está presente 35A, el bucle termina en 33; si ya sea 35A y 35B están presentes, el bucle termina a 34). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se utilizan por el software de modelado anticuerpo AbM de Oxford Molecular.

IMGT (inmunogenética) también proporciona un sistema de numeración para las regiones variables de inmunoglobulina, incluyendo las CDR. Véase, por ejemplo, Lefranc, M. P. *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27: 55-77 (2003), que se incorpora en la presente para referencia. El sistema de numeración IMGT se basó en una alineación de más de 5,000 secuencias, datos estructurales, y caracterización de bucles hipervariables y permite una fácil comparación de las regiones variables y CDR para todas las especies. De acuerdo con el esquema de numeración VH-CDR1 de IMGT está en unas posiciones 26 a 35, VH-CDR2 está en unas posiciones 51 a 57, VH-CDR3 está en las posiciones 93 a 102, VL-CDR1 está en unas posiciones 27 a 32, VL-CDR2 está en unas posiciones 50 a 52, y VL-CDR3 está en unas posiciones 89 a 97.

Tal como se utiliza en la descripción las secuencias CDR de VH descritas corresponden a las ubicaciones de numeración de Kabat clásicos, a saber, Kabat VH-CDR1 está en unas posiciones 31-35, VH-CDR2 está en unas posiciones 50-65, y VH-CDR3 está en unas posiciones 95-102. VL-CDR2 y CDR3 de VL-también corresponden a la numeración de Kabat clásica lugares, a saber, las posiciones 50-56 y 89-97, respectivamente. Como se usa en la presente, los términos “VL CDR1-” o “CDR1 de cadena ligera” corresponden a secuencias localizadas en las posiciones 23-34 de Kabat en la VL (en contraste, la ubicación clásica VL-CDR1 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat corresponde a las posiciones 24-34).

Como se usa en el presente documento la región Fc incluye los polipéptidos que comprenden la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de la región constante de inmunoglobulina. Por lo tanto Fc se refiere a los últimos dos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgA, IgD, e IgG, y los últimos tres dominios de la inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y la bisagra flexible N-terminal en estos dominios. Para Fc de IgA e IgM pueden incluir la cadena J. Para IgG,

Fc comprende dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cy2 y Cy3) y la bisagra entre Cgamma1 (Cyl) y Cgamma2 (Cy2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada IgG humana se define generalmente a comprender residuos C226 o P230 en su extremo carboxilo terminal, en donde la

5 numeración es de acuerdo a el índice EU como se establece en Kabat (Kabat *et al.*, Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico, 5th Ed. Public Health Services, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (1991)). Fc puede referirse en esta región en el aislamiento, o esta región en el contexto de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína de fusión Fc. Los polimorfismos se han observado en un número de

10 diferentes posiciones de Fc, incluyendo pero no se limitan a las posiciones 270, 272, 312, 315, 356, y 358 de acuerdo con la numeración por el índice de la UE, y por lo tanto ligeras diferencias entre la secuencia y las secuencias en la técnica anterior puede existir.

El término “anticuerpo humano” significa un anticuerpo producido por un humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente con un

15 anticuerpo producido por un ser humano realizado utilizando cualquier técnica conocida en la técnica. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, los fragmentos de los mismos, y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido humano pesada y/o de cadena ligera tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera de murina y de cadena pesada

20 humana.

El término “anticuerpos quiméricos” se refiere a anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Típicamente, la región variable de tanto las cadenas ligera y pesada corresponde a la región variable de los anticuerpos derivados de una especie de

25 mamíferos (*por ejemplo*, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otra (normalmente humano) para evitar provocar una respuesta inmune en esas especies.

Los términos “YTE” o “YTE mutante” se refieren a una mutación en IgG1 Fc

30 que resulta en un aumento en la unión a FcRn humano y mejora la vida media en el suero del anticuerpo que tiene la mutación. Un mutante YTE comprende una combinación de

tres mutaciones, M252Y/S254T/T256E, (EU numbering Kabat *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, DC (1991)) introducidas en una cadena pesada de un IgG1. Véase Patente E.U. No. 7,658,921, la cual se incorpora en la presente para referencia. Se ha demostrado
5 que el mutante YTE aumenta la vida media en el suero de los anticuerpos aproximadamente cuatro veces en comparación con las versiones de tipo silvestre del mismo anticuerpo (Dall'Acqua *et al.*, J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006)). Véase también la patente E.U. No. 7,083,784, que se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

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

La “Potencia” normalmente se expresa como un valor de IC_{50} , en nM a
25 menos que se indique lo contrario. IC_{50} es la concentración inhibitoria mediana de una molécula de anticuerpo. En los ensayos funcionales, IC_{50} es la concentración que reduce una respuesta biológica en un 50% de su máximo. En los estudios de unión a ligando, IC_{50} es la concentración que reduce la unión al receptor mediante 50% del nivel de unión específico máximo. IC_{50} se puede calcular por cualquier número de medios conocidos en
30 la técnica. La mejora en la potencia puede determinarse al medir, por ejemplo, contra el anticuerpo monoclonal padre CL16 (Clon 16).

La mejora en las veces en la potencia de los anticuerpos o polipéptidos de la invención en comparación con un anticuerpo Clon 16 puede ser al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 4-veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, por lo menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 110 veces, al menos aproximadamente 120 veces, al menos aproximadamente 130 veces, al menos aproximadamente 140 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 160 veces, al menos aproximadamente 170 veces, o al menos aproximadamente 180 veces o más.

“Citotoxicidad mediada por la célula dependiente de los anticuerpos” o “ADCC” se refiere a una forma de citotoxicidad en cual Ig secretada se une a los receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (*por ejemplo*, células Natural Killer (NK), neutrófilos, y macrófagos) permiten a estas células efectoras citotóxicas unirse específicamente a una célula objeto que porta el antígeno y posteriormente destruye la célula objeto con citotoxinas. Los anticuerpos IgG de alta afinidad específicos dirigidos a la superficie de las células objeto “agrupan” las células citotóxicas y son absolutamente necesarias para tal matanza. La lisis de la célula objeto es extracelular, requiere el contacto directo célula-a-célula, y no implica complemento. Se contempla que, además de los anticuerpos, otras proteínas comprenden las regiones Fc, específicamente las proteínas de fusión Fc, que tienen la capacidad de unirse específicamente a una célula objeto que lleva un antígeno será capaz de efectuar la citotoxicidad mediada por las células. Por simplicidad, la citotoxicidad mediada por las células resultante de la actividad de una proteína de fusión Fc se denomina también en la presente como la actividad de ADCC.

Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o la composición que se “aísla” es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o una composición que está en una forma que no se encuentra en la naturaleza. Los

polipéptidos aislados, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células o composiciones incluyen aquellos que se han purificado a un grado que ya no están en una forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunos aspectos, un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula, o la composición que se aísla es sustancialmente pura.

5 El término “sujeto” se refiere a cualquier animal (*por ejemplo*, un mamífero), incluyendo, pero no limitado a seres humanos, primates no humanos, roedores, y similares, que serán los destinatarios de un tratamiento en particular. Típicamente, los términos “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente en la presente en referencia a un sujeto humano.

10 El término “composición farmacéutica” se refiere a una preparación la cual está en la forma para permitir que la actividad biológica del ingrediente activo sea efectiva, que contiene componentes no adicionales que son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administra la composición. Tal composición puede ser estéril.

Una “cantidad efectiva” de un anticuerpo como se describe en la presente
15 es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito establecido específicamente. Una “cantidad efectiva” puede determinarse empíricamente y de una manera rutinaria, en relación con el propósito establecido.

El término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de un anticuerpo u otro fármaco efectivo para “tratar” una enfermedad o trastorno en un
20 sujeto o mamífero.

La palabra “etiqueta” cuando se utiliza en la presente se refiere a un compuesto o composición detectable la cual se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo para generar un anticuerpo “etiquetado”. La etiqueta puede ser detectable por sí misma (*por ejemplo*, etiquetas de radioisótopo o etiquetas fluorescentes) o, en el caso
25 de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato la cual es detectable.

Términos tales como “tratar” o “tratamiento” o “para tratar” o “aliviar” o “para aliviar” se refieren tanto a (1) medidas terapéuticas que curan, demoran, atenúan los síntomas de, y/o interrumpe la progresión de una condición patológica o trastorno
30 diagnosticado, como a (2) medidas profilácticas o preventivas que impiden y/o retrasan el desarrollo de una condición patológica o trastorno específico. Por lo tanto, aquellos en

necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos en los cuales el trastorno se va a evitar. En ciertos aspectos, un sujeto es “tratado” exitosamente para cáncer de acuerdo con los métodos de la presente invención si el paciente muestra, por ejemplo, remisión total,
 5 parcial, o transitoria de un cierto tipo de cáncer.

Los términos “cáncer”, “tumor”, “canceroso”, y “maligno” se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cánceres incluyen pero no se limitan a, carcinoma incluyendo los adenocarcinomas, linfomas, blastomas, melanomas, sarcomas,
 10 y leucemias. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen el cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin y de no Hodgkin, cáncer de páncreas, glioblastoma, glioma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, tales como carcinoma hepático y hepatoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama (incluyendo
 15 cáncer de mama hormonalmente mediada, véase, por ejemplo, Innes *et al.* (2006) Br. J. Cancer 94:1057-1065), del cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, mieloma (tal como mieloma múltiple), carcinoma de glándula salival, cáncer del riñón tal como carcinoma de células renales y tumores de Wilms, carcinoma de células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer testicular,
 20 cáncer de esófago, diversos tipos de cáncer de cuello y cabeza y cánceres de origen mucinosos, tales como, cáncer de ovario mucinoso, colangiocarcinoma (hígado) y el carcinoma papilar renal.

Como se usa en la presente, el término “carcinomas” se refiere a los cánceres de células epiteliales, que son células que cubren la superficie del cuerpo,
 25 producen hormonas, y conforma glándulas. Ejemplos de carcinomas son cánceres de piel, de pulmón, de colon, de estómago, de mama, de próstata y de glándula tiroides.

El término “mutación de KRAS”, como se usa en la presente, se refiere a mutaciones encontradas en ciertos cánceres en un homólogo humano del oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten v-Ki-ras2. Ejemplos no limitantes de secuencias de ARNm del
 30 gen KRAS humano incluyen los números de Acceso de GenBank NM004985 y NM033360. Se ha informado que las mutaciones de KRAS se encuentran en 73% de los

tumores pancreáticos, 35% de los tumores colorrectales, 16% de los tumores de ovario y 17% de los tumores de pulmón. Mutación KRAS generalmente ocurren en codones 12 ó 143 del gen KRAS humano.

El “polinucleótido”, o “ácido nucleico”, como se usan indistintamente en la presente, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos referidos en la presente, incluyendo ARN y ADN.

El término “vector” significa una construcción, la cual es capaz de suministrar, y en algunos aspectos, expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, vectores de plásmido, cósmido o fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y ciertas células eucarióticas, tales como células productoras.

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

Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad” en el contexto de dos o

más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son los mismos, cuando se comparan y se alinean (introduciendo espacios, si es necesario) para una correspondencia máxima, sin considerar ninguna
 5 sustitución de aminoácidos conservadora como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad puede medirse utilizando software de comparación de secuencia o algoritmos o mediante inspección visual. Se conocen en la técnica diversos algoritmos y software que puede utilizarse para obtener alineamientos de secuencias de aminoácidos o de nucleótidos.

10 Un ejemplo no limitante de un algoritmo de alineación de secuencias es el algoritmo descrito en Karlin *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268, como se modifica en Karlin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877, y se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST (Altschul *et al.*, 1991, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402). En ciertos aspectos, Gapped BLAST puede utilizarse como se describe en Altschul *et al.*,
 15 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. BLAST- 2, WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology*, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) o Megalign (DNASTAR) son programas de software adicionales disponibles al público los cuales pueden utilizarse para alinear las secuencias. En ciertos aspectos, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina
 20 utilizando el programa GAP en el paquete de software GCG (por ejemplo, utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de espacio de 40, 50, 60, 70, o 90 y un peso de longitud de 1, 3, 4, 5, o 6). En ciertos aspectos alternativos, el programa GAP en el paquete de software GCG, el cual incorpora el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48): 444-453 (1970)) puede utilizarse para determinar el porcentaje de identidad
 25 entre dos secuencias de aminoácidos (por ejemplo, utilizando una matriz BLOSUM 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5). Alternativamente, en ciertos aspectos, el porcentaje de identidad entre las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Myers y Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)). por ejemplo, el porcentaje de identidad
 30 puede determinarse utilizando el programa ALIGN (versión 2.0) y utilizando una PAM120 con tabla de residuos, una penalización por longitud de espacio de 12 y una penalización

por espacio de 4. Parámetros apropiados para el alineamiento máximo por el software de alineamiento particular, puede determinarse por alguien con experiencia en la técnica. En ciertos aspectos, se utilizan los parámetros por defecto del software de alineación.

En ciertos aspectos, el porcentaje de identidad “X” de una primera
 5 secuencia de aminoácidos a una segunda secuencia de aminoácidos se calcula como $100 \times (Y/Z)$, donde Y es el número de residuos de aminoácidos identificados como correlaciones idénticas en la alineación de las primera y segunda secuencias (como se alinea por inspección visual o un programa de alineación de secuencia particular) y Z es el número total de residuos en la segunda secuencia. Si la longitud de una primera
 10 secuencia es más larga que la segunda secuencia, el porcentaje de identidad de la primera secuencia a la segunda secuencia será mayor que el porcentaje de identidad de la segunda secuencia a la primera secuencia.

Una “sustitución de aminoácidos conservadora” es una en la cual un residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena
 15 lateral similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, aspargina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina,
 20 valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina para una tirosina es una sustitución conservadora. En ciertos aspectos, las sustituciones conservadoras en las secuencias de los polipéptidos y
 25 anticuerpos de la invención no anulan la unión del polipéptido o anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos, para el o los antígenos, es decir, la HER3 a la cual el polipéptido o anticuerpo se une. Métodos para identificar sustituciones conservadoras de nucleótidos y aminoácidos las cuales no eliminan la unión al antígeno son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell *et al.*, *Biochem* 32: 1180-1 187 (1993);
 30 Kobayashi *et al.*, *Protein Eng.* 12 (10):879-884 (1999); y Burks *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

El término “secuencia consenso” como se usa en la presente con respecto a las regiones variables de cadena ligera (VL) y cadena pesada (VH), se refiere a una secuencia de VL o VH compuesta o genérica definida, basada en la información en cuanto a cuales residuos de aminoácidos dentro de la cadena VL o VH son susceptibles a
5 modificación sin detrimento de la unión al antígeno. Por lo tanto, en una “secuencia consenso” para una cadena VL o VH, ciertas posiciones de aminoácidos se encuentran ocupadas por uno de múltiples residuos de aminoácidos posibles en esa posición. por ejemplo, si se presenta una arginina (R) o una serina (S) en una posición particular, entonces esa posición particular dentro de la secuencia de consenso puede ser ya sea
10 arginina o serina (R o S). Secuencias de consenso para VH y VL de la cadena pueden definirse, por ejemplo, por la maduración de afinidad *in vitro* (por ejemplo, la aleatorización de cada posición de aminoácido en una cierta CDR utilizando los cebadores de codificación degenerados), por la mutagénesis de barrido (por ejemplo, mutagénesis de barrido de alanina) de aminoácido residuos dentro de las CDR de anticuerpos, o
15 cualesquier otros métodos conocidos en la técnica, seguido por la evaluación de la unión de los mutantes al antígeno para determinar si la posición del aminoácido mutada afecta a la unión de antígeno. En algunos aspectos, se introducen mutaciones en las regiones CDR. En otros aspectos, se introducen mutaciones en regiones de estructura. En algunos otros aspectos, las mutaciones se introducen en el CDR y regiones de estructura.

20

II. Moléculas de unión anti-HER3

La presente invención proporciona moléculas de unión HER3, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen específicamente a HER3. El aminoácido (aa) de longitud completa y las secuencias de
25 nucleótidos (nt) para HER3 se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, UniProt No. de Acc. P2186 para HER3 humana, o UniProt No. de Acc. 088458 para HER3 de ratón). En algunos aspectos, las moléculas de unión anti-HER3 son anticuerpos humanos. En ciertos aspectos, las moléculas de unión anti-HER3 son anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. En algunos aspectos, las moléculas de unión HER3, por ejemplo,
30 anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fd, un Fv de cadena simple o scFv, un disulfuro enlazado a Fv, un

dominio V-NAR, una IgNar, un intracuerpo, un IgGACH2, un minicuerpo, un F(ab')₃, un tetracuerpo, un triacuerpo, un diacuerpo, un anticuerpo de dominio simple, DVD-Ig, Fcab, mAb², un (scFv)₂, o un scFv-Fc. En algunos aspectos, el anticuerpo es del subtipo IgG1 y comprende la YTE mutante triple, como se ha descrito supra en la sección de

5 Definiciones.

En ciertos aspectos, los anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención se modifican comparados con el anticuerpo Clon 16 (CL16) padre. Las modificaciones pueden incluir mutaciones en las regiones CDR y/o en las regiones FW cuando se comparan con CL16. En ciertos aspectos, un anticuerpo

10 anti-HER3 de la invención comprende modificaciones a CDR1 y/o CDR3 de la cadena ligera de CL16, incluyendo, pero no limitado a:

- 1) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de consenso X₁GSX₂SNIGLN₁YVS, en donde X₁ se selecciona de R o S, y X₂ se selecciona de S o L; y
 - 2) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de consenso
- 15 AAWDDX₃X₄X₅GEX₆, en donde X₃ se selecciona de S o G, X₄ se selecciona de L o P, X₅ se selecciona de R, I, P o S, y X₆ se selecciona de V o A.

En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende modificaciones a CDR2 de la cadena pesada de CL16, incluyendo, pero no limitado a una CDR1 de cadena pesada que

20 comprende la secuencia de consenso X₇IGSSGGVTNYADSVKG, en donde X₇ se selecciona de Y, I o V.

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

25 [FW₁]X₁GSX₂SNIGLN₁YVS[FW₂]RNNQRPS[FW₃]AAWDDX₃X₄X₅GEX₆[FW₄]

en donde [FW₁], [FW₂], [FW₃] y [FW₄] representan los residuos de aminoácidos de la región 1 de estructura (SEQ ID NO: 40 ó 44), región 2 de estructura de VL (SEQ ID NO: 41), región 3 de estructura de VL (SEQ ID NO: 42) y región 4 de

30 estructura de VL (SEQ ID NO: 43), y en donde X₁ representa residuos de aminoácido de arginina (R) o serina (S), X₂ representa residuos de aminoácidos de serina (S) o leucina

(L), X₃ representa residuos de aminoácidos de serina (S) o ácido glutámico (E), X₄ representa los residuos de aminoácidos de leucina (L) o prolina (P), X₅ representa residuos de aminoácido de arginina (R), isoleucina (I), prolina (P) o serina (S), y X₆ representa los residuos de aminoácidos de valina (V) o arginina (R).

5 En un aspecto, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región VH, comprende la secuencia de aminoácidos consenso:



10 en donde [FW₅], [FW₆], [FW₇] y [FW₈] representan los residuos de aminoácidos de la región 1 de estructura de VH (SEQ ID NO: 36), región 2 de estructura de VH (SEQ ID NO: 37), región 3 de estructura de VH (SEQ ID NO: 38) y región 4 de estructura de VH (SEQ ID NO: 39), y en donde X₇ representa residuos de aminoácidos de tirosina (Y), isoleucina (I) o valina (V).

15 En un aspecto, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos consenso:



20 en donde [FW₁], [FW₂], [FW₃] y [FW₄] representan los residuos de aminoácidos de región 1 de estructura VL (SEQ ID NO: 40 ó 44), región 2 de estructura VL (SEQ ID NO: 41), la región 3 de estructura VL (SEQ ID NO: 42) y estructura 4 de región VL (SEQ ID NO: 43), y en donde X₁ representa los residuos de aminoácido de arginina (R) o serina (S), X₂ representa los residuos de aminoácidos de serina (S) o leucina (L), X₃ representa los residuos de aminoácidos serina (S) o ácido glutámico (E), X₄ representa los residuos de aminoácidos leucina (L) o prolina (P), X₅ representa residuos de aminoácido de la arginina (R), isoleucina (I), prolina (P) o serina (S), y X₆ representa los residuos de aminoácidos valina (V) o arginina (R); y en donde dicho fragmento de unión al anticuerpo o antígeno anti-HER3 del mismo además comprende una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos consenso:

30



en donde [FW₅], [FW₆], [FW₇] y [FW₈] representan los residuos de aminoácidos de la región 1 de estructura de VH (SEQ ID NO: 36), región 2 de estructura de VH (SEQ ID NO: 37), región 3 de estructura de VH (SEQ ID NO: 38) y la región 4 de estructura de VH (SEQ ID NO: 39), y en donde X₇ representa residuos de aminoácidos
 5 tirosina (Y), isoleucina (I) o valina (V).

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

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

En algunos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una VL-CDR1 que consiste de una
 30 secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 18, 19 y 20, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, un

anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 18, 19 y 20, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento

5 del mismo de unión al antígeno de la invención comprende una VL-CDR2 que consiste de SEQ ID NO: 21, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento del mismo de unión al antígeno de la invención comprende una VL-CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 21, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, un

10 anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una VL-CDR3 que consiste de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, y 30, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento del mismo de unión al antígeno de la invención comprende una VL-

15 CDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, y 30, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos.

En algunos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una VH-CDR1 que consiste de SEQ ID

20 NO: 31, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una VH-CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 31 excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una VH-

25 CDR2 que consiste de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 32, 33 y 34, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una VH-CDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 32, 33 y 34, excepto para uno, dos, tres o

30 cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una VH-CDR3 que

consiste de SEQ ID NO: 35, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una VH-CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 35, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos.

- 5 En algunos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una VL-CDR1 que consiste de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 18, 19 y 20; una VL-CDR2 que consiste de SEQ ID NO: 21; y una VL-CDR3 que consiste de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, y 30.
- 10 En algunos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 18, 19 y 20; una VL-CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 21; y una VL-CDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, y
- 15 30.

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

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

de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 18, 19 y 20, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; una VL-CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 21, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; y una VL-CDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, y 30, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos.

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

En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende modificaciones de CDR1, CDR2, y/o CDR3 de la cadena pesada y/o cadena ligera, y además comprende modificaciones para FW1, FW2, FW3, y/o FW4 de la cadena pesada y/o cadena ligera. En algunos aspectos, FW1 comprende la SEQ ID NO: 40 ó 44, FW2 comprende la SEQ ID NO: 41, FW3 comprende la SEQ ID NO: 42, FW4 comprende la SEQ ID NO: 43, FW5 comprende la SEQ ID NO: 36, FW6 comprende la SEQ ID NO: 37, FW7 comprende la SEQ ID NO: 38, y FW8 comprende la SEQ ID NO: 39.

En algunos aspectos, FW1 comprende la SEQ ID NO: 40 ó 44, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; FW2 comprende la SEQ ID NO: 41, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; FW3

comprende la SEQ ID NO: 42, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; FW4 comprende la SEQ ID NO: 43, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; FW5 comprende la SEQ ID NO: 36, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; FW6 comprende la SEQ ID NO: 37, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; FW7 comprende la SEQ ID NO: 38, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos; y FW8 comprende la SEQ ID NO: 39, excepto para uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos.

En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una VL y una VH que comprenden secuencias de aminoácidos VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 idénticas o idénticas excepto para cuatro, tres, dos, o una sustitución de aminoácidos en o más de las CDR para: SEQ ID NO: 18, 21, 22, 31, 32, y 35, SEQ ID NOS: 18, 21, 26, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 18, 21, 27, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 20, 21, 22, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 19, 21, 22, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 18, 21, 25, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 18, 21, 28, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 18, 21, 29, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 18, 21, 30, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 18, 21, 23, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 19, 21, 23, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 20, 21, 23, 31, 32 y 35, SEQ ID NO: 18, 21, 24, 31, 32 y 35, o SEQ ID NO: 18, 21, 25, 31, 32 y 35, respectivamente.

Los dominios variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención incluyen las secuencias listadas en la TABLA 2.

TABLE 2

TABLA 2	
Descripción	secuencia
CL16VL (Gerrnlined)	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGLNYSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEVFGGGTKLTVL
CL16VL (original)	QVELTQPPSASGTPGQRTVITMSCSGSSSNIGLNYSWYQQLPGTAPKLLISRNNQR PSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEVFGGGTKLTVL
CL16 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYYMQWVRQAPGKGLEWVSYIGS SGGVITNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLGDAFD IWGQGTMTVSS
5H6 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGLNYSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDGLPGEVFGGGTKLTVL
8A3 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGLNYSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLIGEVEFGGGTKLTVL
4H6 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGLNYSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEVFGGGTKLTVL
6E3 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSLSNIGLNYSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEVFGGGTKLTVL
2B11 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGLNYSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLPGEVFGGGTKLTVL
2D1 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGLNYSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEAFGGGTKLTVL
10 3A6 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGLNYSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSPSGEVFGGGTKLTVL
11 4C4 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGLNYSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLRGEVFGGGTKLTVL
12 15D12.1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYYMQWVRQAPGKGLEWVSIIGSS

5

(15D12.1) VH	GGVTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLGDAFDI WGQGTMTVSS
15D12.2 (15D12.V) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSY YFMQWVRQAPGKGLEWV SVIGS SGGV TNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLGDAFD IWGQGTMTVSS
1A4 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEIDEADYYCAAWDDSPGGEAFGGGTKLTVL
2C2 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEIDEADYYCAAWDDSPGGEAFGGGTKLTVL
3E1 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCRGSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEIDEADYYCAAWDDSPGGEAFGGGTKLTVL
2F10	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEIDEADYYCAAWDDSPGGEAFGGGTKLTVL

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

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

En otros aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al
antígeno del mismo de la invención comprende una VL que comprende una secuencia de
al menos alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%,
alrededor de 96%, alrededor de 97%, alrededor de 98%, alrededor de 99%, o alrededor
de 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo
que consiste de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO:
6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID

NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID N: 16, y SEQ ID NO: 17 comprende, y además una VH que comprende una secuencia de al menos alrededor de 80%, alrededor de 85%, alrededor de 90%, alrededor de 95%, alrededor de 96%, alrededor de 97%, alrededor de 98%, alrededor de 99%, o alrededor de 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.

En algunos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una VH de la TABLA 2 y una VL de la TABLA 2. Los anticuerpos se designan a través de toda la especificación de acuerdo con sus cadenas VL. Las cadenas pesadas de los anticuerpos específicos descritos en la presente especificación corresponden a la cadena pesada original CL16 (SEQ ID NO: 2). Por lo tanto, el “anticuerpo CL16” es una IgG1 que comprende dos cadenas ligeras CL16 originales (SEQ ID NO: 17) y dos cadenas pesadas CL16 originales (SEQ ID NO: 2), mientras que el “anticuerpo 2C2” es una IgG1 que comprende dos cadenas ligeras 2C2 (VL 2C2 (SEQ ID NO: 3) y dos cadenas pesadas CL16 originales (SEQ ID NO: 2).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una región constante de cadena pesada o fragmento de la misma. En algunos aspectos específicos, la región constante de cadena pesada es una región constante de IgG. La región constante de IgG puede comprender una región constante de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de una región constante kappa y una región constante lambda.

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

En un aspecto de la presente invención, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo se une específicamente a HER3 y fragmentos

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

En otro aspecto, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención se une a HER3 y/o fragmentos antigénicos del mismo con una $\kappa_{desactivada}$ de menos de 1 o menos de $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. En otros aspectos, un anticuerpo
10 anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a HER3 y fragmentos antigénicos del mismo con una $\kappa_{desactivada}$ de menos de 10^{-3} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-4} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-5} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-6} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, menos de menos de $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-8} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, a menos de 10^{-9} s^{-1} , a menos de $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, o menos de 10^{-10} s^{-1} .
15 En un aspecto particular, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención se une a HER3 y/o fragmentos antigénicos del mismo con una $\kappa_{desactivada}$ de entre $0.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $2.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención se une a HER3 y/o fragmentos antigénicos del mismo con una
20 índice de asociación constante o índice de $\kappa_{activada}$ de al menos $10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, al menos $10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, al menos $10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o al menos $10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o al menos $10^{-9} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En otro aspecto, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención se une a HER3 y/o fragmentos antigénicos del mismo con una índice de asociación constante o
25 índice de $\kappa_{activada}$ de entre $5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Las secuencias de VH y VL descritas en la TABLA 1 pueden “mezclarse y combinarse” para crear otras moléculas de unión al anti-HER3 de la invención. En ciertos aspectos, las secuencias de VH de 15D12.I y 15D12.V se mezclan y combinan. Adicional o alternativamente, las secuencias de VL de 5H6, 8A3, 4H6, 6E.3, 2B11, 2D1, 3A6, 4C4,
30 1A4, 2C2, 3E.1 pueden mezclarse y combinarse.

En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al

antígeno del mismo de la invención comprende las mutaciones que mejoran la unión a FcRn humano y mejorar la vida media del anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunos aspectos, tales mutaciones son una mutación de metionina (M) a tirosina (Y) en la posición 252, una mutación de serina (S) a treonina (T) en la posición 254, y una mutación de treonina (T) a ácido glutámico (E) en la posición 256, numeradas de acuerdo con el índice de Estados Unidos como en Kabat (Kabat, et al., (1991) *Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico*, Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, Institutos Nacionales de Salud, Washington, D.C.), introducidos en el dominio constante de una IgG1. Véase la Patente de los Estados Unidos No. 7,658,921, la cual se incorpora por referencia en la presente. Este tipo de IgG mutante, referido como un “mutante YTE” ha mostrado desplegar aproximadamente cuatro veces la vida media incrementada cuando se compara con las versiones de tipo silvestre del mismo anticuerpo (Dall'Acqua et al., *J. Biol. Chem.* 281:23514-24 (2006)). En algunos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio constante de IgG que comprende una o más sustituciones de aminoácidos de residuos de aminoácidos en las posiciones 251-257, 285-290, 308-314, 385-389, y 428-436, numeradas de acuerdo con el índice de Estados Unidos como en Kabat, en donde dichas mutaciones incrementan la vida media en suero del anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo.

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

En aún otro aspecto, un mutante YTE además comprende una sustitución

en la posición 434 del dominio constante de IgG, numerada de acuerdo con el índice de de estados Unidos como en Kabat, con tirosina (Y), y una sustitución en la posición 257 del dominio constante de IgG, numerada de acuerdo con el índice de Estados Unidos como en Kabat, con leucina (L). En algunos aspectos, un mutante YTE además
 5 comprende una sustitución en la posición 434 del dominio constante de IgG, numerada de acuerdo con el índice de Estados Unidos como en Kabat, con serina (S), y una sustitución en la posición 428 del dominio constante de IgG, numerada de acuerdo para el índice de de estados Unidos como en Kabat, con leucina (L).

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

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

- (a) la sustitución del aminoácido en la posición 252 con tirosina (Y),
 20 fenilalanina (F), triptófano (W), o treonina (T),
- (b) la sustitución del aminoácido en la posición 254 con treonina (T),
- (c) la sustitución del aminoácido en la posición 256 con serina (S), arginina (R), glutamina (Q), ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), o treonina (T),
- (d) la sustitución del aminoácido en la posición 257 con leucina (L),
 25 (e) la sustitución del aminoácido en la posición 309 con prolina (P),
- (f) la sustitución del aminoácido en la posición 311 con serina (S),
- (g) la sustitución del aminoácido en la posición 428 por treonina (T), leucina (L), fenilalanina (F), o serina (S),
- (h) la sustitución del aminoácido en la posición 433 con arginina (R), serina
 30 (S), isoleucina (I), prolina (P), o glutamina (Q),
- (i) la sustitución del aminoácido en la posición 434 con triptófano (W),

metionina (M), serina (S), histidina (H), fenilalanina (F), o tirosina, y

(j) una combinación de dos o más de dichas sustituciones,

en donde las posiciones se numeran de acuerdo con el índice de Estados Unidos como en Kabat, y en donde la IgG modificada tiene una vida media en suero incrementada en comparación con la vida media en suero de una IgG que tiene el dominio constante de IgG de tipo silvestre.

En otros aspectos, las secuencias de aminoácidos de VH y/o VL pueden ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% similares a las secuencias establecidas en lo anterior, y comprenden 1, 2, 3, 4, 5 o más sustituciones conservadoras. Un anticuerpo HER3 que tiene regiones de VH y VL tiene alta similaridad (es decir, 80% o más) a las regiones VH de las SEQ ID NO: 2, 12 ó 13 y/o regiones VL de las SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, o 17, respectivamente, pueden obtenerse por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NO: 1-17, seguidas de pruebas del anticuerpo alterado codificado para la función sostenida utilizando los ensayos funcionales descritos en la presente.

La afinidad o aidez de un anticuerpo para un antígeno puede determinarse experimentalmente utilizando cualquier método adecuado bien conocido en la técnica, por ejemplo, citometría de flujo, ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), o radioinmunoensayo (RIA), o cinética (por ejemplo, análisis BIACORE™). Los ensayos de unión directa, así como formatos de ensayo de unión competitiva pueden emplearse fácilmente. (Véase, por ejemplo, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions", En Fundamental Immunology, Paul, WE, Ed, Raven Press: Nueva York, N.Y. (1984); Kuby, Immunology, WH Freeman and Company: Nueva York, N.Y. (1992); y métodos descritos en la presente. La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide bajo diferentes condiciones (por ejemplo, concentración de sal, pH, temperatura). Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión al antígeno (por ejemplo, κ_D o κ_d ($\kappa_{\text{desactivada}}/\kappa_{\text{activada}}$) se hacen con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un regulador estandarizado, tal como se conoce en la técnica y tal como el regulador descrito en la presente.

También se conoce en la técnica que las afinidades medidas utilizando el

análisis BIACORE™ pueden variar dependiendo de que uno de los reactivos que se enlaza al chip. En este respecto, la afinidad puede medirse utilizando un formato en el cual el anticuerpo dirigido (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 2C2) se inmoviliza dentro del chip (denominado como un formato de “IgG hacia abajo”) o utilizando un
 5 formato en el cual la proteína objetivo (por ejemplo, HER3) se inmoviliza sobre el chip (denominado como, por ejemplo, un formato de “HER3 hacia abajo”).

III. Moléculas de Unión que se Unen al Mismo Epítipo como Anticuerpos anti-HER3 y Fragmentos de unión al Antígeno del Mismo de la 10 Invención

En otro aspecto, la invención comprende moléculas de unión HER3 que se unen al mismo epítipo como lo hacen los diversos anticuerpos anti-HER3 descritos en la presente. El término “epítipo”, como se utiliza en la presente se refiere a un determinante de proteína capaz de unirse a un anticuerpo de la invención. Los epítipos usualmente
 15 consisten habitualmente de agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y usualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión al primero, pero no al último se pierde en presencia de solventes
 20 desnaturizantes. Tales anticuerpos pueden identificarse basados en su capacidad de competencia cruzada (por ejemplo, para inhibir competitivamente la unión de, en una forma estadísticamente significativa) con anticuerpos tales como el anticuerpo CL16, el anticuerpo 2C2, o el mutante 2C2-YTE, en ensayos de unión HER3. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-HER3 y fragmentos de unión al
 25 antígeno de los mismos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de humano, que compiten por la unión HER3 con otro anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención, tal como el anticuerpo CL16 o el anticuerpo 2C2. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de, por ejemplo, el anticuerpo CL16 o el anticuerpo 2C2 demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese
 30 anticuerpo para unirse a HER3; tal anticuerpo puede, de acuerdo con la teoría no limitante, unirse al mismo epítipo o uno relacionado (por ejemplo, uno similar

estructuralmente o proximal espacialmente) en HER3 como el anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo con el que compite. En un aspecto, el anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une al mismo epítipo en HER3 como, por ejemplo, el anticuerpo CL16 o el anticuerpo 2C2, es un anticuerpo monoclonal de humano.

IV. Mecanismo de Acción

En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3. En otros aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de AKT. En todavía otros aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la formación de dímero HER2-HER3. En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir el crecimiento celular. En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo carece de efecto ADCC. En aspectos específicos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3, la fosforilación de AKT, y/o la formación de colonias de tumor a través de un mecanismo independiente de ligando de acción.

En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en células MCF-7 de cáncer de mama impulsadas por HRG como se mide por ELISA, con una IC₅₀ menor que alrededor de 30 ng/mL, menor que alrededor de 25 ng/mL, menor que alrededor de 20 ng/mL, menor que alrededor de 15 ng/mL, o menor que alrededor de 10 ng/ml. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en células MCF-7 de cáncer de mama impulsadas por HRG como se mide por ELISA, con una IC₅₀ menor que alrededor de 20 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un

anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en células MCF-7 de cáncer de mama impulsadas por HRG como se mide por ELISA, con una IC_{50} inferior a alrededor de 15 ng/mL. En otro aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o
5 fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en células MCF-7 de cáncer de mama impulsadas por HRG como se mide por ELISA, con una IC_{50} inferior a alrededor de 10 ng/mL.

En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir el
10 crecimiento celular en células MDA-MB-175 de cáncer de mama con una IC_{50} menor que alrededor de 0.90 μ g/mL, menor que alrededor de 0.80 μ g/mL, menor que alrededor de 0.70 μ g/mL, menor que alrededor de 0.60 μ g/mL, menor que alrededor de 0.50 μ g/mL, menor que alrededor de 0.40 μ g/mL, menor que alrededor de 0.30 μ g/mL, o menor que alrededor de 0.20 μ g/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por
15 ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir el crecimiento celular en células MDA-MB-175 de cáncer de mama, con una IC_{50} menor que alrededor de 0.50 μ g/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir el crecimiento celular en células MDA-MB-175 de cáncer de mama, con
20 una IC_{50} menor que alrededor de 0.40 μ g/mL. En otro aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo pueden suprimir el crecimiento celular en células MDA-MB-175 de cáncer de mama, con una IC_{50} menor que alrededor de 0.30 μ g/mL. En otro aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al
25 antígeno del mismo pueden suprimir el crecimiento celular en células MDA-MB-175 de cáncer de mama, con una IC_{50} menor que alrededor de 0.20 μ g/mL.

En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir el crecimiento celular en células de melanoma de HMCB con una IC_{50} menor que alrededor
30 de 0.20 μ g/mL, menor que alrededor de 0.15 μ g/mL, menor que alrededor de 0.10 μ g/mL, menor que alrededor de 0.05 μ g/mL, menor que alrededor de 0.04 μ g/mL, o menor que

alrededor de 0.03 $\mu\text{g/mL}$. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir el crecimiento celular en células de melanoma de HMCB, con una IC_{50} menor que alrededor de 0.10 $\mu\text{g/mL}$. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir el crecimiento celular en células de melanoma de HMCB, con una IC_{50} menor que alrededor de 0.05 $\mu\text{g/mL}$. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir el crecimiento celular en células de melanoma de HMCB, con una IC_{50} menor que alrededor de 0.04 $\mu\text{g/mL}$. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir el crecimiento celular en células de melanoma de HMCB, con una IC_{50} menor que alrededor de 0.03 $\mu\text{g/mL}$.

En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 impulsadas por EGFR con una IC_{50} menor que alrededor de 20 ng/mL, menor que alrededor de 15 ng/mL, menor que alrededor de 10 ng/mL, menor que alrededor de 8 ng/mL, menor que alrededor de 6 ng/mL, menor que alrededor de 4 ng/mL, o menor que alrededor de 2 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 impulsadas por EGFR, con una IC_{50} menor que alrededor de 10 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 impulsadas por EGFR, con una IC_{50} menor que alrededor de 8 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 impulsadas por EGFR, con una IC_{50} menor que alrededor de 6 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de

HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 impulsadas por EGFR, con una IC_{50} menor que alrededor de 4 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 impulsadas por EGFR, con una IC_{50} menor que alrededor de 2 ng/mL.

En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de cáncer de pulmón HCC827 impulsadas por EGFR resistentes a TKI con una IC_{50} menor que alrededor de 30 ng/mL, menor de alrededor de 25 ng/mL, menor que alrededor de 20 ng/mL, menor que alrededor de 15 ng/mL, menor que alrededor de 10 ng/mL, o menor que alrededor de 5 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en el pulmón HCC827 células de cáncer de impulsadas por EGFR resistentes a TKI, con una IC_{50} menor que alrededor de 20 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en el pulmón HCC827 células de cáncer de impulsadas por EGFR resistentes a TKI, con una IC_{50} menor que alrededor de 15 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en el pulmón HCC827 células de cáncer de impulsadas por EGFR resistentes a TKI, con una IC_{50} menor que alrededor de 10 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en el pulmón HCC827 células de cáncer de impulsadas por EGFR resistentes a TKI, con una IC_{50} menor que alrededor de 5 ng/mL.

En algunos aspectos específicos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede utilizarse para tratar los cánceres resistentes a TKI.

En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de adenocarcinoma gástrico de humano MKN45

impulsadas por cMET con una IC_{50} es menor que alrededor de 15 ng/mL, menor que alrededor de 10 ng/mL, menor que alrededor de 9 ng/mL, menor que alrededor de 8 ng/mL, menor que alrededor de 7 ng/mL, menor que alrededor de 6 ng/mL, menor que alrededor de 5 ng/mL, o menor que alrededor de 4 ng/mL. En un aspecto específico, una

5 molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de adenocarcinoma gástrico de humano MKN45 impulsadas por cMET con una IC_{50} menor que alrededor de 10 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede

10 suprimir la fosforilación de HER3 en células de adenocarcinoma gástrico de humano MKN45 impulsadas por cMET con una IC_{50} menor que alrededor de 8 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de adenocarcinoma gástrico de humano MKN45 impulsadas por cMET con una

15 IC_{50} menor que alrededor de 6 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir la fosforilación de HER3 en células de adenocarcinoma gástrico de humano MKN45 impulsadas por cMET con una IC_{50} menor que alrededor de 4 ng/mL.

En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un

20 anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención puede suprimir pAKT en células MKN45 impulsadas por cMET con una IC_{50} menor que alrededor de 15 ng/mL, menor que alrededor de 10 ng/mL, menor que alrededor de 9 ng/mL, menor que alrededor de 8 ng/mL, menor que alrededor de 7 ng/mL, menor que alrededor de 6 ng/mL, menor que alrededor de 5 ng/mL, menor que alrededor de 4 ng/mL, o menor que

25 alrededor de 3 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir pAKT en células MKN45 impulsadas por cMET con una IC_{50} menor que alrededor de 8 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir pAKT

30 en células MKN45 impulsadas por cMET con una IC_{50} menor que alrededor de 6 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-

HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir pAKT en células MKN45 impulsadas por cMET con una IC₅₀ menor que alrededor de 4 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir pAKT en células MKN45
5 impulsadas por cMET con una IC₅₀ menor que alrededor de 3 ng/mL.

En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención puede suprimir pHER en células de carcinoma de anillo de sello gástrico en humano Kato III impulsadas por FGFR2 con una IC₅₀ menor que alrededor de 9 ng/mL, menor que
10 alrededor de 8 ng/mL, menor que alrededor de 7 ng/mL, menor que alrededor de 6 ng/mL, menor que alrededor de 5 ng/mL, menor que alrededor de 4 ng/mL, menor que alrededor de 3 ng/mL, menor que alrededor de 2 ng/mL, o menor que alrededor de 1 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir pHER en células de carcinoma
15 de anillo de sello Kato III impulsadas por FGFR2 humanos gástricos con una IC₅₀ menor que alrededor de 5 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir pHER en células de carcinoma de anillo de sello Kato III impulsadas por FGFR2 humanos gástricos con una IC₅₀ menor que alrededor de 4 ng/mL. En un aspecto
20 específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir pHER en células de carcinoma de anillo de sello Kato III impulsadas por FGFR2 humanos gástricos con una IC₅₀ menor que alrededor de 3 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede
25 suprimir pHER en células de carcinoma de anillo de sello Kato III impulsadas por FGFR2 humanos gástricos con una IC₅₀ menor que alrededor de 2 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir pHER en células de carcinoma de anillo de sello Kato III impulsadas por FGFR2 humanos gástricos con una IC₅₀ menor
30 que alrededor de 1 ng/mL.

En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un

anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir pAKT en células Kato III impulsadas por FGFR-2 con una IC₅₀ menor que alrededor de 6 ng/mL, menor que alrededor de 5 ng/mL, menor que alrededor de 4 ng/mL, menor que alrededor de 3 ng/mL, menor que alrededor de 2 ng/mL, o menor que alrededor de 1 ng/mL. En un

5 aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo pueden suprimir pAKT en células Kato III impulsadas por FGFR-2 con una IC₅₀ menor que alrededor de 4 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo pueden suprimir pAKT en células Kato III

10 impulsadas por FGFR-2 con una IC₅₀ menor que alrededor de 3 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo pueden suprimir pAKT en células Kato III impulsadas por FGFR-2 con una IC₅₀ menor que alrededor de 2 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o

15 fragmento de unión al antígeno del mismo pueden suprimir pAKT en células Kato III impulsadas por FGFR-2 con una IC₅₀ menor que alrededor de 1 ng/mL.

En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención puede suprimir pHER en un ligando independiente de células BT-474 de cáncer de mama con

20 una IC₅₀ menor que alrededor de 10 ng/mL, menor de alrededor de 9 ng/mL, menor que alrededor de 8 ng/mL, menor que alrededor de 7 ng/mL, menor que alrededor de 6 ng/mL, menor que alrededor de 5 ng/mL, menor que alrededor de 4 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir pHER en un ligando

25 independiente de células BT-474 de cáncer de mama con una IC₅₀ menor que alrededor de 8 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir pHER en un ligando independiente de células BT-474 de cáncer de mama con una IC₅₀ menor que alrededor de 6 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por

30 ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir pHER en un ligando independiente de células BT-474 de cáncer de mama con

una IC₅₀ menor que alrededor de 4 ng/mL.

En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención puede suprimir pAKT en un ligando independiente de células BT-474 de cáncer de mama con una IC₅₀ menor que alrededor de 10 ng/mL, menor de alrededor de 9 ng/mL, menor que alrededor de 8 ng/mL, menor que alrededor de 7 ng/mL, menor que alrededor de 6 ng/mL, menor que alrededor de 5 ng/mL, menor que alrededor de 4 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo pueden suprimir pAKT en un ligando independiente de células BT-474 de cáncer de mama con una IC₅₀ menor que alrededor de 8 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo pueden suprimir pAKT en un ligando independiente de células BT-474 de cáncer de mama con una IC₅₀ menor que alrededor de 6 ng/mL. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo pueden suprimir pAKT en un ligando independiente de células BT-474 de cáncer de mama con una IC₅₀ menor que alrededor de 4 ng/mL. En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede suprimir pHER3, pAKT, y la formación de colonias de tumor en células BT-474, un modelo de cáncer de mama independiente de ligando.

En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención puede suprimir la secreción de VEGF inducida por HRG. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención puede suprimir la secreción de VEGF inducida por HRG en el ligando independiente de células BT-474 de cáncer de mama y/o células MCF-7 de cáncer de mama impulsadas por HRG.

En algunos aspectos, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención puede provocar la detención del ciclo celular. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo

de la invención puede provocar la detención del ciclo celular en células de cáncer de mama, incluyendo, pero no limitado a células SKBR3 o BT474.

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

Los anticuerpos anti-HER3 monoclonales pueden prepararse utilizando métodos de hibridoma, tales como aquellos descritos por Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495. Utilizando el método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, se inmuniza como se describe en lo anterior para provocar la producción de anticuerpos por los linfocitos que se unirán específicamente a un antígeno de inmunización. Los linfocitos también pueden inmunizarse in vitro. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada utilizando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que entonces pueden seleccionarse lejos de los linfocitos y células de mieloma no fusionados.

15 Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno elegido como se determina mediante inmunoprecipitación, inmunotransferencia, o mediante un ensayo de unión in vitro (por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA); ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA)) entonces puede propagarse ya sea en cultivos in vitro utilizando métodos estándar (Goding,

20 Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) o in vivo como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales purificarse a partir del medio de cultivo o fluido de ascites como se describe para los anticuerpos policlonales en lo anterior.

Alternativamente, los anticuerpos monoclonales anti-HER3 también pueden

25 hacerse utilizando métodos de ADN recombinante como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 4,816,567. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan a partir de células B maduras o células de hibridoma, tales como por RT-PCR utilizando cebadores de oligonucleótidos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y su secuencia se

30 determina utilizando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesada y ligera entonces se clonan en vectores de expresión

adecuados, los cuales cuando se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, anticuerpos monoclonales generados por células huésped. También, los anticuerpos monoclonales anti-HER3 recombinantes o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de las especies deseadas pueden aislarse a partir de las CDR que expresan bibliotecas de despliegue de fagos de las especies deseadas como se describió (McCafferty et al., 1990, *Nature*, 348:552-554; Clarkson et al., 1991, *Nature*, 352:624-628; y Marks et al., 1991, *J. Mol Biol.*, 222:581-597).

Además pueden modificarse los polinucleótidos que codifican un anticuerpo anti-HER3 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos en un número de diferentes maneras utilizando tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En algunos aspectos, los dominios constantes de las cadenas ligeras y pesadas de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón pueden sustituirse (1) para aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o (2) para un polipéptido que no es de inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En algunos aspectos, las regiones constantes se encuentran truncadas o eliminadas para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. La mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable puede utilizarse para optimizar la especificidad, afinidad, etc., de un anticuerpo monoclonal.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo es un anticuerpo humano o fragmento de unión al antígeno del mismo. Los anticuerpos de humano pueden prepararse directamente utilizando diversas técnicas conocidas en el arte. Pueden generarse linfocitos B de humano inmortalizados inmunizados in vitro o aislados de un individuo inmunizado que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno objetivo (Véase, por ejemplo, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, *J. Immunol*, 147 (1):86 - 95, y la patente de los Estados Unidos 5,750,373).

Además, el anticuerpo humano anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede seleccionarse a partir de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca

de fagos expresa anticuerpos humanos, como se describe, por ejemplo, en Vaughan et al., 1996, Nat. Biotech., 14:309-314, Sheets et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci., 95:6157-6162, Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381, y Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581). Las técnicas para la generación y uso de bibliotecas de fagos de anticuerpos también se describen en la Patente de los Estados Unidos Nos. 5,969,108, 6,172,197, 5,885,793, 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 6,593,081; 6,300,064; 6,653,068; 6,706,484; y 7.264.963; y Rothe et al., 2007, J. Mol. Bio., doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.018 (cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad).

10 Estrategias de maduración de afinidad y estrategias de intercambio de cadenas (Marks et al., 1992, Bio/Technology 10:779-783, la cual se incorpora por referencia en su totalidad) se conocen en la técnica y pueden emplearse para generar anticuerpos de humano de alta afinidad o fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

En algunos aspectos, un anticuerpo monoclonal anti-HER3 puede ser un anticuerpo humanizado. También pueden utilizarse métodos de diseño, humanización o rejuvenecimiento de anticuerpos humanos o no humanos y se conocen bien en la técnica. Un anticuerpo diseñado de modo similar humanizado, rejuvenecido o anticuerpo puede tener uno o más residuos de aminoácidos a partir de una fuente que no es humana, por ejemplo, pero no limitado a, ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos residuos de aminoácidos no humanos se rempazan por residuos que a menudo se denominan como residuos “de importación”, los cuales típicamente se toman de un dominio variable, constante o de otro tipo “de importación” de una secuencia humana conocida. Tales secuencias importadas pueden utilizarse para reducir la inmunogenicidad o reducir, intensificar o modificar de unión, afinidad, índice de ganancia, índice de pérdida, avidez, especificidad, vida media, o cualquier otra característica adecuada, tal como se conoce en la técnica. En general, los residuos CDR se encuentran directa y más sustancialmente implicados en influenciar la unión a HER. En consecuencia, parte o la totalidad de las secuencias CDR humanas o no humanas se mantienen mientras que las secuencias no humanas de las regiones variable y constante pueden remplazarse con aminoácidos humanos u otros.

Los anticuerpos también pueden opcionalmente humanizarse,

rejuvenecerse, diseñarse o anticuerpos humanos diseñados con retención de alta afinidad por el antígeno HER3 y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, los anticuerpos anti-HER3 humanizados (o humanos) o diseñados y anticuerpos rejuvenecidos pueden prepararse opcionalmente mediante un proceso de análisis de las

5 secuencias originales y diversos productos humanizados y diseñados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias originales, diseñadas, y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales se encuentran comúnmente disponibles y son familiares para aquellos con experiencia en la técnica. Los programas informáticos disponibles ilustran y despliegan probables estructuras

10 conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatos seleccionadas. La inspección de estos despliegues permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidato, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidato para unirse a su antígeno, tal como HER3. De esta manera, pueden seleccionarse los

15 residuos de estructura (FW) y combinarse a partir del consenso y lograr secuencias de importación de modo que la característica del anticuerpo deseada, tal como afinidad incrementada para los antígenos objetivo.

La humanización, rejuvenecimiento o diseño de anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la presente invención puede llevarse a

20 cabo utilizando cualquier método conocido, tal como, pero no limitado a los descritos en, Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), Patentes de los Estados Unidos. Nos.

25 5,639,641, 5,723,323; 5,976,862; 5,824,514; 5,817,483; 5,814,476; 5,763,192; 5,723,323; 5,766,886; 5,714,352; 6,204,023; 6,180,370; 5,693,762; 5,530,101; 5,585,089; 5,225,539; 4,816,567, 7,557,189; 7,538,195; y 7,342,110; Solicitudes Internacionales Nos. PCT/US98/16280; PCT/US96/18978; PCT/US91/09630; PCT/US91/05939; PCT/US94/01234; PCT/GB89/01334; PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; Publicaciones

30 de Solicitud de Patente Internacional Nos. W090/14443; W090/14424; W090/14430; y la Publicación de Patente Europea No. EP 229,246; cada una de los cuales se incorpora en

su totalidad en la presente para referencia, incluyendo las referencias citadas en las mismas.

También pueden hacerse los anticuerpos anti-HER3 humanizados y fragmentos de unión al antígeno de los mismos en ratones transgénicos que contienen
5 sitios de inmunoglobulina humana que son capaces de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena después de la inmunización. Endógena. Este procedimiento se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016.

En ciertos aspectos se proporciona un fragmento de anticuerpo anti-HER3.
10 Se conocen diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo, Morimoto *et al.*, 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Métodos 24:107-117;.. Brennan *et al.*, 1985, Science, 229:81). En ciertos aspectos, los fragmentos de anticuerpos anti-HER3 se producen de forma recombinante.
15 Los fragmentos de los anticuerpos Fab, Fv, scFv pueden todos expresarse en y secretarse a partir de *E. coli* o de otras células huésped, permitiendo de este modo la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Tales fragmentos de anticuerpos anti-HER3 también pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de los anticuerpos discutidos anteriormente. Los fragmentos de los anticuerpos anti-HER3 también pueden
20 ser anticuerpos lineales tal como se describe en la patente E.U. No. 5,641,870. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la materia.

De acuerdo con la presente invención, las técnicas pueden adaptarse para
25 la producción de los anticuerpos específicos de cadena sencilla de HER3 (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,946.778). Además, los métodos pueden adaptarse para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (véase, por ejemplo, Huse *et al.*, Science 246:1275-1281 (1989)) para permitir la identificación rápida y efectiva de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para HER3, o derivados,
30 fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Los fragmentos de anticuerpos pueden producirse por técnicas en el arte incluyendo, pero no limitados a: (a) un

fragmento F(ab')₂ producido por la digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (b) un fragmento Fab generado al reducir los puentes de disulfuro de un fragmento F(ab')₂, (c) un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor, y (d) fragmentos Fv.

5 Puede desearse, además, especialmente en el caso de fragmentos de anticuerpos, para modificar un anticuerpo anti-HER3 o fragmento que une al antígeno del mismo con el fin de aumentar su vida media en suero. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo por mutación de la región apropiada en el anticuerpo o fragmento
10 de anticuerpo o mediante la incorporación del epítipo en una etiqueta peptídica que se fusiona con el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el medio (por ejemplo, por síntesis de ADN o péptido), o por mutación de YTE. Otros métodos para aumentar la vida media en suero de un anticuerpo o fragmento que une al antígeno del mismo, por ejemplo, la conjugación a una molécula heteróloga tal como PEG son
15 conocidos en la técnica.

Los anticuerpos heteroconjugados anti-HER3 y fragmento que unen al antígeno de los mismos están también dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos, por ejemplo, han sido propuesto para dirigir células
20 del sistema inmune a células no deseadas (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980). Se contempla que los anticuerpos heteroconjugados anti-HER3 y fragmento que unen al antígeno de los mismos pueden prepararse *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación. por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse
25 utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

En ciertos aspectos, las moléculas de unión a HER3-de la invención, por ejemplo, anticuerpos o fragmento que unen al antígeno de los mismos se pueden
30 combinar con otros agentes terapéuticos o conjugarse con otros agentes terapéuticos o toxinas para formar inmunoconjugados y/o proteínas de fusión. Ejemplos de tales agentes

terapéuticos y toxinas incluyen, pero no se limitan a cetuximab (Erbix[®]), panitumumab (Vectibix[®]), lapatinib (TYKERB[®]/Tyverb[®]), y paclitaxel (Taxol[®], Abraxane[®]) y derivados (por ejemplo, docetaxel).

En algunos aspectos las moléculas de unión a HER3-de la invención, por ejemplo, anticuerpos o fragmento que unen al antígeno de los mismos pueden conjugarse con anticuerpos o fragmentos de anticuerpos dirigidos al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). En otros aspectos, las moléculas de unión a HER3-de la invención pueden conjugarse con los inhibidores de tirosina cinasa. En algunos aspectos específicos, las moléculas de unión a HER3-de la invención se pueden conjugar a los inhibidores de la actividad tirosina cinasa asociadas con EGFR y/o HER2/neu. En algunos aspectos, las moléculas de unión a HER3-de la invención pueden conjugarse a agentes antimitóticos. En algunos aspectos específicos, las moléculas de unión a HER3-de la invención pueden conjugarse con agentes que estabilizan el ensamblaje de los microtúbulos del husillo mitótico.

Para los propósitos de la presente invención, se debe apreciar que los anticuerpos anti-HER3 modificados o fragmento que unen al antígeno de los mismos pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporciona para la asociación del anticuerpo o polipéptido con HER3. En este sentido, la región variable puede comprender o derivarse de cualquier tipo de mamífero que puede inducirse para montar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno asociado a un tumor deseado. Como tal, la región variable de los anticuerpos anti-HER3 modificados o fragmento que unen al antígeno de los mismos puede ser, por ejemplo, de humano, murino, primate no humano (por ejemplo, monos cynomolgus, macacos, etc.) o el origen de lupino. En algunos aspectos, tanto la variable y regiones constantes de los anticuerpos anti-HER3 modificados o fragmento que unen al antígeno de los mismos son humanos. En otros aspectos las regiones variables de los anticuerpos compatibles (por lo general derivados de una fuente no humana) pueden diseñarse o adaptarse específicamente para mejorar las propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. En este respecto, las regiones variables útiles en la presente invención pueden ser humanizadas o de otra manera alteradas a través de la inclusión de secuencias de aminoácidos importadas.

En ciertos aspectos, los dominios variables tanto en las cadenas pesadas como ligeras de un anticuerpo anti-HER3 o fragmento que une al antígeno del mismo se alteran por la sustitución al menos parcial de una o más CDR y, si es necesario, por reemplazo de la región de estructura parcial y la secuencia cambiante. Aunque las CDR
5 pueden derivarse de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase como el anticuerpo del cual se derivan las regiones de estructura, se prevé que las CDR se derivan de un anticuerpo de diferente clase y en ciertos aspectos de un anticuerpo a partir de una especie diferente. No es necesario reemplazar todos los CDR con las CDR completas de la región variable de donantes para la transferencia de la capacidad de
10 unión al antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, sólo es necesario para transferir los residuos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión de antígeno. Teniendo en cuenta las explicaciones expuestas en la Patente de los Estados Unidos Nos. 5,585,089, 5,693,761 y 5,693,762, estará bien dentro de la competencia de aquellos experimentados en la técnica, ya sea mediante la realización de la
15 experimentación de rutina o por ensayo y error de la prueba para obtener un anticuerpo funcional con inmunogenicidad reducida.

Las alteraciones a la región variable no obstante, aquellos con experiencia en la técnica apreciarán que los anticuerpos anti-HER3 modificados o fragmento que unen al antígeno de los mismos de esta invención comprenderán anticuerpos (por ejemplo,
20 anticuerpos de longitud completa o fragmentos inmunorreactivos de los mismos) en los que al menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante han sido eliminados o alterados de otra manera a fin de proporcionar características bioquímicas deseadas tales como aumento de la localización del tumor o suero reducido a vida media en comparación con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que
25 comprende una región constante nativa o inalterada. En algunos aspectos, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones de la región constante compatible con esta invención comprenden adiciones, eliminaciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Es decir, los anticuerpos modificados descritos en la presente pueden
30 comprender alteraciones o modificaciones a uno o más de los tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o al dominio constante de cadena ligera (CL). En

algunos aspectos, las regiones constantes modificadas en donde uno o más dominios que están parcial o totalmente eliminados se contemplan. En algunos aspectos, los anticuerpos modificados comprenderán dominio de construcciones o variantes eliminadas en donde todo el dominio CH2 ha sido removido (construcciones Δ CH2). En algunos
 5 aspectos, el dominio de la región constante omitido será reemplazado por un espaciador de aminoácidos corto (por ejemplo, 10 residuos) que proporciona algunos de la flexibilidad molecular típicamente impartida por la región constante ausente.

Además de su configuración, se conoce en la técnica que la región constante medía varias funciones efectoras. por ejemplo, la unión del componente C1 del
 10 complemento en anticuerpos activa el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares. La activación del complemento estimula también la respuesta inflamatoria y también puede implicarse en la hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos se unen a las células mediante la región Fc, con un sitio de receptor de Fc en la región Fc de anticuerpo
 15 que une a un receptor Fc (FcR) en una célula. Existen números de receptores de Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpo, incluyendo IgG (receptores gama), IgE (receptores eta), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores de Fc en las superficies celulares provoca una serie de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen inmersión y la destrucción de partículas
 20 recubiertas de anticuerpos, eliminación de complejos inmunes, lisis de células objetivo recubiertas de anticuerpos por las células exterminadoras (llamadas citotoxicidad mediadas por células dependiente de los anticuerpos, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de producción de inmunoglobulinas.

En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-HER3 o un fragmento que une al
 25 antígeno del mismo proporciona para las funciones efectoras alteradas que, a su vez, afectan el perfil biológico del anticuerpo administrado o fragmento que une al antígeno del mismo. por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante pueden reducir el receptor Fc que une al anticuerpo modificado de circulación de este modo aumentando la localización del
 30 tumor. En otros casos, puede ser que las modificaciones de la región constante, consistente con esta invención, complemento moderado que une y de este modo reduce

la vida media en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Sin embargo, otras modificaciones de la región constante pueden utilizarse para eliminar vínculos de disulfuro o porciones de oligosacáridos que permiten mejorar la localización debido al aumento de especificidad de antígeno o flexibilidad de anticuerpo. De manera similar, las modificaciones de la región constante de acuerdo con esta invención se pueden hacer fácilmente utilizando técnicas bien conocidas de bioquímica o ingeniería molecular dentro del ámbito de los técnicos expertos.

En ciertos aspectos, una molécula de unión HER3 que es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo no tiene una o más funciones efectoras. por ejemplo, en algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento que une al antígeno del mismo no tiene actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o sin actividad de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-HER3 o fragmento que une al antígeno del mismo no se une a un receptor de Fc y/o factores de complemento. En ciertos aspectos, el anticuerpo o fragmento que une al antígeno del mismo no tiene ninguna función efectora.

Se observará que, en ciertos aspectos, los anticuerpos anti-HER3 modificados o fragmento que unen al antígeno de los mismos pueden diseñarse para fusionar el dominio CH3 directamente a la región de articulación de los anticuerpos modificados respectivos o fragmentos de los mismos. En otras construcciones, puede ser deseable proporcionar un espaciador peptídico entre la región de articulación y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. por ejemplo, construcciones compatibles pueden expresarse en donde el dominio CH2 ha sido eliminado y el dominio CH3 restante (modificado o no modificado) se une a la región de articulación con un espaciador de aminoácidos 5-20. Tal espaciador puede agregarse, por ejemplo, para asegurar que los elementos reguladores del dominio constante permanezcan libres y accesibles o que la región de articulación siga siendo flexible. Sin embargo, se observa que los espaciadores de aminoácidos pueden, en algunos casos, llegar a ser inmunogénicos y provocan una respuesta inmune no deseada contra el constructo. Por consiguiente, en ciertos aspectos, cualquier espaciador agregado a la construcción será relativamente no inmunogénico, o incluso omitido por completo, a fin de mantener las cualidades bioquímicas deseadas de los anticuerpos modificados.

Además de la eliminación de los dominios de región constantes completos, se apreciará que los anticuerpos anti-HER3 y fragmentos que unen al antígeno de los mismos de la presente invención pueden proporcionarse por la eliminación parcial o sustitución de unos pocos o incluso un único aminoácido. por ejemplo, la mutación de un

5 único aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión de Fc y por lo tanto aumentar la localización del tumor. Del mismo modo, puede ser deseable para simplemente eliminar esa parte de uno o más dominios de región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, complementar la unión de C1Q) para ser modulada. Tales supresiones parciales de las

10 regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo o fragmento que une al antígeno del mismo (por ejemplo, vida media en suero) mientras que deja otras funciones deseables asociadas con el dominio intacto de la región constante objeto. Por otra parte, como se ha aludido en lo anterior, las regiones constantes de los anticuerpos anti-HER3 descritos y fragmento que unen al antígeno de

15 los mismos pueden modificarse a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que mejoran el perfil de la construcción resultante. En este sentido, es posible interrumpir la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión de Fc) mientras se mantiene sustancialmente la configuración y perfil inmunogénico del anticuerpo modificado o fragmento que une al antígeno del mismo.

20 Ciertos aspectos pueden comprender la adición de uno o más aminoácidos de la región constante para mejorar características deseables, tales como la disminución o el incremento de la función efectora o proporcionar para más citotoxina o fijación de hidratos de carbono. En tales aspectos, puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de la región constante seleccionada.

25 La presente invención abarca además variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogas a los anticuerpos anti-HER3 quiméricos, humanizados y humanos, o fragmento que unen al antígeno de los mismos, establecidos en la presente. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservadora, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. por ejemplo, sustitución

30 conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro dentro de la misma clase general, tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido,

un aminoácido básico con otro aminoácido básico o un aminoácido neutro por otro aminoácido neutro. Lo que se pretende por una sustitución de aminoácidos conservadora es bien conocida en la técnica.

Un anticuerpo anti-HER3 o fragmento que une al antígeno del mismo
 5 puede modificarse adicionalmente para contener porciones químicas adicionales que normalmente no forman parte de la proteína. Estas porciones derivatizadas pueden mejorar la solubilidad, la vida media biológica o la absorción de la proteína. Las porciones también pueden reducir o eliminar los efectos secundarios deseables de las proteínas y similares. Una visión general para aquellas porciones puede encontrarse en Remington's
 10 Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

VI. Polinucleótidos que Codifican Moléculas que unen HER3

En ciertos aspectos, la invención abarca polinucleótidos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que se une específicamente
 15 a HER3 o un fragmento que une al antígeno del mismo. por ejemplo, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-HER3 o codifica un fragmento que une al antígeno de un anticuerpo. Los polinucleótidos de la invención pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico, y ADN sintético; y puede ser de doble
 20 hebra o de hebra sencilla, y si la hebra sencilla puede ser la hebra codificada o hebra no codificada (antisentido).

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

adicionales.

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

La presente invención además se refiere a variantes de los polinucleótidos descritos en la codificación, por ejemplo, fragmentos de unión a HER3, análogos y derivados de las moléculas de unión a HER3 de la invención.

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

En algunos aspectos una secuencia de ADN que codifica una molécula de unión a HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o un fragmento que une al antígeno del mismo puede construirse por síntesis química utilizando un sintetizador de oligonucleótidos. Tales oligonucleótidos pueden diseñarse basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando aquellos codones que están favorecidos en la célula huésped en la que se producirá el polipéptido recombinante de

interés. Los métodos estándar pueden aplicarse para sintetizar una secuencia de polinucleótido aislado que codifica un polipéptido aislado de interés. por ejemplo, una secuencia completa de aminoácidos puede utilizarse para construir un gen retro-traducido. Además, puede sintetizarse un oligómero de ADN que contiene una secuencia
 5 de nucleótidos que codifica para el polipéptido aislado particular. por ejemplo, varios oligonucleótidos pequeños que codifican para porciones del polipéptido deseado pueden sintetizarse y luego se ligan. Los oligonucleótidos individuales contienen típicamente 5' o 3' salientes para el ensamblaje complementario.

Una vez ensamblada (por síntesis, mutagénesis dirigida al sitio u otro
 10 método), las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido aislado de interés en particular se insertarán en un vector de expresión y unidos operativamente a una secuencia de control de expresión apropiada para la expresión de la proteína en un huésped deseado. El ensamblaje apropiado puede confirmarse por la secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricción, y la expresión de un polipéptido biológicamente activo
 15 en un huésped adecuado. Como es bien conocido en la técnica, con el fin de obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen debe estar unido operativamente a secuencias de control de transcripción y la expresión de traducción que son funcionales en el huésped de expresión elegido.

En ciertos aspectos, los vectores de expresión recombinantes se utilizan
 20 para amplificar y expresar ADN que codifica los anticuerpos anti-HER3 o fragmentos que unen al antígeno de los mismos. Los vectores de expresión recombinantes son construcciones de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican una cadena polipeptídica de un anticuerpo anti-HER3 o y el fragmento que une al antígeno a los mismos, unida de forma operativa a la transcripción
 25 adecuado o elementos traduccionales reguladores derivadas de mamífero, microbiano, genes virales o de insectos. Una unidad transcripcional generalmente comprende un ensamblaje de (1) un elemento genético o elementos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores de transcripción o mejoradores, (2) una secuencia estructural o codificadora que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína,
 30 y (3) la transcripción apropiada y la traducción de secuencias de iniciación y de terminación, como se describe en detalle a continuación. Tales elementos reguladores

pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. La capacidad para replicarse en un huésped, generalmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes, puede adicionalmente incorporarse. Las regiones de ADN están unidas operativamente cuando están

5 relacionadas funcionalmente entre sí. por ejemplo, el ADN para un péptido señal (líder secretor) se une de manera operativa al ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor se une de manera operativa a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma se une de manera operativa a una secuencia codificante si está

10 colocado de manera que permita la traducción. Los elementos estructurales se pretenden para utilizarse en sistemas de expresión de levadura que incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula huésped. Alternativamente, cuando la proteína recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo de metionina N-terminal. Este residuo puede de

15 manera opcional subsecuentemente escindirse de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

La elección de la secuencia de control de expresión y vector de expresión dependerá de la elección del huésped. Una amplia variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión puede emplearse. Los vectores de expresión útiles para

20 huéspedes eucarióticos, incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Vectores de expresión útiles para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *E. coli*, incluyendo pCR 1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de margen más amplio de huésped, tales como M13 y fagos de

25 ADN de hebra sencilla filamentosos.

Las células huésped adecuadas para la expresión de una molécula de unión a HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento que une al antígeno del mismo incluyen procariotas, levaduras, insectos o células eucariotas superiores bajo el control de promotores apropiados. Los procariotas incluyen organismos gram negativos o

30 gram positivos, por ejemplo *E. coli* o bacilos. Las células eucarióticas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero como se describe a continuación.

Sistemas de traducción libres de células también podrían emplearse. Los vectores de clonación y expresión apropiados para utilizarse con bacterias, hongos, levadura, y huéspedes celulares de mamífero se describen por Pouwels *et al.* (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N. Y., 1985), la descripción relevante de los cuales se incorpora en la presente para referencia. Información adicional acerca de los métodos de producción de proteínas, incluyendo la producción de anticuerpos, puede encontrarse, por ejemplo, en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2008/0187954, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,413,746 y 6,660,501, y la Publicación de Patente Internacional No. WO 04009823, cada una de las cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

Diversos sistemas de cultivo de células de mamíferos o insectos también pueden emplearse ventajosamente para expresar moléculas de unión a HER3 recombinantes, por ejemplo, anticuerpos anti-HER3 o fragmento que unen al antígeno de los mismos. La expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero puede realizarse debido a que las proteínas se pliegan correctamente en general, modificada de manera apropiada y completamente funcional. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero adecuados incluyen HEK-293 y HEK-293T, las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (Cell 23:175, 1981), y otras líneas celulares, incluyendo, por ejemplo, células L, C127, 3T3, ovario de hámster Chino (CHO), NSO, HeLa y líneas celulares BHK. Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor adecuado e intensificador unido al gen a ser expresado, y otro 5' o 3' secuencias no transcritas flanqueantes, y secuencias 5' o 3' no traducidas, tales como sitios de unión a ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, empalme del donador y sitios de aceptor, y secuencias de terminación de la transcripción. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos se revisan por Luckow and SuMMers, Bio Technology 6:47 (1988).

Moléculas de unión a HER3, por ejemplo, anticuerpos anti-HER3 o fragmento que unen al antígeno de los mismos producidos por un huésped transformado pueden purificarse de acuerdo con cualquier método adecuado. Tales métodos estándar incluyen la cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad y cromatografía en

columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Las etiquetas de afinidad tales como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de revestimiento de la influenza y la glutatona-S-transferasa pueden unirse a la proteína para permitir la fácil purificación
 5 mediante el paso sobre una columna de afinidad apropiada. Las proteínas aisladas también pueden caracterizarse físicamente utilizando técnicas como proteólisis, resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos x.

Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas que secretan la proteína recombinante en medios de cultivo pueden concentrarse primero utilizando un filtro de
 10 concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación adecuada. Alternativamente, una resina de intercambio de aniones puede emplearse, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos colgantes de dietilaminoetilo (DEAE). Las matrices pueden ser
 15 acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. Alternativamente, una etapa de intercambio catiónico puede emplearse. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos de sulfopropilo o carboximetilo. Finalmente, una o más etapas de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) empleando
 20 medios hidrofóbicos de RP-HPLC, por ejemplo, gel de sílice que tiene pendiente de metilo u otros grupos alifáticos, pueden emplearse para purificar además una molécula de unión HER3. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, también pueden emplearse para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

Una proteína de unión a HER3 recombinante, por ejemplo, un anticuerpo
 25 anti-HER3 o fragmento que une al antígeno del mismo producida en cultivo bacteriano pueden aislarse, por ejemplo, por extracción inicial de gránulos celulares, seguido de una o más etapas de concentración, precipitación por sales, intercambio de ion acuoso o etapas de cromatografía de exclusión por tamaño. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) puede emplearse para las etapas de purificación finales. Las células
 30 microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante pueden romperse por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación,

sonicación, rotura mecánica o uso de agentes de lisis celular.

Métodos conocidos en la técnica para purificar anticuerpos y otras proteínas también incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Nos. 2008/0312425, 2008/0177048, y 2009/0187005, cada uno de los cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

En ciertos aspectos, la molécula de unión a HER3 es un polipéptido que no es un anticuerpo. Una variedad de métodos para la identificación y producción de polipéptidos que no son anticuerpos que se unen con alta afinidad a una proteína objeto se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Skerra, Curr. Opin. Biotechnol., 18:295-304 (2007), Hosse *et al.*, Protein Science, 15:14-27 (2006), Gill *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 17:653-658 (2006), Nygren, FEBS J., 275:2668-76 (2008), y Skerra, FEBS J., 275:2677-83 (2008), cada uno de los cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad. En ciertos aspectos, la tecnología de presentación en fagos puede utilizarse para identificar/producir un polipéptido de unión a HER3. En ciertos aspectos, el polipéptido comprende una proteína de andamiaje de un tipo seleccionado del grupo que consiste de la proteína A, una lipocalina, un dominio de fibronectina, un dominio de repetición de consenso de anquirina, y tiorredoxina.

VI. Métodos de Tratamiento Utilizando Anticuerpos Anti-HER3
Terapéuticos

Los métodos de la invención se dirigen al uso de moléculas de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpos, incluyendo fragmentos que se unen al antígeno, variantes, y derivados de los mismos, para tratar a pacientes que tienen una enfermedad asociada con la expresión de HER3 o células que expresan HER3. Por “células que expresan HER3” se entiende una célula que expresa HER3. Los métodos para detectar la expresión de HER3 en las células son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, técnicas de PCR, inmunohistoquímica, citometría de flujo, transferencia de Western, ELISA, y similares.

Aunque la siguiente discusión se refiere a métodos de diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades y trastornos con una molécula de unión a HER3 de la invención, los métodos descritos en la presente son también aplicables a los

anticuerpos anti-HER3, y los fragmentos que unen al antígeno, variantes, y derivados de estos anticuerpos anti-HER3 que retienen las propiedades deseadas de los anticuerpos anti-HER3 de la invención, por ejemplo, capaces de unirse específicamente a HER3 y la neutralización de la actividad de HER3. En algunos aspectos, las moléculas de unión a

5 HER3 son anticuerpos humanos o humanizados que no median ADCC humana, o se seleccionan de entre anticuerpos anti-HER3 conocidos que no median ADCC, o son anticuerpos anti-HER3 que se han diseñado de tal manera que no median ADCC. En algunos aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo monoclonal en el clon

10 16. En otros aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo mutante YTE en el clon 16. En algunos aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo monoclonal P2B11. En algunos aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo monoclonal 1A4. En algunos aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo monoclonal 2C2. En algunos aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo monoclonal 2F10. En algunos aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo monoclonal

15 3E1. En algunos aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo monoclonal P2B11 diseñado para extender la vida media en suero. En algunos aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo monoclonal 1A4 diseñado para extender la vida media en suero. En algunos aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo monoclonal 2C2 diseñado para extender la vida media en suero. En algunos aspectos, la

20 molécula de unión a HER3 es un anticuerpo monoclonal 2F10 diseñados para extender la vida media en suero. En algunos aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo monoclonal 3E1 diseñados para extender la vida media en suero. En otros aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo mutante P2B11 YTE. En otros aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo mutante YTE 1A4. En otros aspectos, la

25 molécula de unión a HER3 es un anticuerpo mutante 2C2-YTE. En otros aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo mutante 2F10 YTE. En otros aspectos, la molécula de unión a HER3 es un anticuerpo mutante 3E1 YTE.

En un aspecto, el tratamiento incluye la aplicación o administración de una molécula de unión a anti-HER3, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento que une al

30 antígeno, variante, o derivado del mismo de la presente invención a un sujeto o paciente, o la aplicación o administración de la molécula de unión a anti-HER3 a un tejido aislado o

línea celular de un sujeto o paciente, donde el sujeto o paciente tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad, o una predisposición hacia una enfermedad. En otro aspecto, al tratamiento también se pretende incluir la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a anti-HER3, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento que une al antígeno, variante, o derivado del mismo de la presente invención a un sujeto o paciente, o la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a anti-HER3 a un tejido aislado o línea celular de un sujeto o paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad, o una predisposición hacia una enfermedad.

Las moléculas de unión a anti-HER3, por ejemplo, anticuerpos o fragmento que unen al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la presente invención son útiles para el tratamiento de varios tipos de cáncer. En un aspecto, la invención se refiere a moléculas de unión a anti-HER, por ejemplo, anticuerpos o fragmento que unen al antígeno, variantes, o derivados de los mismos para su uso como un medicamento, en particular para su uso en el tratamiento o la profilaxis del cáncer. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello de las células escamosas, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, y cáncer de mama.

De acuerdo con los métodos de la presente invención, al menos una molécula de unión anti-HER3, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo como se define en otra parte en la presente se utiliza para promover una respuesta terapéutica positiva con respecto al cáncer. El término “respuesta terapéutica positiva” con respecto al tratamiento contra el cáncer se refiere a una mejora en la enfermedad en asociación con la actividad de estas moléculas de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Por lo tanto, por ejemplo, una mejora en la enfermedad puede caracterizarse como una respuesta completa. Por “respuesta completa” se pretende una ausencia de la enfermedad clínicamente detectable con normalización de cualesquier resultados de pruebas anteriores. Alternativamente, una mejora en la enfermedad puede clasificarse como una respuesta parcial. Una “respuesta terapéutica positiva” abarca una reducción o

inhibición del progreso y/o duración del cáncer, la reducción o mejora de la gravedad del cáncer, y/o la mejora de uno o más síntomas del mismo que resulta de la administración de una molécula de unión anti-HER3 de la invención. En aspectos específicos, tales términos se refieren a uno, dos o tres o más resultados después de la administración de

5 moléculas de unión anti-HER3 de la invención: (1) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células de cáncer; (2) una estabilización o la reducción en el crecimiento del cáncer; (3) una alteración en la formación de cáncer; (4) la erradicación, eliminación o control de cáncer primario, regional y/o metastásico; (5) una reducción en la mortalidad; (6) un aumento en la supervivencia libre de enfermedad, sin recaídas, libre de

10 progreso, y/o general, duración, o índice; (7) un aumento en el índice de respuesta, la durabilidad de la respuesta, o el número de pacientes que responden o están en remisión; (8) una disminución en el índice de hospitalización, (9) una disminución en duraciones de hospitalización, (10) el tamaño del cáncer se mantiene y no aumenta o aumenta en menos de 10%, de preferencia menos de 5%, de preferencia menos de 4%, de

15 preferencia menos de 2%, y (12) un aumento en el número de pacientes en remisión.

La respuesta clínica puede evaluarse utilizando técnicas selección tales como barrido para formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), formación de imágenes radiográficas por rayos x, barrido por tomografía computarizada (CT), citometría de flujo o análisis de clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS),

20 histología, patología general, y química sanguínea, incluyendo pero no limitado a los cambios detectables por ELISA, RIA, cromatografía, y similares. Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto sometido a terapia con la molécula de unión anti-HER3, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, puede experimentar el efecto benéfico de una mejora en los

25 síntomas asociados con la enfermedad.

Las moléculas de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos, variantes, o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención pueden utilizarse en combinación con cualesquier terapias conocidas para el cáncer, incluyendo cualquier agente o combinación de agentes que se sabe que son útiles, o los cuales se

30 han utilizado o se encuentran actualmente en uso, para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de células

escamosas de cabeza y cuello, y cáncer de mama. El segundo agente o combinación de agentes de la formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación de preferencia tiene actividades complementarias al anticuerpo o polipéptido de la invención de modo que no se afecten adversamente entre sí.

5 Agentes anticancerosos incluyen fármacos utilizados para tratar los tumores malignos, tales como crecimientos cancerosos. El tratamiento farmacológico puede utilizarse solo, o en combinación con otros tratamientos tales como cirugía o terapia de radiación. Varias clases de fármacos pueden usarse en el tratamiento del cáncer, dependiendo de la naturaleza del órgano involucrado. por ejemplo, los cánceres
10 de mama son comúnmente estimulados por estrógenos, y pueden tratarse con fármacos que inactivan las hormonas sexuales. Del mismo modo, el cáncer de próstata puede tratarse con fármacos que inactivan los andrógenos, la hormona sexual masculina. Los agentes anti-cáncer para su uso en ciertos métodos de la presente invención incluyen, entre otros, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos que se unen a IGF-1R, anticuerpos que
15 se unen a EGFR, anticuerpos que se unen a HER2, anticuerpos que se unen a HER3, o anticuerpos que se unen a cMET), pequeñas moléculas dirigidas a IGF1R, pequeñas moléculas dirigidas a EGFR, pequeñas moléculas dirigidas a HER2, antimetabolitos, agentes alquilantes, inhibidores de topoisomerasa, agentes de orientación de microtúbulos, inhibidores de cinasa, inhibidores de síntesis de proteínas, agentes de
20 inmunoterapia, terapia hormonal, glucocorticoides, inhibidores de aromatasa, inhibidores de mTOR, agentes quimioterapéuticos, inhibidores de Proteína Cinasa B, inhibidores de Fosfatidilinositol 3-Cinasa (PI3K), inhibidores de Cinasa Dependiente de Ciclina (CDK), RLR9, CD289, inhibidores de enzimas, anti-TRAIL, inhibidores de MEK, etc.

En aspectos específicos de las moléculas de unión HER3 de la invención,
25 por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, pueden administrarse en combinación con anticuerpos o fragmentos de anticuerpos dirigidos al receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), por ejemplo, cetuximab (Erbix®), Imclone), panitumumab (Vectibix®, Amgen), matuzumab/EMD72000 (Merck Serono), MM-
151 oligoclonal (Merrimack), nimotuzumab (TheraCIM, InnGene Kalbiotechy),
30 GA201/RG7160 (Roche), Sym004 (Symphogen), MEHD-7945A (EGFR/HER3 doble específico, Genentech). En otros aspectos específicos las moléculas de unión HER3 de la

invención, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, pueden administrarse en combinación con anticuerpos o fragmentos de anticuerpos dirigidos HER2, por ejemplo, pertuzumab (rhuMAb 2C4/Omnitarg®, Genentech), trastuzumab (Herceptin®, Genentech/Roche), MM-111 (anticuerpo biespecífico

5 HER2/HER3, Merrimack, por ejemplo, WO 2009/126920). En aún otros aspectos específicos las moléculas de unión HER3 de la invención, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, pueden administrarse en combinación con anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que también se dirigen a HER3, por ejemplo, MEHD-7945A/RG7597 (EGFR/HER3 doble específico, Genentech, por ejemplo,

10 WO 2010108127), MM-121 (Merrimack, por ejemplo, WO 2008/100624), MM-111 (anticuerpo biespecífico HER2/HER3, Merrimack, por ejemplo, WO 2009/126920), AV-203 (Aveo, por ejemplo, WO 2011/136911), AMG888 (Amgen, WO 2007/077028), HER3-8 (ImmunogGen, por ejemplo, WO 2012/019024). En otros aspectos específicos de las moléculas de unión HER3 de la invención, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de

15 unión al antígeno de los mismos, pueden administrarse en combinación con anticuerpos o fragmentos de anticuerpos dirigidos a HER4. En un aspecto específico, las moléculas de unión HER3 de la invención pueden administrarse en combinación con un anticuerpo que se dirige a EGFR, o a HER2 (por ejemplo, cetuximab o trastuzumab). En un aspecto adicional específico, las moléculas de unión HER3 de la invención pueden administrarse

20 en combinación con conjugados de fármacos de anticuerpos que se dirige a HER2 (por ejemplo, trastuzumab emtansina, Genentech/Roche). Se contempla que las moléculas de unión HER3 de la invención mejoran la internalización y degradación de un co-receptor inducida por la unión de un anticuerpo al co-receptor y por lo tanto, mejorará la eficacia de un anticuerpo y/o conjugado de fármaco de anticuerpo que se dirige a EGFR, HER2 y/o

25 HER4.

En otros aspectos, las moléculas de unión HER3 de la invención pueden administrarse en combinación con inhibidores de tirosina cinasa. En algunos otros aspectos específicos, las moléculas de unión HER3 de la invención pueden administrarse en combinación con inhibidores de actividad de tirosina cinasa asociados con EGFR y/o

30 HER2/neu, por ejemplo, lapatinib. En aspectos específicos las moléculas de unión HER3 de la invención, pueden administrarse en combinación con inhibidores de molécula

pequeña del o de los receptores de factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, EGFR, HER2, HER4) por ejemplo, gefitinib (Iressa®, AstraZeneca); canertinib/CI-1033 (Pfizer); lapatinib (Tykerb®, GlaxoSmithKline), erlotinib (Tarceva®, OSI Pharma), afatinib (Tovok®/Tomtovok®, Boehringer Ingelheim), neratinib (HKI-272, Pfizer).

5 En algunos aspectos, las moléculas de unión HER3 de la invención pueden administrarse en combinación con agentes antimitóticos. En algunos aspectos específicos, las moléculas de unión HER3 de la invención pueden administrarse en combinación con agentes que estabilizan el ensamble de microtúbulos del huso mitótico, por ejemplo, paclitaxel o docetaxel.

10 En algunos aspectos, las moléculas de unión HER3 de la invención pueden administrarse en combinación con inhibidores de MEK (cinasa de la proteína cinasa activada con mitógeno (MAPK), también conocida como MAPKK), por ejemplo, selumetinib (AZD6244, ARRY-142866, AstraZeneca), WX-554 (Wilex), trametinib (GlaxoSmithKline), refametinib (Ardea Biosciences), E-6201 (Eisai), MEK-162 (Novartis).

15 En un aspecto particular, la combinación de un inhibidor de MEK y una molécula de unión HER3 de la invención es más eficaz que cualquier agente solo. En un aspecto específico, una molécula de unión HER3 de la invención se administra en combinación con selumetinib.

20 Donde las terapias combinadas comprenden la administración de una molécula de unión anti-HER3 en combinación con la administración de otro agente terapéutico, los métodos de la invención abarcan la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica simple, y la administración consecutiva en cualquier orden. En algunos aspectos, los anticuerpos anti-HER3 descritos en la presente se administran en combinación con otros fármacos, en donde el anticuerpo
25 o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo y el o los agentes terapéuticos pueden administrarse secuencialmente, en cualquier orden, o simultáneamente (es decir, concurrentemente o en el mismo intervalo de tiempo).

30 La terapia de combinación puede proporcionar “sinergia” y prueba ser “sinérgica”, es decir, el efecto logrado cuando los ingredientes activos se utilizan juntos es mayor que la suma de los efectos que resulta de utilizar los compuestos por separado. Un efecto sinérgico puede alcanzarse cuando los ingredientes activos son: (1) co-

formulados y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria, combinada; (2) emitidos por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se suministra en la terapia de alternancia, puede alcanzarse un efecto sinérgico cuando se administran los compuestos o se suministran secuencialmente, por ejemplo, por diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, una dosificación eficaz de cada ingrediente activo se administra secuencialmente, es decir, serialmente, mientras que en la terapia de combinación, dosis efectivas de dos o más ingredientes activos se administran juntos.

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

agente antimitótico es paclitaxel o docetaxel. En algunas modalidades específicas, el anticuerpo 2C2 puede administrarse en una combinación sinérgica con un inhibidor del receptor del factor de crecimiento (EGFR). En algunas modalidades específicas, el inhibidor de EGFR es un anticuerpo. En modalidades específicas, el anticuerpo inhibidor de EGFR administrado sinérgicamente con el anticuerpo 2C2 es Erbitux® (cetuximab). En modalidades específicas el anticuerpo 2C2 puede administrarse en una combinación sinérgica con inhibidores de la actividad tirosina cinasa asociados con EGFR y/o HER2/neu, por ejemplo, lapatinib. En algunas modalidades, el anticuerpo 2C2 puede administrarse en una combinación sinérgica con un agente antimitótico. En algunas modalidades específicas, el agente antimitótico administrado sinérgicamente con el anticuerpo 2C2 estabiliza el ensamblaje de microtúbulos del huso mitótico. En algunas modalidades específicas, el agente antimitótico administrado sinérgicamente con el anticuerpo 2C2 es paclitaxel.

En un aspecto, el cáncer comprende la mutación de KRAS. En aspectos específicos, la mutación de KRAS se ubica en el codón 12 de un gen de KRAS humano. Como se demuestra en la sección de Ejemplos, los anticuerpos anti-HER3 descritos en la presente como capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales que comprenden una mutación de KRAS, ya sea cuando se utiliza como agente único (monoterapia) o en combinación con otro agente terapéutico.

Un aspecto adicional es el uso de moléculas de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, para monitorear el diagnóstico de los niveles de proteína en tejido como parte de un procedimiento de prueba clínica, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento determinado. por ejemplo, la detección puede facilitarse acoplando el anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina,

diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, o ³H.

5

VII. Composiciones Farmacéuticas y Métodos de Administración

Métodos para preparar y administrar moléculas de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención a un sujeto en necesidad del mismo, son bien conocidos por o se determinan fácilmente por aquellos con experiencia en la técnica. La ruta de administración de la molécula de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral, como se usa en la presente incluye, por ejemplo, administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal, o vaginal. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas de la presente, moléculas de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, de la invención pueden ser suministrarse directamente al sitio de la población celular adverso incrementando por consiguiente la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

20

Como se discute en la presente, las moléculas de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención pueden ser administrados en una cantidad farmacéuticamente efectiva para el tratamiento *in vivo* de enfermedades mediadas por células que expresan HER3 tales como ciertos tipos de cánceres.

25

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en esta invención pueden comprender vehículos farmacéuticamente aceptables, incluyendo, por ejemplo, agua, intercambiadores iónicos, proteínas, sustancias reguladoras, y sales. Conservadores y otros aditivos también pueden estar presentes. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión. Las formulaciones adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos descritos en la presente se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16^a ed. (1980). En algunos aspectos, las moléculas de unión HER3 de la

30

invención se formulan en una composición estable en refrigerador (2-8 °C). En un aspecto particular, la composición estable en refrigerador comprende histidina/HCl de histidina 25 mM, sacarosa 205 mM, polisorbato 80 al 02% a pH 6.0. En otro aspecto particular, las moléculas de unión HER3 de la invención se formulan a 25-100 mg/ml en la composición estable en refrigerador.

En cualquier caso, las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante al incorporar un compuesto activo (por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, por sí mismo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, seguido por esterilización filtrada. Además, las preparaciones pueden empaquetarse y venderse en la forma de un kit. Tales artículos de fabricación pueden tener etiquetas o inserciones de paquete indicando que las composiciones asociadas son útiles para tratar de un sujeto que sufre de o predispuesto a una enfermedad o trastorno.

Las formulaciones parenterales pueden ser una dosis de bolo simple, una infusión o una dosis de bolo de carga seguida de una dosis de mantenimiento. Estas composiciones pueden administrarse a intervalos fijos o variables específicos, por ejemplo, una vez al día, o en una base de “cuando se necesite”.

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

Las dosis terapéuticamente efectivas de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de enfermedades mediadas por células que expresan HER3 tales como ciertos tipos de cánceres incluyendo, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata y cáncer de mama, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio objetivo, estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Usualmente, el paciente es un ser humano, aunque mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos también puede tratarse. Las dosificaciones de tratamiento

pueden titularse utilizando métodos de rutina conocidos por aquellos con experiencia en la técnica para optimizar la seguridad y la eficacia.

La cantidad de al menos una molécula de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión, variante, o derivado de la misma para administrarse se determina fácilmente por alguien con experiencia ordinaria en la técnica sin experimentación indebida dada la descripción de la presente invención. Factores que influyen en el modo de administración y la cantidad respectiva de al menos una molécula de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo incluyen, pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad, el historial de la enfermedad y la edad, estatura, peso, salud y condición física del individuo sometido a terapia. Similarmente, la cantidad de molécula de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpo, o fragmento, variante, o derivado del mismo, a administrarse dependerá del modo de administración y de si el sujeto se someterá a una dosis simple o múltiples dosis de este agente.

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

La invención también proporciona el uso de una molécula de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpo de la invención, o un fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto para tratar un tipo de cáncer. En ciertos aspectos, el medicamento se usa en un sujeto que se ha tratado previamente con al menos otra terapia. Por “tratado previamente” o “tratamiento previo” se pretende que el sujeto ha recibido uno o más de otras terapias (por ejemplo, se ha tratado con al menos otra terapia contra el cáncer) antes de recibir el medicamento que comprende la molécula de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo. No es necesario que el sujeto fuera un paciente que responde al tratamiento previo con la terapia o terapias previas. Por lo tanto, el sujeto que recibe el medicamento que comprende la molécula de

unión anti-HER3, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo puede haber respondido, o puede haber fallado en responder a un tratamiento previo con la terapia anterior, o a uno o más de los tratamientos anteriores en donde el tratamiento previo comprende múltiples terapias.

5 La invención también proporciona la co-administración de una molécula de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpo de la invención, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo y al menos otra terapia. El anticuerpo anti-HER3 y al menos una terapia adicional pueden co-administrarse juntos en una composición simple o se pueden co-administrarse juntos al mismo tiempo o tiempos de solapamiento
10 en composiciones separadas.

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

VIII Diagnósticos

 La invención proporciona además un método de diagnóstico útil durante el
20 diagnóstico de las enfermedades mediadas por células que expresan HER3 tales como ciertos tipos de cáncer, incluyendo, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, y cáncer de mama, lo cual implica medir el nivel de expresión de la proteína HER3 o transcripción en el tejido u otras células o fluido corporal
25 de un individuo y comparar el nivel de expresión medido con un nivel de expresión HER3 estándar en tejido normal o de fluido corporal, por lo que un aumento en el nivel de expresión en comparación con el estándar es indicativo de un trastorno.

 Los anticuerpos anti-HER3 de la invención y fragmentos, variantes, y derivados de los mismos de unión al antígeno, se pueden utilizar para someter a ensayo
30 los niveles de proteína HER3 en una muestra biológica utilizando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica (por

ejemplo, véase Jalkanen, *et al.*, *J. Cell Biol.* 101:976-985 (1985); Jalkanen *et al.*, *J. Cell Biol.* 105:3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión de la proteína HER3 incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunoprecipitación, o transferencia Western.

5 Los ensayos adecuados se describen en más detalle en otra parte en la presente.

Por “ensayar el nivel de expresión de polipéptido HER3” se pretende medir o calcular cualitativa o cuantitativamente el nivel del polipéptido de HER3 en una primera muestra biológica, ya sea directamente (por ejemplo, determinando o estimando el nivel de proteína absoluto) o relativamente (por ejemplo, al comparar al nivel de polipéptido asociado con la enfermedad en una segunda muestra biológica). El nivel de expresión del polipéptido de HER3 en la primera muestra biológica puede medirse o calcularse y compararse con un nivel de polipéptidos HER3 estándar, el estándar que se toma a partir de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene el trastorno o que se determina al promediar los niveles de una población de individuos no tiene el trastorno. Como se apreciará en la técnica, una vez que se conoce el nivel de polipéptido HER3 “estándar”, puede usarse repetidamente como un estándar para la comparación.

La invención proporciona además un método de diagnóstico útil durante el diagnóstico de las enfermedades mediadas por células que expresan HER3 tales como ciertos tipos de cáncer, incluyendo, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, y cáncer de mama, lo cual implica medir el nivel de actividad de la proteína HER3 en el tejido u otras células o fluido corporal de un individuo y comparar el nivel de actividad medida con un nivel de actividad de HER3 estándar en el tejido o fluido corporal normal, por lo que un aumento en la nivel de actividad comparado con el estándar es indicativo de un trastorno.

La invención proporciona además un método de diagnóstico útil durante el tratamiento de las enfermedades mediadas por células que expresan HER3 tales como ciertos tipos de cáncer, incluyendo, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de páncreas, de próstata cáncer, y el cáncer de mama, que implica medir el nivel de actividad de la proteína HER3 en el tejido u otras células o fluido corporal de un individuo

durante el tratamiento de una enfermedad mediada por células que expresan HER3 y comparando el nivel de actividad medida con un nivel de actividad de HER3 estándar en el tejido normal o fluido corporal y/o comparando el nivel de actividad medida con un nivel de actividad de HER3 estándar en el tejido o fluido corporal obtenido del individuo antes
 5 del tratamiento, por lo que una disminución en el nivel de actividad comparado con el estándar es indicativo de una inhibición de actividad de HER3.

Por “ensayar el nivel de expresión de la proteína HER3” se pretende medir cualitativa o cuantitativamente o calcular la actividad de la proteína HER3 en una primera muestra biológica, ya sea directamente (por ejemplo, determinando o estimando el nivel
 10 de actividad absoluto) o relativamente (por ejemplo, por la comparación del nivel de actividad en una segunda muestra biológica). El nivel de actividad de la proteína HER3 en la primera muestra biológica puede medirse o calcularse y compararse con una actividad de proteína HER3 estándar, el estándar que se toma a partir de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene el trastorno o se determina al promediar
 15 los niveles de una población de individuos no tiene el trastorno o de un individuo antes del tratamiento. Como se apreciará en la técnica, una vez que se conoce el nivel de actividad de la proteína HER3 “estándar”, puede usarse repetidamente como un estándar para comparación. En ciertos aspectos, el nivel de actividad de HER3 en una muestra biológica se midió o se calculó o se comparó al detectar HER3 fosforilado en una muestra biológica.
 20 En un aspecto específico, el nivel de actividad de HER3 en una muestra biológica se midió o se calculó o se comparó al detectar HER3 fosforilado en una biopsia de piel, en donde la piel se estimulada con HRG antes o después de la biopsia.

Por “muestra biológica” se pretende cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, línea celular, cultivo de tejido, u otra fuente de células que expresan
 25 potencialmente HER3. Los métodos para obtener biopsias de tejidos y fluidos corporales de mamíferos son bien conocidos en la técnica.

En algunos aspectos, la bioactividad de un inhibidor de HER3 (por ejemplo, anticuerpo anti-HER3 de la invención y fragmentos de unión al antígeno, variantes y derivados de los mismos) administrados a un sujeto pueden detectarse utilizando un
 30 ensayo ex vivo. En aspectos particulares, el ensayo ex vivo comprende detectar el nivel de HER3 fosforilado en una biopsia de piel, en donde la piel se estimula con HRG antes o

después de la biopsia. En un aspecto específico las biopsias de piel correlacionadas se toman de un sujeto al que se ha administrado el inhibidor de HER3. En un aspecto específico, la HRG se inyecta debajo de una primer área de la piel y un regulador de control se inyecta bajo una segunda zona de la piel de un sujeto administra con el

5 inhibidor de HER3, en donde después de una cantidad de tiempo deseada (por ejemplo, 10-60 minutos) una biopsia se toma de la primera y segunda áreas de la piel. En un aspecto alternativo, se trató una primera biopsia de piel con HRG y se trató una segunda biopsia de la piel con un regulador de control, en donde la primera y segunda biopsias son biopsias de piel correlacionadas se toman de un sujeto al que se ha administrado el

10 inhibidor de HER3. En otro aspecto específico, se detecta el nivel de HER3 fosforilado en las biopsias de piel. En ciertos aspectos, se determina la diferencia en el nivel de HER3 fosforilado entre la primera (HRG tratada) y la segunda biopsia (regulador de control tratado). En ciertos aspectos, la biopsia de piel se homogeneizó y se detectó el nivel de HER3 fosforilado por ELISA. En aún otros aspectos, los niveles de HER3 fosforilado en

15 las biopsias de piel de un sujeto al que se ha administrado el inhibidor de HER3 se compara con los niveles de HER3 fosforilado en biopsias de piel de un sujeto control al que no se ha administrado el inhibidor de HER3, en donde una reducción en el nivel de HER3 fosforilado en las biopsias de la piel del sujeto al que se ha administrado el inhibidor de HER3 es una medida de la bioactividad del inhibidor de HER3. En aspectos

20 alternativos, los niveles de HER3 fosforilado en las biopsias de piel de un sujeto al que se ha administrado el inhibidor de HER3 se compara con los niveles de HER3 fosforilado en biopsias de piel del mismo sujeto tomadas antes de la administración del inhibidor de HER3, en donde una reducción en el nivel de HER3 fosforilado en las biopsias de piel del sujeto después de la administración del inhibidor de HER3 es una medida de la

25 bioactividad del inhibidor de HER3. Otros aspectos específicos de los métodos se detallan en la sección de Ejemplos 5.15.

IX Kits que comprenden Moléculas de unión HER3

La presente invención proporciona kits que comprenden la molécula de

30 unión HER3, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o el fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención descrita en la presente y que puede utilizarse para llevar a cabo

los métodos descritos en la presente. En ciertos aspectos, un kit comprende al menos un anticuerpo anti-HER3 purificado o un fragmento de unión al antígeno del mismo en uno o más recipientes. En algunos aspectos, los kits contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para realizar un ensayo de detección, incluyendo todos los
 5 controles, instrucciones para la realización de ensayos, y cualquier software necesario para el análisis y presentación de los resultados. Alguien con experiencia en la técnica reconocerá fácilmente lo que describe la molécula de unión HER3, por ejemplo, un fragmento de unión de anticuerpo o antígeno anti-HER3 del mismo de la presente invención puede incorporarse fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que
 10 son bien conocidos en la técnica.

X. Inmunoensayos

Las moléculas de unión anti-HER3, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, variantes, o derivados de los mismos de las
 15 moléculas de la invención pueden probarse por unión inmuno-específica por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden utilizarse incluyen, aunque no se limitan a sistemas de ensayo competitivos y no competitivos utilizando técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos "intercalados", ensayos de
 20 inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por nombrar sólo algunos. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, Eds, (1994) *Current*
 25 *Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York) vol. 1, que se incorpora en la presente para referencia en su totalidad).

Las Moléculas de unión HER3, por ejemplo, anticuerpos anti-HER3 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, variantes, o derivados de los mismos de las moléculas de la invención, pueden emplearse histológicamente, como en
 30 inmunofluorescencia, microscopía inmunoelectrónica o ensayos no inmunológicos, por detección in situ de los receptores HER3 o variantes conservadas o fragmentos peptídicos

de los mismos. La detección *in situ* puede lograrse mediante al eliminar una espécimen histológico de un paciente, y aplicar al mismo una molécula de unión HER3 etiquetada, por ejemplo, un anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo, variante, o derivado del mismo, aplicado de preferencia al superponer la molécula de unión HER3 etiquetada (por ejemplo, y el anticuerpo o fragmento) en una muestra biológica. A través del uso de un procedimiento, es posible determinar no sólo la presencia de HER3, o variantes conservadas o fragmentos peptídicos, sino también su distribución en el tejido examinado. Usando la presente invención, aquellos con experiencia ordinaria percibirán fácilmente que cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) se pueden modificar con el fin de conseguir tal detección *in situ*.

La actividad de unión de un lote dado de molécula de unión HER3, por ejemplo, el anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo, variante, o derivado del mismo puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos. Aquellos con experiencia en la técnica serán capaces de determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación de rutina.

Los métodos y reactivos adecuados para la determinación de características de unión de una molécula de unión HER3 aislada, por ejemplo, anticuerpo anti-HER3 o fragmento de unión al antígeno del mismo, variante, o un derivado alterado/mutante de la misma, se conocen en la técnica y/o se encuentran comercialmente disponibles. Equipos y software diseñado para tales análisis cinéticos se encuentran comercialmente disponibles (por ejemplo, BIAcore, software BIAevaluation, GE Healthcare; Software KinExA, Sapidyne Instruments).

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, las cuales se encuentran dentro de la experiencia del arte. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Ed. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual (2^a ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, Ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva

York); D. N. Glover ed, (1985) DNA Cloning, Volúmenes I y II.; Gait, ed. (1984) oligonucleotide Synthesis; Mullis et al. Patente de los Estados Unidos No. 4,683,195; Hames y HlgG1ns, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames y HlgG1ns, eds. (1984) Transcription And Traslation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.);

5 Immobilized Cells y Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A practical Guide to Molecular Cloning; el tratado, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., Nueva York); Miller y Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155; Mayer y Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology

10 (Academic Press, London); Weir y Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y en Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

Los principios generales de la ingeniería de anticuerpos se establece en

15 Borrebaeck, ed. (1995) Antibody Engineering (2ª ed.; Oxford Univ. Press). Los principios generales de la ingeniería de proteínas se establecen en Rickwood et al., eds. (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press en Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Los principios generales de anticuerpos y unión de anticuerpo-hapteno se establecen en: Nisonoff (1984) Molecular Immunology (2ª ed.; Sinauer Associates,

20 Sunderland, Mass.); and Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman y Hall, Nueva York, N.Y.). Adicionalmente, los métodos estándar en inmunología conocidos en la técnica y no descritos específicamente en general se siguen como en Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites et al, eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8ª ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) y

25 Mishell y Shiigi (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman and Co., NY).

Los trabajos de referencia estándar que establecen los principios generales de la inmunología incluyen Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley

30 & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal

Antibody Technology” en Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden et al., (Elsevere, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) Kuby Immunnology (4^a ed.; H. Freemand & Co.); Roitt et al. (2001) Immunology (6^a ed.; London: Mosby); Abbas et al. (2005) Cellular and Molecular Immunology (5^a ed.; Elsevier Health Sciences
5 Division); Kontermann and Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlan); Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall2003); Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach y Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press).

10 Todas las referencias citadas anteriormente, así como todas las referencias citadas en la presente, se incorporan en la presente para referencia en su totalidad.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

15 **EJEMPLOS**

Los aspectos de la presente descripción pueden definirse adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que describen en detalle la preparación de ciertos anticuerpos de la presente descripción y métodos para utilizar los anticuerpos de la presente descripción. Será evidente para aquellos con experiencia en la
20 técnica que muchas modificaciones, tanto a los materiales como a los métodos, pueden ponerse en práctica sin apartarse del alcance de la presente descripción.

Ejemplo 1. Métodos para Aislamiento/Optimización de Anticuerpos Monoclonales anti-HER3

25 **1.1 Antígenos y Líneas de Células**

Her1(ECD)/Fc quimera humano recombinante, HER2(ECD)/Fc quimera humano, HER3(ECD)/Fc quimera humano y Her4(ECD)/Fc humano todos se adquirieron de R&D Systems (Minneapolis, MN) y se fusionaron a la etiqueta de Histidina 6X C-terminal por medio de un péptido enlazador. El HER3(ECD)/Fc quimera de ratón
30 recombinante se generó en la instalación. Las células de cáncer de mama KPL-4 humanas se cultivaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 5% (FBS).

1.2. Selección de Librería de los Enlazadores de HER3 - Identificación del Anticuerpo de Clon 16 (CL16)

El HER3(ECD)/Fc no marcado y biotinilado se utilizó como los objetivos para la selección de enlazadores de HER3 de la librería de exhibición de fago Fab humana Fab 310 de Dyax (Dyax, Cambridge, MA). Dos brazos de inmunopurificación se llevaron a cabo: la inmunopurificación capturada y la inmunopurificación en solución. Para la inmunopurificación capturada, el fago de entrada primero se incubó con IgG humano policlonal capturado en inmunotubos por medio de la Proteína A/G recombinante inmovilizada, y luego seleccionaron con el objetivo no marcado capturado en los inmunotubos por medio de la Proteína A/G recombinante inmovilizada.

En la inmunopurificación en solución, el fago de entrada se dejó incubar con IgG humano policlonal, cuentas magnéticas recubiertas de estreptavidina con biotina enfriada para la des-selección y luego seleccionado con el objetivo biotinilado con incubación subsecuente con cuentas magnéticas recubiertas de estreptavidina para capturar el fago enlazado al objetivo. Después de la remoción del fago no enlazado mediante el lavado extensivamente con TPBS (1x PBS/Tween-20 al 0.1%), el fago enlazado se eluyó con TEA (trietilamina) 100 mM. El fago eluido y el fago restante sobre las cuentas de la inmunopurificación en solución subsecuentemente se amplificaron, y se sometieron a rondas de selección adicionales. Tres rondas de selección se llevaron a cabo para cada brazo de selección.

El porcentaje de fagos de enlace positivos varió de menor que 1% utilizando la inmunopurificación de captura hasta 68% utilizando tres rondas de inmunopurificación en solución (TABLA 3).

25

TABLA 3: Clasificación de enlazadores de HER3.

Inmunopurificación	Inmunopurificación Capturada	Segunda Ronda de Inmunopurificación en Solución	Tercera Ronda de Inmunopurificación en Solución
Clones totales clasificados	380	285	475

Clones positivos	1	7	322
Tasa positiva (%)	<1	2	68

1.3. Clasificación para Enlazadores de HER3 de Humano y de Ratón mediante ELISA de Fago

5 El fago enriquecido de la segunda y la tercera rondas de selección se clasificó mediante ELISA de fago para el enlace de HER3 de humano y de ratón. Placas de media área de 96 cavidades se recubrieron con 5 µg/ml, 50 µl por cavidad de diferentes antígenos diluidos en 1x PBS, pH 7.4 durante la noche a 4°C. Las placas recubiertas se bloquearon con leche sin grasa al 3% (p/v) en TPBS durante 1 hora a

10 temperatura ambiente, y se lavaron dos veces con TPBS. Las placas luego se incubaron durante 1 hora con el sobrenadante de fago durante la noche. Después de lavar diez veces con TPBS, las placas se incubaron con el anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 hora, y se lavaron diez veces. Las placas se revelaron con solución de substrato de peroxidasa de tetrametilbencidina (TMB), las

15 reacciones se detuvieron con 0.18 M de H₂SO₄, y las placas se leyeron en 450 nm en un lector de placa de ELISA.

29 enlazadores positivos únicos se identificaron que fueron reactivos cruzadamente a HER3 de murino (como una fusión de HER3-Fc). Ninguno de los enlazadores identificados mostró reactividad cruzada a HER2 o Her4 (datos no

20 mostrados).

1.4. Reformateo de Fabs en Anticuerpos IgG Completos y Expresión

La cadena ligera variable de inmunoglobulina (VL) y la cadena pesada variable (VH) de los clones de fago positivos se generaron mediante PCR y se insertaron

25 en un vector de expresión IgG1 humano que contiene la región constante de cadena ligera lambda y la región CH1-bisagra-CH2-CH3 IgG1. Para expresar los anticuerpos IgG1, células 293-F de riñón embrionario humano se transfectaron transientemente con los vectores IgG reformateados utilizando el reactivo 293fectin™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los medios acondicionados se recolectaron 10 días después de la transfección, se

acumularon y se filtraron estérilmente. Los IgG1s se purificaron utilizando cuentas de proteína A. Los IgG1s eluidos finales se dializaron contra PBS, y las concentraciones de IgG1 se determinaron mediante el ensayo de cuantificación de proteína.

El clon 16 (CL16; SEQ ID NOs: 1 y 2, secuencias de aminoácidos VL y VH, respectivamente) se reformateó a IgG1 humano.

1.5. Determinación de la Internalización del Anticuerpo del Clon 16 (CL16) mediante inmunofluorescencia

Las células KPL-4 de cáncer de mama humano se marcaron con el anticuerpo de Clon 16 (CL16). La incubación de las células con CL16 condujo un incremento en la endocitosis de HER3, que previno al receptor de formar complejos de señalización activos con HER2 en la superficie de la célula.

Los anticuerpos CL16 unidos a la superficie de la célula se dejaron internalizar al incubar las células bajo condiciones de crecimiento de ya sea cero (no internalizado) o 2.5 horas (internalizado) (**FIGURA 1**). Todas las células luego se fijaron con paraformaldehído al 3.7%, se lavaron en PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% en PBS y se mancharon con 1 µg/ml de IgG anti-humano de cabra Alexa Fluor^R 488 (Invitrogen) antes de la adición del medio de montaje antidesgaste y el examen de microscopía fluorescente. El anticuerpo CL16 se encontró que se internaliza en las células KPL-4. En el tiempo cero las células KPL-4 mostraron manchados de superficie de célula intenso (**FIGURA 1**, 0 horas, panel superior), después de la incubación bajo condiciones de crecimiento durante 2.5 horas el manchado de la superficie de célula se disminuyó y se reemplazó por el manchado puntual intracelular indicativo de internalización (**FIGURA 1**, 2.5 horas, paneles del fondo).

1.6. Construcción de un Vector de Fago que Expresa Fab del Clon 16

DNA que codifica el fragmento de enlace de antígeno (Fab) del Clon 16 de anticuerpo se clonó en un vector de expresión de fago a base de M13 modificado previamente descrito por Dall'Acqua y colaboradores, (Dall'Acqua y colaboradores, 2005, Methods. 36:43-60). En este vector modificado, un DNA de región constante lambda (λ) humano se diseñó en lugar de la cadena ligera kappa (κ) humana. La expresión del

fragmento Fab está bajo el control del promotor LacZ y la secreción del fragmento Fab es habilitada por las secuencias de señal P3 del fago fusionadas a las N-terminales de ya sea las cadenas VH y VL del fragmento de Fab. La clonación se llevó a cabo mediante mutagénesis de hibridación como es descrito por Kunkel (Kunkel, T.A., 1985, Proc Natl. Acad. Sci. USA; 82:488-492) y Wu (Wu, H., 2003, Methods Mol. Biol.207:197-212).

Brevemente, las regiones variables del IgG del Clon 16 se amplificaron mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Mediante la hibridación seguido por la reacción de polimerización de DNA, la región ligera variable del Clon 16 se integró en la estructura con la región constante de lambda humana, y la región pesada variable se clonó en la estructura con la región constante de cadena pesada 1 humana (CH1), respectivamente. El vector de fago que contiene el fragmento Fab del Clon 16 luego se cultivó en la cepa CJ236 de *Escherichia coli* para producir DNA de una sola hebra que contiene uridina (U) (ssDNA) como es descrito por Wu y An (Wu, H. and An, LL., 2003, Methods Mol. Biol.207:213-33). El ssDNA que contiene uridina se utilizó como la plantilla para introducir mutaciones diseñadas para mejorar la afinidad de enlace a HER3.

1.7. Línea Germinal del Clon 16 (CL16)

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

Los resultados de enlace mostraron que la mutación de aminoácido H38Q

en la estructura 2 mejoró el enlace sobre el Clon 16 parental como es medido mediante ELISA. En contraste, la mutación S49Y en la misma estructura tuvo impacto negativo en el enlace. Otras mutaciones puntuales no mostraron impacto en el enlace de HER3. El mutante de línea germinal completamente con todos los 6 aminoácidos no de línea
 5 germinal mutados mostró un grado similar de enlace reducido como la mutación puntual S50Y, indicando que el aminoácido S50 participa en el enlace. La prueba adicional del clon con todas las mutaciones puntuales de línea germinal excepto S50Y retuvo y/o incrementó el enlace a HER3 comparado con el clon parental 16. Este clon de línea germinal parcialmente, el Clon 16 (GL) (también referido aquí como "GL-P6"), se utilizó
 10 como la plantilla para la optimización de afinidad adicional.

1.8. Optimización de Afinidad del Clon 16 (CL16)

Cada aminoácido de todas las 6 regiones de determinación de complementariedad (CDRs) del clon GL-P6 de línea germinal se mutó individualmente a
 15 otros 20 aminoácidos utilizando un método de mutagénesis de hibridación (Kunkel, 1985). Dos conjuntos de cebadores de DNA, uno que contiene un codón NSS que codificó 8 aminoácidos y el otro que contiene un codón NWS que codifica 12 aminoácidos diferentes, se utilizaron para introducir mutaciones a cada posición CDR dirigida. Los cebadores degenerados individuales se utilizaron en reacciones de mutagénesis de
 20 hibridación. Brevemente, cada cebador degenerado se fosforiló, luego se utilizó una relación 10:1 con el ssDNA de Fab de GL-16 uridinilado. La mezcla se calentó a 95°C luego se enfrió a 55°C durante 1 hora. Después, la T4 ligasa y la T7 DNA polimerasa se adicionaron y la mezcla se incubó durante 1.5 horas a 37°C. Los productos de síntesis para CDRs de VH y VL se acumularon respectivamente; sin embargo, las librerías NSS y
 25 NWS se mantuvieron separadas y se clasificaron independientemente. Típicamente, 1 µl del DNA de librería acumulado se electroporó en XL1-Blue para la formación de placa en el tendido bacteriano XL1-Blue o para la producción de fragmentos Fab (Wu y An, 2003).

1.9. Clasificación Primaria de la Librería Fab

30 La clasificación primaria consistió de un ensayo de ELISA de un solo punto (SPE) que se llevó a cabo utilizando el sobrenadante de cultivo de bacterias cultivadas en

placas de 96 cavidades (cavidad profunda) e infectadas con clones M13 recombinantes individuales como es descrito en otra parte (Wu y An, 2003). Brevemente, esta ELISA de captura involucró el recubrimiento de cavidades individuales de una Inmunoplaaca Maxisorp de 96 cavidades con aproximadamente 50 ng de un anticuerpo Fd anti-humano
 5 de oveja (Bioscience Resource Project, ME) en una solución amortiguadora de carbonato en pH 8.5 durante la noche a 4°C. Al siguiente día, la placa se bloqueó con BSA al 3% en solución amortiguadora de PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. El sobrenadante de Fab luego se adicionó a la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hr. Después del lavado, 0.1 µg de la proteína HER3 biotinilada se adicionó a la cavidad y la
 10 mezcla se incubó durante 1.5 h a temperatura ambiente. Esto fue seguido por la incubación con el conjugado de neutravidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) (Pierce, IL) durante aproximadamente 40 min a temperatura ambiente. La actividad de HRP se detectó con el substrato de tetra-metil-bencidina (TMB) y la reacción se detuvo con H₂SO₄ 0.2 M. Las placas se leyeron a 450 nm.

15 Los clones que exhiben una señal de densidad óptica (DO) en 450 nm más grande que el Fab del clon GL-P6 parental se recolectaron y se recultivaron (15 mL) (Wu y An, 2003) y se re-ensayaron mediante ELISA (como es descrito en lo anterior) por duplicado para confirmar los resultados positivos. Los clones que exhibieron repetidamente una señal más grande que aquella del Fab GL-P6 se secuenciaron. La
 20 concentración de proteína Fab de cada clon que tuvo un cambio de CDR luego se determinó mediante una ELISA Fab cuantitativa, donde un Fab con concentración conocida se utilizó como una referencia. La concentración de Fab se determinó al comparar las señales de ELISA con las señales generadas por el Fab de referencia. El ensayo de enlace se repitió una vez más para todas las variantes positivas bajo
 25 concentraciones de Fab normalizadas con el fin de determinar la afinidad de enlace relativa de los Fab mutantes y el Fab GL-P6 parental.

La ELISA de enlace mostró que dos variantes VH, designadas clon 14C7 y clon 15D12, que contuvieron las mutaciones puntuales Y50I o Y50V, respectivamente, en CDR2 exhibieron un mejoramiento de aproximadamente 5 veces en el enlace de HER3
 30 sobre el clon GL-P6 de línea germinal, parental. En la campaña de mutagénesis de VL, varias mutaciones individuales ya sea en CDR1, por ejemplo, el clon 4H6 (que comprende

la mutación puntual S24R), clon 6E3 (que comprende la mutación puntual S27L) o CDR3, por ejemplo, clon 5H6 (que comprende la mutación puntual S94G), clon 8A3 (que comprende la mutación puntual S96aI), clon 4C4 (que comprende la mutación puntual S96aR), clon 2B11 (que comprende la mutación puntual S96aP) y el clon 2D1 (que
5 comprende la mutación V97A) que exhibe enlace mejorado fueron identificados.

Mucho más notablemente, la sustitución del aminoácido S96a de VL-CDR3 con ya sea Isoleucina (I), Arginina (R) o Prolina (P) dio por resultado un mejoramiento de enlace de 3.5 veces, 8.6 veces y 32 veces, respectivamente.

1.10. Clasificación Combinatoria de la Librería Fab

10 Las mutaciones puntuales en VH y VL determinaron que es benéfico para el enlace a HER3 que además se combinaron para ganar sinergia de enlace adicional. Los mutantes combinatorios expresaron como Fab y se clasificaron utilizando la ELISA de enlace de HER3. Mientras que se combina ya sea una de la mutación puntual Y50I o Y50V en la cadena VH del fragmento Fab con las mutaciones VL pareció no tener
15 beneficio pero el enlace reducido a HER3, combinando varias mutaciones VL además mejoró el enlace. Estas combinaciones de mutaciones VL incluyen las combinaciones en el clon 1A4 (que comprende las mutaciones puntuales L96P, S97P y V100A), el clon 2C2 (que comprende las mutaciones puntuales S26L, L96P, S97P y V100A), clon 2F10 (que comprende las mutaciones S97P y V100A) y clon 3E1 (que comprende las mutaciones
20 puntuales S23R, L96P, S97P y V100A).

1.11. Conversión de las Variantes Fab Optimizadas en Afinidad al Formato IgG y Expresión de Anticuerpo

El mutante individual y las variantes mutantes de combinación que exhiben
25 enlace mejorado se convirtieron en el formato IgG para la caracterización adicional. Las regiones variables de cada variante se amplificaron mediante PCR utilizando cebadores que codificaron los sitios de recepción para facilitar la clonación en un vector de expresión mamífero IgG para la expresión utilizando células HEK 293F. Las proteínas, IgG1 humanas solubles, secretadas se purificaron del medio acondicionado directamente en las
30 columnas de proteína A HiTrap 1 mL (GE Healthcare, NJ) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La muestras IgG1 humanas purificadas (típicamente > 95%

de homogeneidad, como es estimado por la electroforesis en dodecil sulfato de sodio-gel de poliacrilamina) se dializaron contra PBS, se congelaron instantáneamente y se almacenaron a -70°C.

El enlace de las IgGs purificadas se examinó utilizando una ELISA de
5 enlace de HER3. Las IgGs mutantes de combinación mostraron enlace mejorado como es determinado por la señal de enlace total, con 2C2 que muestra el mejoramiento de enlace mucho más significativo sobre el Clon 16 parental y otras variantes de mutantes de combinación. El enlace de las IgGs al HER3 de murino y de cynomolgus también se probaron mediante ELISA. Los resultados mostraron enlace mejorado de los mutantes de
10 combinación a estas especies HER3 parálogas.

La alineación de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y pesada para cada una de las mutaciones individuales identificadas se muestra en la **FIGURA 2A** y **FIGURA 2B**, respectivamente. La **TABLA 4** proporciona las SEQ ID NOs para cada clon. Una alineación de las regiones variables de cadena ligera
15 para cada uno de los clones de combinación se proporciona en la **FIGURA 2C**.

TABLA 4

SEQ ID	DESCRIPCIÓN	SEQ ID	DESCRIPCIÓN
17	Clon 16 V _L aa	21	Clon 4H6 V _L CDR2 aa
1	Clon 16-línea germinal V _L aa	22	Clon 4H6 V _L CDR2 aa
2	Clon 16 V _H aa	7	Clon 6E.3 V _L aa
18	Clon 16 V _L CDR1 aa	19	Clon 6E.3 V _L CDR1 aa
21	Clon 16 V _L CDR2 aa	21	Clon 6E.3 V _L CDR2 aa
22	Clon 16 V _L CDR3 aa	22	Clon 6E.3 V _L CDR3 aa
31	Clon 16 V _H CDR1 aa	9	Clon 2D1 V _L aa
32	Clon 16 V _H CDR2 aa	19	Clon 2D1 V _L CDR1 aa
35	Clon 16 V _H CDR3 aa	21	Clon 2D1 V _L CDR2 aa
8	Clon 2B11 V _L aa	28	Clon 2D1 V _L CDR3 aa
18	Clon 2B11 V _L CDR1 aa	10	Clon 3A6 V _L aa
21	Clon 2B11 V _L CDR2 aa	18	Clon 3A6 V _L CDR1 aa

25	Clon 2B11 V _L CDR3 aa	21	Clon 3A6 V _L CDR2 aa
14	Clon 1A4 V _L aa	29	Clon 3A6 V _L CDR3 aa
18	Clon 1A4 V _L CDR1 aa	11	Clon 4C4 V _L aa
21	Clon 1A4 V _L CDR2 aa	18	Clon 4C4 V _L CDR1 aa
22	Clon 1A4 V _L CDR3 aa	21	Clon 4C4 V _L CDR2 aa
3	Clon 2C2 V _L aa	30	Clon 4C4 V _L CDR3 aa
19	Clon 2C2 V _L CDR1 aa	12	Clon 15D12. V _H aa
21	Clon 2C2 V _L CDR2 aa	31	Clon 15D12.1 V _H CDR1 aa
23	Clon 2C2 V _L CDR3 aa	33	Clon 15D12.1 V _H CDR2 aa
16	Clon 2F10 V _L aa	35	Clon 15D12.1 V _H CDR3 aa
18	Clon 2F10 V _L CDR1 aa	13	Clon 15D12.2 V _H aa
21	Clon 2F10 V _L CDR2 aa	31	Clon 15D12.2 V _H CDR1 aa
24	Clon 2F10 V _L CDR3 aa	34	Clon 15D12.2 V _H CDR2 aa
15	Clon 3E.1 V _L aa	35	Clon 15D12.2 V _H CDR3 aa
20	Clon 3E.1 V _L CDR1 aa	36	V _H FW1 aa
21	Clon 3E.1 V _L CDR2 aa	37	V _H FW2 aa
23	Clon 3E.1 V _L CDR3 aa	38	V _H FW3 aa
4	Clon 5H6 V _L aa	39	V _H FW4 aa
18	Clon 5H6 V _L CDR1 aa	40	V _L FW1 línea germinal aa
21	Clon 5H6 V _L CDR2 aa	41	V _L FW2 aa
26	Clon 5H6 V _L CDR3 aa	42	V _L FW3 aa
5	Clon 8A3 V _L aa	43	V _L FW4 aa
18	Clon 8A3 V _L CDRL aa	44	V _L FW1 original aa
21	Clon 8A3 V _L CDR2 aa	45	región constante IgG1*
27	Clon 8A3 V _L CDR3 aa	46	región constante de IgG1* - YTE
6	Clon 4H6 V _L aa	47	Clon 16 V _L nt
20	Clon 4H6 V _L CDRL aa	48	Clon 16 V _H nt
		*se proporcionan las diferencias de alotipo	
V _L aa consenso:			

	[FW₁]X₁GSX₂SNIGLNYVS[FW₂]RNNQRPS[FW₃]AAWDDX₃X₄X₅GEX₆[FW₄] en donde [FW₁], [FW₂], [FW₃] y [FW₄] representan las regiones de estructura de VL, en donde (a) X₁ representa los residuos de aminoácido Arginina (R) o Serina (S), 5 (b) X₂ representa los residuos de aminoácido Serina (S) o Leucina (L), (c) X₃ representa los residuos de aminoácido Serina (S) o Glicina (G), (d) X₄ representa los residuos de aminoácido Leucina (L) o Prolina (P), (e) X₅ representa los residuos aminoácido Arginina (R), Isoleucina (I), Prolina (P) o Serina (S), y 10 (f) X₆ representa los residuos de aminoácido Valina (V) o Alanina (A).
	V_H aa consenso: [FW₅]YYMQ[FW₆]X₇IGSSGGVTNYADSVKG[FW₇]VGLGDAFDI[FW₈] en donde [FW₅], [FW₆], [FW₇] y [FW₈] representan las regiones de estructura V_H,

en donde X₇ representa los residuos de aminoácido Tirosina (Y), Isoleucina (I) o Valina (V)

15

1.12. Estudios de Enlace de Anticuerpo Monoclonal Anti-HER3

La velocidad cinética (K_{on}, k_{off}) y las constantes de disociación de equilibrio (K_D) para el enlace de las IgGs anti-HER3 al dominio extracelular de la proteína HER3 humana se determinaron utilizando la tecnología de resonancia de plasmón de superficie BIAcore™ al medir el enlace del dominio extracelular HER3 humano (hu HER3(ECD)) a la IgG capturada en una superficie del chip sensor. Las constantes de velocidad de asociación (K_{on}) y disociación (K_{off}) individuales luego se calcularon de las curvas de enlace resultantes utilizando el software BIAevaluation disponible a través del vendedor. Los datos se ajustaron a un modelo de enlace 1:1, que incluyó un término para corregir el enlace limitado de transporte de masa, si es detectado. A partir de estas constantes de velocidad, la constante de enlace de disociación aparente (K_D) para la interacción de IgG con la proteína de dominio extracelular HER3 humana luego se calcula del cociente de K_{off}/K_{on}.

A partir de gráficas BIAcore de alta resolución, las constantes de velocidad de asociación y disociación para el IgG parental de enlace, Clon 16, al dominio extracelular HER3 humano fueron 5.29 x 10⁵/Ms y 73.0 x 10⁻⁴/S, respectivamente,

30

produciendo una K_D aparente de 14 nM. En comparación, las constantes de velocidad de asociación para el enlace de las variantes IgG mejoradas en afinidad al dominio extracelular HER3 humano fueron similares a aquellas medidas para el IgG parental, que varía de 3.41×10^5 a 4.32×10^5 /Ms. Estas mismas gráficas también se utilizaron para determinar las constantes de velocidad de disociación correspondientes para la variante del Clon 16, que variaron de 1.60×10^{-4} a 6.21×10^{-4} /s. Las K_D s aparentes para las variantes del Clon 16 se calcularon como es descrito en lo anterior y variaron de 0.429 nM (variante de clon 2C2) a 1.44 nM (variante de clon P2B11). Los errores individuales para K_{on} y K_{off} fueron bajos ($\leq \sim 2\%$ del parámetro calculado) y los ajustes totales a los datos cinéticos indicaron que el uso del modelo de interacción 1:1 fue apropiado. También, la evaluación no indicó el enlace que fue limitado en el transporte de masa.

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

El anticuerpo monoclonal 2C2, que comprende la VL de 2C2 (SEQ ID NO: 3) y la VH de C16 original (SEQ ID NO: 2) fue la guía mucho más mejorada en afinidad con una K_D de 0.4nM, que representa un mejoramiento de 32 veces del anticuerpo monoclonal del Clon 16 parental. El mejoramiento de K_D fue principalmente un resultado de la disminución fuera de velocidad. El nivel de expresión y los rendimientos de producción también se estimaron. Todos los clones de anticuerpo monoclonal fueron bien expresados en un estudio de transfección transiente de 5 días, con el anticuerpo monoclonal 2C2 que muestra el nivel más alto de expresión en este estudio. Todas las guías optimizadas en afinidad mostraron diferentes grados de mejoramiento de afinidad pero el anticuerpo 1A4 descendió debido a la menor eficacia de expresión.

25

TABLA 5: Resumen de propiedades biofísicas de las diversas guías optimizadas en afinidad en comparación con el anticuerpo CL16 parental (Clon 16).

Nombr e del clon	pl calculada	Kon (1/Ms) (xE+5)	Koff (1/s) (xE-4)	Biacor e KD (nM, IgG abajo)	Biacore KD (nM, Her3 abajo)	Nivel de Expresión en el Día 5 (transiente)	Rendimien to (mg/volum en e, ml)
P2B11	8.21	4.32	6.21	1.53	0.74	159 µg/ml	70/500

				(9x)	(2.4x)		
1A4	8.2	3.41	2.86	0.838 (17x)	0.493 (3.6x)	60 µg/ml	53/1200
2C2	8.2	3.73	1.60	0.434 (32x)	0.093 (19x)	148 µg/ml	71/600
2F10	8.2	3.54	2.90	0.818 (17x)	0.326 (5x)	130 µg/ml	66/600
3E 1	8.32	3.43	1.78	0.52 (26x)	0.286 (6.2x)	125 µg/ml	59/600
Clon 16	7.83	5.29	73.0	14	1.77	ND	ND

Nota: Cada guía optimizada en afinidad comprende la cadena VL del nombre del clon y la VH de C16 original

Se realizaron varios ensayos a base de células para estimar el mejoramiento funcional de las diversas guías optimizadas en afinidad sobre el clon 16 a través del modelo independiente de ligando (línea de células de cáncer de mama humana BT-474, ATCC No. HTB-20TM), así como dependiente de ligando (líneas de células de cáncer de mama humana T-47D, ATCC No. HTB-133) (ambas líneas de células obtenidas de ATCC) que incluyen la inhibición de la ruta de señalización HER3 (pHER3 y pAKT), la supresión del crecimiento celular (ensayo de crecimiento de 6 días a corto plazo y ensayo clonogénico a largo plazo), y anulación de pHER3 inducido por HRG en células T-47D (substrato epitelial diferenciado T-47).

Los ensayos clonogénicos se realizaron como sigue. Células BT-474 se colocaron en placa en una densidad de 1000 células/cavidad en placas de 6 cavidades. Después de la unión durante la noche, las células se trataron con el IgG de control de isotipo o los anticuerpos monoclonales HER3 indicados siguiendo una curva de concentración-dosis. El medio con las dosis apropiadas de anticuerpos monoclonales se renovó una vez a la semana durante tres semanas. Al final del día 21, las células se procesaron para el ensayo Cell-titer-Glo (CTG) para estimar la inhibición de la formación de colonia mediante los diversos anticuerpos monoclonales (utilizando el IgG de control como línea de base). Los valores de IC₅₀ se derivaron del análisis Prism.

El ensayo de crecimiento de 6 días de BT-474 se realizó esencialmente como se utilizó para la **FIGURA 4** (ver la Sección 2.2 en el Ejemplo 2, después). El ensayo BT-474 pAKT se realizó esencialmente como se utilizó para la **FIGURA 10** (ver la Sección 2.6.1 en el Ejemplo 2, después). El ensayo pHER3 inducible con T-47D HRG se realizó esencialmente como se utilizó para la **FIGURA 3** (ver la Sección 2.1 en el Ejemplo

2, después) y el enlace de T-47D FACS y el ensayo de internalización se realizó utilizando el mismo protocolo utilizado para la **FIGURA 16A** (ver la Sección 3.3.1 en el Ejemplo 3, infra.

Los valores de IC₅₀ y los niveles de inhibición máximos se compilaron para propósitos de comparación. Como se muestra en la **TABLA 6**, las guías mejoradas en afinidad exhibieron una potencia incrementada de 2-3 veces consistente a través de la mayoría de los ensayos. El Clon 16 parental y/o un clon optimizado representativo, por ejemplo, el anticuerpo de Clon 2C2 (también referido simplemente como 2C2, o anticuerpo monoclonal 2C2) además se caracterizaron en un número de ensayos *in vitro* e *in vivo* como es descrito enseguida.

Además, las mutaciones se introdujeron en la región Fc del clon optimizado 2C2 para prolongar la vida media. Específicamente, M252Y, S254T, T256E, numeradas de acuerdo el índice de EU como en Kabat. Esta molécula optimizada en vida media es referida como 2C2-YTE. Será entendido que otras mutaciones podrían ser introducidas en lugar de, o en combinación con estas tres, ver, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 7,083,784; la Publicación de Solicitud Internacional No. WO2009058492; Dall'Acqua y colaboradores, 2002, J. Immunol. 169:5171-80; Zalevsky y colaboradores, 2010, Nature Biotech. 28:157-9). 2C2-YTE se mostró que inhibe la proliferación de células BT-474 y el crecimiento de colonia al mismo grado como 2C2 (datos no mostrados).

Una composición estable en refrigerador (2-8°C) se obtuvo al formular los anticuerpos (por ejemplo, 50 mg/ml) en histidina 25 mM/histina HCL, sacarosa 205 mM, polisorbato 80 al 0.02% en pH 6.0.

TABLA 6: Resumen de las propiedades biológicas de las guías optimizadas en afinidad en comparación con el anticuerpo monoclonal CL16 parental.

Nom bre del clon	ensayo clonogénico BT474		crecimiento de 6 días BT474		ensayo pAKT de BT474		pHer3 inducible con T47D HRG		enlace de T47D FACS	
	IC ₅₀ (pM)	% Max de inhibi- ción	Punto de inflexió n (pM)	% Max de inhibi- ción	Punto de inflexión (pM)	% Max de inhibi- ción	IC ₅₀ (pM)	% Max de inhibi- ción	Kd (pM)	Max GMF I

P2B1 1	26.9	87.1	98	47.5	23.6	62	79.8	85	199	1441
1A4	30.7	81.3	133.3	54.5	28.5	62	133	84	281	1577
2C2	31.9	87.2	62.7	48.3	42.6	61	130. 3	85	316	1583
2F10	31.2	80.4	66.7	49	46.4	62	127. 2	86	306	1527
3E 1	20.8	79.2	85.3	48.1	26.2	66	59.2	86	447	1644
Clon 16-PA	64.5	79.8	280	46	73.1	64	104. 4	75	112	1055

Ejemplo 2. Caracterización de los Anticuerpos Monoclonales Anti-HER3

5

2.1. Ensayo de Fosforilación de HER3 (pHER3) Inducido por HRG en Células MCF-7

MCF-7 (ATCC No. HTB-22TM) es una línea de células de cáncer de mama humano con la expresión HER3 pero sin la expresión HRG endógena. Las células MCF-7 se colocaron en placa a una densidad de 30,000 células/cavidad en una placa de 96 cavidades y se dejaron adherir durante la noche. Las células luego se privaron de suero durante 24 horas antes del tratamiento. Después de la privación de suero, el medio se removió y se reemplazó con medio libre de suero que contiene los anticuerpos de prueba y de control, y las células se incubaron a 37°C durante 1 hora. Los anticuerpos de prueba utilizados en este ejemplo, y en los ejemplos adicionales proporcionados enseguida, incluyen los anticuerpos anti-HER3 proporcionados en la presente tales como, Clon 16, 2C2, 2C2-YTE; y los anticuerpos anti-HER3 conocidos en la técnica, en particular, U1-59 (Publicación de Patente Internacional WO 2007077028) y Ab#6 (Publicación de Patente WO 2008/100624) designados en la presente como AMG y MM, respectivamente. Mientras tanto, el extracto de heregulina (HRGβ1, R&D Systems, Minneapolis, MN) se preparó en 4x (80 ng/ml) en el medio de crecimiento libre de suero. Al final del período de

incubación de 1 hora, HRGβ1 se colocó en cavidades (20 ng/ml de concentración final) y se incubó a 37°C durante 20 minutos. Al final del tratamiento, el medio se removió y las células se lavaron con PBS. Las células se lisaron en solución amortiguadora de lisis Tritón X de 80μl (Boston Bioproducts, Ashland, MA) con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Calbiochem, La Jolla, CA) y se almacenaron a -20°C hasta el análisis. La ELISA de pHER3 luego se realizó siguiendo el protocolo del fabricante (R&D Systems, DYC1769) utilizando placas ELISA Corning® Costar® 3690 de 96 cavidades a la mitad del volumen (Corning Life Science, Lowell, MA) y 50μl del lisado de células por cavidad.

La activación de HER3, reflejada por la fosforilación de HER3 (abreviado como pHER3), se estimuló mediante el tratamiento de células con HRGβ1. El pre-tratamiento con mAb 2C2 anti-HER3 causó una supresión dependiente de dosis de la señal pHER3 en el ensayo de ELISA de pHER3 (**FIGURA 3**, parte superior). Los anticuerpos monoclonales anti-HER3 publicados MM y AMG también fueron activos en este ensayo, sin embargo, 2C2 fue aproximadamente 5 veces más potente como es determinado mediante las mediciones de IC₅₀ (**FIGURA 3**, fondo). Resultados similares se observaron para 2C2-YTE (datos no mostrados).

2.2. Cosupresión de crecimiento de las células de cáncer de mama MDA-MB-175

MDA-MB-175 (ATCC No. HTB-25™) es una línea de células de cáncer de mama (γ-isoforma) que expresa HRG-establecida que depende de la ruta de señalización HRG-HER3 para el crecimiento y la supervivencia. Las células se colocaron a una densidad de 2000 células/cavidad en una placa de pared blanca de 96 cavidades y se dejaron unir durante la noche. Al siguiente día, el medio se removió y se reemplazó con 100μl/cavidad de medio de crecimiento completo fresco que contiene los anticuerpos de prueba y de control. Las placas luego se incubaron durante un total de 6 días. Para calcular el número de células relativo, CellTiter-Glo™ (Promega, Madison, WI) se utilizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de la adición de CellTiter-Glo™, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y la luminiscencia se midió utilizando un lector de microplaca.

El ensayo de crecimiento se llevó a cabo con los anticuerpos monoclonales anti-HER3 2C2, MM o AMG. Como se muestra en la **FIGURA 4**, todos los tres anticuerpos lograron efecto anti-proliferación a varios grados, con 2C2 que muestra la potencia más alta ($IC_{50}=0.14 \mu\text{g/ml}$) (**FIGURA 4**, parte superior) y la supresión de crecimiento más alta (72%) (**FIGURA 4**, fondo).

2.3. Supresión del Crecimiento de las Células de Melanoma HMCB

HMCB (ATCC No. CRL-9607TM) es un modelo de melanoma (isoforma 1 β) que expresa HRG establecido inducido por la heterodimerización de HER2-HER3 inducida por HRG. Las células HMCB se colocaron a una densidad de 750 por cavidad en 100 μl del medio completo que contiene FBS inactivado con calor al 10% en placas de 96 cavidades (Costar®). Al siguiente día, los tratamientos de anticuerpos se prepararon en el medio completo. La concentración de partida para todos los anticuerpos monoclonales anti-HER3 y el IgG de control fue de 10 $\mu\text{g/ml}$, y las diluciones en serie se prepararon en el medio completo. El medio colocado en placas se removió y los tratamientos se adicionaron en 100 μl por cavidad por triplicado.

Las placas luego se incubaron en CO_2 al 5% a 37°C durante 6 días. Volúmenes iguales del reactivo CellTiter-GloTM se adicionaron a cada cavidad. Las placas se oscilaron en un agitador de placa durante 10 minutos a temperatura ambiente para asegurar la lisis celular completa. La luminiscencia se midió utilizando un Lector de Multietiqueta 2104 EnVision® (PerkinElmer, Waltham, MA).

Como se muestra en la **FIGURA 5**, 2C2 fue nuevamente más potente que los anticuerpos existentes. 2C2 fue 8-30 veces más potente que los anticuerpos monoclonales anti-HER3 publicados AMG y MM en inhibir el crecimiento celular de la línea de células de melanoma HMCB.

2.4. Ensayos de Actividad de HER3 y AKT en Células de Melanoma HMCB y Células A549 NSCLC

La habilidad de las guías de HER3 para suprimir la ruta de señalización HER3 en el modelo HMCB HRG-autocrino (ATCC No. CRL-9607TM) y A549 (ATCC No. CCL-185) fueron estimadas. Las células HMCB se colocaron en 10^5 por cavidad en placas de 24 cavidades y en medio que contiene FBS inactivado con calor al 10% y se dejaron

alcanzar una confluencia de 80% o más antes del tratamiento con el anticuerpo. El medio colocado en placa se removió y las células se sometieron a incubación con los anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales anti-HER3 y un IgG de control se prepararon en el medio completo. La concentración de partida para todos los anticuerpos anti-HER3 fue 10µg/ml y se realizaron diluciones en serie. La IgG de control solamente se utilizó en una concentración de 10 µg/ml. Los tratamientos se aplicaron después de la remoción del medio colocado en placa. Después de una incubación de 6 horas (células HMCB) o 72 horas (células A549) en CO₂ al 5% a 37°C, las células se lavaron una vez con PBS enfriado con hielo y luego se lisaron al adicionar solución amortiguadora de Reducción Laemmli (Boston BioProducts, Ashland, MA).

Después de una breve incubación, los lisados de células se recolectaron, se cargaron cantidades iguales sobre geles Bis-Tris Bis NuPAGE® Novex® (Invitrogen, Carlsbad, CA) y las proteínas se transfirieron a las membranas PVDF (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las membranas se bloquearon con leche seca sin grasa al 5% y Tween 20 al 0.1% (Sigma, St. Louis, MO) en TBS (pH 7.4) y se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos a HER3 (anticuerpo sc-285, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), pHER3 (anticuerpo 4791, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), AKT (anticuerpo 9272, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), pAKT (anticuerpo 4060, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), neuregulina-1/HRG anticuerpo (NRG1/HRG) (sc-348, Santa Cruz) y GAPDH (anticuerpo G8795, Sigma, St. Louis, MO).

Las membranas se lavaron en Tween 20 al 0.1% en TBS y luego se incubaron durante 1 hora en anticuerpos secundarios de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare). Después del lavado, las bandas de proteína se detectaron en la película de rayos X al utilizar el Substrato Quimioluminiscente West Femto SuperSignal® y el Substrato Quimioluminiscente West Pico SuperSignal® (Pierce/Thermo Scientific, Rockford, IL).

Como se muestra en las **FIGS. 6 y 7**, el anticuerpo 2C2 anuló la ruta de señalización de HER3 en ambas de las células HMCB y A549. 2C2 suprimió eficientemente pHER3 y su molécula efectora corriente abajo pAKT en una manera dependiente de dosis y fue más potente que cualquiera de los anticuerpos monoclonales anti-HER3 publicados AMG o el MM en células HMCB. El anticuerpo 2C2 también

suprimió pHER3 y su molécula efectora corriente abajo pAKT y las células A549.

2.5. Ensayo para Fosforilación de HER3 (pHER3) en Modelos de Células para Cáncer de Pulmón, Gástrico y de Mama

5 2.5.1. Ensayo de Células pHER3

Las células (células HCC827 NSCLC, células HCC827 NSCLC resistentes a Gefitinib, células de cáncer gástrico MKN45, células de cáncer gástrico Kato III o células de cáncer de mama amplificadas o HER2 BT-474) se colocaron a una densidad de 30,000 células/cavidad de una placa de 96 cavidades y dejaron unir durante la noche. Las células
 10 luego se trataron con anticuerpos de prueba o de control en curva de la dosis indicada a 37°C durante 4 horas. Al final del tratamiento, el medio se removió y las células se lavaron con PBS. Las células se lisaron en solución amortiguadora de lisis Tritón X de 80µl (Boston BioProducts, Ashland, MA) con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Calbiochem, La Jolla, CA) y se almacenaron a -20°C hasta el análisis. La ELISA de pHER3 luego se
 15 realizó siguiendo el protocolo del fabricante (R&D Systems, DY1769, Minneapolis, MN) utilizando placas de ELISA de 96 cavidades de medio volumen (Costar 3690) y 50µl del lisado de células por cavidad.

2.5.2. Supresión de la Actividad de pHER3 en Células HCC827

20 Células HCC827 (ATCC CRL-2868TM), un modelo de cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC) inducido por EGFR mutante, se trataron con anticuerpos de prueba o de control como es descrito en lo anterior en la sección de Ejemplo 2.5.1 (ver lo anterior). Como se muestra en la **FIGURA 8A**, el anticuerpo 2C2 fue capaz de inhibir parcialmente la señal de pHER3, mientras que los anticuerpos monoclonales anti-HER3
 25 publicados AMG y MM fueron menos efectivos y 10 veces menos potentes que 2C2.

2.5.3. Supresión de la Actividad pHER3 en Células HCC827 Resistentes a Gefitinib

HCC827 alberga y es inducido por EGFR-mutante, que la hace altamente sensible a los inhibidores de tirosina quinasa de EGFR (TKIs) tal como gefitinib. Las
 30 células HCC827 parentales se expusieron a una dosis tóxica constante de gefitinib y los clones resistentes se aislaron de modo que se mostraron que albergan cMET amplificado,

un mecanismo conocido para cánceres para escapar de la terapia de TKI. Las células HCC827 resistentes a TKI se trataron con los anticuerpos monoclonales anti-HER3 como es descrito en lo anterior en la sección de Ejemplos 2.5.1 (ver en lo anterior). Como se muestra en la **FIGURA 8B**, el anticuerpo monoclonal 2C2 anti-HER3 suprimió la actividad de HER3 en el HCC827 mutante hecho resistente a gefitinib. Similar a los resultados observados para la línea de células parental, 2C2 exhibió potencia más alta que los anticuerpos AMG y MM (aproximadamente 10 veces mejor potencia) en la línea de células HCC827 resistente a TKI.

2.5.4. Supresión de la Actividad de pHER3 en las células MKN45

Aunque cMET no es un miembro de la familia Her, se ha mostrado que es capaz de formar dímeros con HER3. La línea de células del modelo de cáncer gástrico amplificado MKN45 cMET se utilizó para estimar si los anticuerpos anti-HER3 podrían antagonizar la activación de HER3 inducida por cMET. Las células MKN45 se trataron con los anticuerpos monoclonales anti-HER3 como es descrito en lo anterior en la sección de Ejemplos 2.5.1. Como se muestra en la **FIGURA 8C**, todos los tres anticuerpos monoclonales anti-HER3 (2C2, AMG y MM) fueron capaces de suprimir pHER3 en las células MKN45, pero 2C2 exhibió potencia más alta que los anticuerpos AMG y MM (aproximadamente 5-7 veces mejor potencia).

2.5.5. Supresión de la Actividad de pHER3 en Células Kato III

Además del acoplamiento con EGFR, HER2 y cMET, el HER3 se dimeriza con FGFR2 para facilitar su potencial de transformación. La línea de células Kato III (ATCC No. HTB-103TM) un modelo de cáncer gástrico amplificado con FGFR2, se estimó para estimar si los anticuerpos anti-HER3 podrían suprimir la activación de HER3 inducida por FGFR2. Las células Kato III se trataron con los anticuerpos monoclonales anti-HER3 como es descrito en lo anterior en la sección de Ejemplos 2.5.1 (ver en lo anterior). En este modelo, todos los tres anticuerpos monoclonales anti-HER3 (2C2, AMG y MM) lograron grados máximos similares de supresión de pHER3 (~60%), pero como es medido mediante IC₅₀, 2C2 fue 15-20 veces más potente que los anticuerpos AMG y MM, respectivamente (**FIGURA 8D**).

2.5.6. Supresión de la Actividad de pHER3 en Células de BT-474

Los dímeros HER2-HER3 se han mostrado que es una de las entidades oncogénicas más transformantes en el cáncer. Por consiguiente, los inventores
5 investigaron los anticuerpos monoclonales anti-HER3 en la línea de células BT-474 (ATCC NO. HTB-20TM), un modelo de cáncer de mama amplificado con HER2 bien establecido que no expresa ligando y se espera que sea inducido por la dimerización de HER2-HER3 independiente de ligando. Las células BT-474 se trataron con los tres anticuerpos monoclonales anti-HER3 y también 2C2-YTE, como es descrito en lo anterior
10 en la sección de Ejemplos 2.5.1. distintos a los modelos donde todos los tres anticuerpos monoclonales anti-HER3 probados fueron activos, tales como las células HCC827, las células HCC827 resistentes a Gefitinib, células MKN45 y células Kato III, 2C2 (ambos 2C2 parental y el mutante 2C2-YTE) fue el único de entre los anticuerpos monoclonales anti-HER3 probados que muestran supresión de actividad sustancial de pHER3 (**FIGURA 8E**).
15 Estos resultados indicaron que 2C2 (tanto la forma 2C2 parental como el mutante 2C2-YTE) fue funcional en un modelo independiente de ligando y demostró la bifuncionalidad de 2C2 en arreglos tanto dependientes de ligando como independientes de ligando.

2.6. Ensayo para la Fosforilación de AKT (pAKT) en Modelos de Células para Cáncer Gástrico y de Mama

2.6.1. Ensayo de Células pAKT

Las células (células de cáncer gástrico MKN45, células de cáncer gástrico Kato III o células de cáncer de mama amplificadas con BT-474 HER2) se colocaron en una densidad de 30,000 células/cavidad en placas de 96 cavidades y se dejaron unir
25 durante la noche. Las células luego se trataron con anticuerpos de prueba o de control en la curva de dosis indicada a 37°C durante 4 horas. Al final del tratamiento, el medio se removió y las células se lavaron con PBS. Las células se lisaron en 80µl de solución amortiguadora de lisis Triton X (Boston BioProducts, Ashland, MA) con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Calbiochem, La Jolla, CA) y se almacenaron a -20°C hasta el
30 análisis. AKT/pAKT se analizaron en base al protocolo del fabricante incluido en el Equipo de Lisado de Célula Completa Phospho (Ser473)/Total AKT (No. de Cat. K15100D, Meso-

Scale Discovery, Gaithersburg, MD) para determinar el contenido de pAKT.

2.6.2. Supresión de la Actividad de pAKT en las Células MKN45

Para averiguar si 2C2 podría suprimir la ruta de señalización corriente abajo de HER3 además de pHER3, los inventores adicionalmente estimaron su habilidad para suprimir la fosforilación de AKT en el modelo de cáncer gástrico inducido con cMET amplificado MKN45. Las células MKN45 se trataron con anticuerpos monoclonales anti-HER3 como es descrito en el anterior en la sección de Ejemplos 2.6.1. En este sistema de modelo, el anticuerpo monoclonal 2C2 logró inhibición de pAKT parcial con potencia más alta (aproximadamente 5-7 veces más alta) que el AMG que los anticuerpos monoclonales anti-HER3 AMG y MM (**FIGURA 9A**). Esto demostró que 2C2 no solamente inhibe la actividad de HER3 sino también suprime las moléculas efectoras corriente abajo de HER3 tal como pAKT.

2.6.3. Supresión de la Actividad de pAKT en Células Kato III

Para investigar si esta actividad se tradujo en una mejor potencia que suprime pAKT, el efector de HER3, los inventores analizaron la inhibición de pAKT mediante varios anticuerpos monoclonales anti-HER3 utilizando en esta línea de células un ensayo de descubrimiento de Meso-Escala como es descrito en lo anterior en la sección de Ejemplos 2.6.1. Como se muestra en la **FIGURA 9B**, consistente con los datos de pHER3, 2C2 suprimió pAKT en las células Kato III de modelo de cáncer gástrico inducido por FGFR2 amplificado. 2C2 nuevamente logró más alta potencia (como es medido por IC₅₀) y respuesta máxima en la inhibición de pAKT que los anticuerpos AMG y MM.

2.6.4. Supresión de la Actividad de pAKT en Células BT-474

Los dímeros HER2-HER3 se han mostrado que son una de las entidades oncogénicas más transformantes en el cáncer. Por consiguiente, los inventores investigaron la actividad de anticuerpos monoclonales anti-HER3 en la línea de células BT-474. Las células BT-474 se trataron con los anticuerpos monoclonales anti-HER3 como es descrito en lo anterior en la sección de Ejemplos 2.6.1, anteriormente, y también con la forma mutante de YTE de 2C2. Distinto a los modelos donde todos los tres

anticuerpos monoclonales anti-HER3 probados (2C2, AMG y MM) fueron activos, tal como las células MKN45 y KatolIII, 2C2 (tanto la forma 2C2 parental como el mutante 2C2-YTE) fue el único entre los anticuerpos monoclonales anti-HER3 probados que mostraron actividad sustancial que suprime pAKT (**FIGURA 9C**). Estos resultados indicaron que 2C2 (tanto la forma 2C2 parental como el mutante 2C2-YTE) fue funcional en el modelo independiente de ligando y demostró la bifuncionalidad de 2C2 (tanto en la forma 2C2 parental como el mutante 2C2-YTE) en arreglos tanto dependientes de ligando como independientes de ligando.

2.7. Supresión de la Señalización de HER3 y Proliferación Celular en Células MDA-MB-361

Para caracterizar la actividad de 2C2-YTE en células de cáncer de mama amplificado con HER2 que no son altamente responsivas a trastuzumab, los inventores se enfocaron en MDA-MB-361 (ATCC No.HTB-27), un modelo de cáncer de mama que alberga la mutación de activación en PIK3CA (E545K), que puede contribuir a su resistencia a trastuzumab debido a la activación intrínseca de la ruta de PI3K (Junttila y colaboradores, 2009, Cancer Cell. 15:429-40). Los inventores determinaron los efectos de 2C2 en la señalización de HER3 y la proliferación celular en este modelo.

Para estimar la señalización la línea de células de mama humana MDA-MB-361 se colocó en placas de 24 cavidades a una densidad de 150,000 células por cavidad en RPMI (Invitrogen) suplementado con suero de bovino fetal inactivado con calor al 10% (FBS) (Invitrogen). Al siguiente día, el medio colocado en placa se removió y las células se sometieron a la incubación con el anticuerpo anti-HER3 2C2 o un anticuerpo de control, en el medio completo a una concentración final de 30 µg/mL. Después de una incubación de 6 horas en CO₂ al 5% a 37°C, las células se lavaron una vez con PBS enfriado en hielo y luego se lisaron al adicionar la solución amortiguadora de Reducción Laemmli (Boston BioProducts, Ashland, MA). Después de una breve incubación, los lisados de células se recolectaron, cantidades iguales se cargaron en geles Bis Tris Bis NuPAGE® Novex® (Invitrogen, Carlsbad, CA) y las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las membranas se bloquearon con leche seca sin grasa al 5% y Tween 20 al 0.1% (Sigma, St. Louis, MO) en TBS (pH 7.4) y

se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos a HER3 (anticuerpo sc-285, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) y pHER3 (anticuerpo 4791, Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Las membranas se lavaron en Tween 20 al 0.1% en TBS y luego se incubaron durante 1 hora en anticuerpos secundarios de estreptavidina
 5 conjugada con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare). Después del lavado, las bandas de proteínas se detectaron en película de rayos X al utilizar el Substrato Quimioluminiscente SuperSignal® West Femto y el Substrato Quimioluminiscente SuperSignal®^R West Pico (Pierce/Thermo Scientific, Rockford, IL).

Para ingresar a la proliferación celular las células MDA-MB-361 se
 10 sembraron a una densidad de 2,000 células en 100 µL del medio que contiene FBS inactivado con calor al 10%; se utilizaron placas de 96 cavidades tratadas de cultivo de tejido de poliestireno blanco Costar con fondos planos (Corning). Al siguiente día, el medio colocado en placa se removió y los anticuerpos se adicionaron en el medio completo a un volumen final de 100 µL por cavidad. Las placas luego se incubaron en
 15 CO₂ al 5% a 37°C durante 6 o 14 días. Para el ensayo de 14 días, los anticuerpos frescos se aplicaron el Día 7. Volúmenes iguales del reactivo CellTiter-GloR (Promega) se adicionaron a cada cavidad al final de cada punto de tiempo. Las placas se oscilaron en un agitador de placa durante 10 minutos a temperatura ambiente para asegurar la lisis celular completa. La luminiscencia se midió utilizando un Lector de Multietiqueta EnVision
 20 2104 (PerkinElmer).

2C2 redujo los niveles de pHER3 (**FIGURA 10A**) y suprimió el crecimiento de células (**FIGURA 10B**) de esta línea celular, sugiriendo que 2C2-YTE no solamente es activo en cánceres sensibles a trastuzumab con amplificación de HER2, sino también activos en cánceres amplificados con HER2 que son menos sensitivos a trastuzumab
 25 debido a mutaciones en PIK3CA.

2.8. Identificación de Tipos de Cáncer dependientes de HRG Novedoso

Para identificar los tiempos de cáncer dependientes de HRG novedoso adicionales, múltiples líneas de células de carcinoma de célula escamosa de pulmón (SCC) se clasificaron para la actividad de señalización de HER3 y la expresión de HRG.
 30 Las líneas de células HARA-B (JCRB No. JCRB1080.1) y KNS-62 (JCRB No. IFO50358) expresaron niveles significativos de HER3, HRG así como pHER3 (datos no mostrados).

Por consiguiente, los inventores investigaron la actividad de 2C2 en las líneas de células HARA-B KNS-62. Las células se trataron con los anticuerpos monoclonales anti-HER3 esencialmente como es descrito en lo anterior en la sección de Ejemplos 2.4 anterior, 2C2 fue capaz de reducir los niveles de pHER3 en la línea de célula HARA-B (**FIGURA 11**) y la

5 línea de células KNS-62 (datos no mostrados). Como se muestra enseguida (sección de Ejemplos 5.4), 2C2-YTE demostró eficacia antitumoral dependiente de dosis en el modelo de xenoinjerto HARA-B NSCLC escamoso humano. De esta manera, estos criterios (es decir, la expresión de HER3, HRG así como pHER3) pueden ser herramientas de clasificación útiles para identificar tipos de cáncer adicionales responsivos a los

10 anticuerpos anti-HER3, incluyendo por ejemplo 2C2, AMG, MM como es descrito en la presente y otros conocidos en la técnica (ver por ejemplo las Publicaciones de Patentes Internacionales WO2011/136911, WO2012/019024, WO2010/022814).

2.9. HER2 es un Inductor Mayor en Ciertos Tipos de Cáncer dependientes de HRG

15

En la presencia del ligando de HER3 heregulina (HRG), HER3 se heterodimeriza con EGFR o HER2, que conduce a la fosforilación de HER3 y la transmisión de una señal oncogénica por la vía de la fosfoinosítida 3 quinasa (PI3K) y proteína quinasa B (PKB), también conocida como AKT. Una colección de modelos CRC

20 se caracterizaron para determinar qué receptor tirosina quinasa, EGFR o HER2, es el mayor inductor de la señalización a través de HER3. Específicamente, seis líneas de células de tumor CRC diferentes, SW620 (ATCC No.CCL-227), SW480 (ATCC No.CCL-228), Colo205 (ATCC No.CCL-222), LOVO (ATCC No.CCL-229), HCT15 (ATCC No.CCL-225) y Caco-2 (ATCC No.HTB-37), se trataron con antagonistas de HER2 o EGFR solo o

25 en combinación con el antagonista HER3 2C2. Brevemente, las células se sembraron en placas de 24 cavidades a una densidad de 1.5×10^5 células por cavidad. Al siguiente día, 2 conjuntos idénticos de células se trataron con 10 µg/mL de los siguientes anticuerpos: anticuerpo anti-HER3 2C2, el anticuerpo de IgG de control R347, el anticuerpo anti-HER2 2C4 (por ejemplo, la Publicación de Patente WO2001/00245), el anticuerpo anti-EGFR

30 cetuximab o el inhibidor de tirosina quinasa EGFR gefitinib en 5 µM. Después de 5-6 horas de incubación a 37°C, HRG se adicionó en 50 ng/mL en un conjunto de células

durante 15 minutos a 37°C. Todas las células luego se lavaron con PBS frío y se lisaron mediante la adición de 60 µL de 2x SDS (dodecil sulfato de sodio) solución amortiguadora de muestra (Invitrogen). Los lisados se transfirieron a tubos de 1.5 mL y se sometieron a ebullición durante 5 minutos seguido por el enfriamiento en hielo durante 2 minutos.

5 Volúmenes iguales (20 µL) de muestras de proteína se resolvieron en geles Bis-Tris NuPAGE Novex (Invitrogen) antes de la transferencia a las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Invitrogen). Las membranas se lavaron en solución salina amortiguada con Tris (KPL) que contiene Tween 20 al 0.1% (Sigma) y se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos a HER3 (Santa Cruz Biotechnology), pHER3-
10 Tyr1289 (Cell Signaling, Technology), AKT fosforilada (proteína quinasa B (pAKT)) (Cell Signaling Technology), ERK fosforilada (proteína quinasa activada con mitógenos/quinasa regulada de señal extracelular (pERK)) (Cell Signaling Technology) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Sigma). Las membranas se lavaron en solución salina amortiguada con Tris (KPL) que contiene Tween 20 al 0.1% (Sigma) y luego se incubaron
15 durante 1 hora en anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare). Después del lavado, las bandas de proteínas se detectaron sobre la película de rayos X al utilizar el Substrato de Quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce/Thermo Scientific).

Como se observa en la **FIGURA 12**, ambos de los anticuerpos anti-HER3 y
20 anti-HER2 redujeron el nivel de HER3, pHER3 y pAKT en células estimuladas con ligando mientras que el antagonista EGFR tal como cetuximab y gefitinib no tuvieron efecto en estas moléculas de señalización. Estos datos demuestran que HER2 es el mayor inductor de la señalización de HER3 inducida por HRG en todos los modelos de cáncer probados.

25 **Ejemplo 3. Mecanismo de Estudios de Acción para Anticuerpos Monoclonales Anti-HER3**

3.1. Enlace de Ligando Parcialmente Bloqueado del Clon 16 a HER3

La eficacia de los anticuerpos monoclonales anti-HER3 para bloquear la actividad de HER3 inducida por ligando puede ser debido a su habilidad para bloquear
30 directamente el enlace de ligando. Para investigar este escenario, los inventores establecieron un ensayo de enlace de HRG-HER3 *in vitro* al recubrir una placa con

heregulina (HRG) y al enlazar la proteína HER3 recombinante marcada a éste.

3.1.1. Ensayo de Enlace de HRG-HER3

Las cavidades de microplacas se recubrieron con 10 ng/ml de heregulina (HRG β 1, No. de Cat. 377-HB, R&D Systems, Minneapolis, MN) durante la noche a 4°C. Al siguiente día, las placas se lavaron 4 veces con PBST (PBS + Tween 20 al 0.05%) y se bloquearon en PBS + 1 μ g/ml de BSA a temperatura ambiente durante 1 hora. Durante el bloqueo, las diluciones en serie de anticuerpos de prueba (Clon 16, AMG, MM y un anticuerpo monoclonal de bloqueo de ligando anti-HER3 de control positivo) se prepararon en una placa separada en PBSTB (PBS + Tween al 0.05% + BSA 0.1%) y se combinaron con 5 μ g/ml de HER3 recombinante (No. de Cat. 348-RB, R&D Systems, Minneapolis, MN) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las placas de ELISA luego se lavaron 4x con PBST antes de la adición de la mezcla de anticuerpo-HER3. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavaron subsecuentemente 4 veces con PBST. Anti-His HRP (No. de Cat. 34460, Qiagen, Valencia, CA) se adicionó a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron 4 veces con PBST seguido por la detección con TMB. Las placas se leyeron en 450 nm utilizando un lector de microplaca. Los resultados representativos se muestran en la **FIGURA 13**.

3.1.2. Resultados

Se probó la habilidad de varios anticuerpos monoclonales (Clon 16, AMG, MM y un anticuerpo monoclonal de bloqueo de ligando anti-HER3 de control positivo) para interferir con el enlace de HRG a HER3. El anticuerpo monoclonal de bloqueo de ligando HER3 de control positivo, de manera eficiente y completamente suprimió el enlace de HER3 a HRG. En contraste, el Clon 16 (la guía parental para 2C2, ver la sección de Ejemplos 1.6 de “Optimización de Afinidad” anterior) fue solo parcialmente efectiva en interrumpir este enlace (aproximadamente 30% de inhibición máxima). Los anticuerpos monoclonales AMG y MM mostraron un efecto bloqueante parcial, débil similar (**FIGURA 13**). Estos descubrimientos mostraron que el Clon 16 fue improbable de funcionar como un anticuerpo monoclonal de bloque de ligando directo.

3.2. 2C2 Interrumpe la Dimerización de HER2-HER3

Debido a su naturaleza deficiente de quinasa, el monómero HER3 no es activo y necesita formar heterodímeros con otros RTK para ser activo. El dímero HER2:HER3 se ha mostrado que es la especie de señalización más oncogénica y las instalaciones dependientes de ligando e independientes (Junttila y colaboradores, 2009, Cancer Cell 15:429-40). La interrupción de la dimerización de HER2-HER3 mediante 2C2 se estimó utilizando un ensayo de formación de dímero HER2-HER3 inducido por HRG en células T-47D, un modelo de cáncer de mama dependiente de ligando que muestra la formación del dímero HER3-HER2 inducido por HRG, y en célula BT-474 independiente de ligando. El ensayo se basó en la co-inmunoprecipitación de HER3-HER2.

3.2.1. Ensayo de Dimerización de HER2-HER3 Inducido por Ligando

Las células T-47D (ATCC No. de Cat. HTB-133™) se sembraron en 1x10⁶/cavidad en placas de 6 cavidades durante la noche. A la siguiente mañana, las células se trataron con los anticuerpos monoclonales 2C2, CL16, AMG y MM a una concentración de 5 µg/ml en el suero completo durante 2 horas a 37°C. Los controles no incluyeron tratamiento con anticuerpo, o tratamiento con IgG1 R347 de control. El tratamiento fue seguido por el tratamiento con 50 ng/ml de HRG durante 10 minutos a 37°C (incluyendo un control no tratado con HRG). Las células se lavaron 3 veces con PBS frío antes de adicionar 500 µl de solución amortiguadora de lisis celular, que incluye los inhibidores de proteasa y fosfatasa (Sigma, St. Louis, MO). Las células se lisaron sobre hielo durante por lo menos 30 minutos. Los lisados se recolectaron con un raspador de células. 50 µl de una solución de cuentas de proteína A que contiene 25 µl de cuentas de proteína A conjugadas con 1 µg de mAb anti-HER3 (Cat. No. MAB3481, R&D Systems, Minneapolis, MN) se adicionaron a 500 µl del lisado celular y se transfirieron a las columnas de inmunoprecipitación (IP). Las columnas IP se giraron durante la noche a 4°C. Subsecuentemente, las columnas IP se hicieron girar para remover los lisados, y las cuentas se lavaron con solución amortiguadora de lisis celular fría. 50 µl de la solución amortiguadora de muestra 2X SDS que contiene DTT 50 mM se adicionaron a cada columna IP, y las columnas se sometieron a ebullición durante 4 minutos. La punta de fondo de cada columna se removió, y las columnas se hicieron girar para colectar los

eluat. 20 µl de eluato se separó utilizando SDS-PAGE. El manchado de Western se realizó para tanto HER2 como HER3 (con anticuerpo anti-HER2 No. de Cat. OP15L, CalBiochem, La Jolla, CA; y anticuerpo anti-HER3 No. de Cat. SC-285, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

5

3.2.2. Ensayo de Dimerización de HER2-HER3 Independiente de Ligando

Las células BT-474 (ATCC No. de Cat. HTB-20™) se colocaron a una densidad de 1×10^6 células por cavidad en una placa de 6 cavidades en el medio de cultivo de células RPMI 1640 completo con FBS inactivado con calor al 10%.

10

Al siguiente día, el medio colocado en placas se removió y se reemplazó con RPMI 1640 completo fresco que contiene dosis saturante de anticuerpos de prueba. En este experimento, CL16, la versión de afinidad menor de precursor de 2C2, 2C2 y R347, un IgG de control, se probaron a una concentración de 5 µg/mL. Las células se incubaron con los anticuerpos durante 2 horas a 37°C. Luego el medio se removió, y las células se lavaron una vez con PBS frío. El reticulador 3,3'-ditiobis [sulfosuccinimidilpropionato] (DTSSP) se adicionó a una concentración de 2 mM en 1 mL de PBS frío. Las células se incubaron durante por lo menos 1 hora en hielo. Las células luego se lavaron 3 veces con PBS frío. La solución amortiguadora de lisis celular (500 µL) que contiene los inhibidores de proteasa y fosfatasa se adicionó y las células se colocaron en hielo durante por lo menos 30 minutos para permitir la lisis antes de la recolección con un raspador de células. HER2 y HER3 se inmunoprecipitaron de los lisados de células. Los lisados de células (500 µL) se combinaron con 50 µL de cuentas de sefarosa de proteína A (suspensión al 50%; Invitrogen) preconjugadas a 1 µg de MAb de HER3 (MAB3481, R&D Systems) en una columna SigmaPrep spin (Sigma). La mezcla se incubó con rotación a 4°C durante la noche. Al siguiente día, las cuentas se separaron del lisado celular mediante centrifugación. Las cuentas en las columnas se lavaron cuatro veces con solución amortiguadora de lisis celular fría (Cell Signaling Technologies) que contiene los inhibidores de proteasa (Sigma) y fosfatasa (EMD Millipore). Después del procedimiento de lavado, 50 µL de solución amortiguadora de muestra 2x SDS (dodecil sulfato de sodio) que contiene ditiotreitól 50 mM (DTT; Merck Chemicals) se adicionó en las columnas giratorias. Las columnas luego se sometieron a ebullición durante 4 minutos. Las

15

20

25

30

proteínas fueron eluidas mediante centrifugación y utilizadas inmediatamente para el inmunomanchado (como se hizo en la sección 2.4).

3.2.3. Resultados

5 Las células T-47D tratadas o no tratadas con HRG se lisaron. HER3 se precipitó con el anticuerpo monoclonal anti-HER3, luego las proteínas en la pellet se resolvieron en SDS-PAGE y se mancharon para la presencia de HER2 como signo de interacción de HER2-HER3. El modelo fue inducible de ligando puesto que el dímero solamente ocurrió después de la estimulación con el ligando. Un pre-tratamiento con la
10 formación de dinero eficientemente prevenida de 2C2, que demuestra su habilidad para impedir la formación del dímero HER2-HER3 inducido por ligando. Otros anticuerpos monoclonales anti-HER3 incluyendo MM, AMG y el Clon 16 parental, también se encontraron que son efectivos (**FIGURA 14A**). Cuando el reticulador DTSSP se utilizó para estabilizar bioquímicamente los complejos de proteína, el heterodímero de
15 HER2:HER3 constitutivo se capturó en la ausencia de HRG en las células BT-474, indicando una formación de heterodímero independiente de ligando. El pretratamiento de las células con 2C2 o CL16 interrumpió de manera efectiva esta formación de heterodímero (**FIGURA 14B**).

20 3.3. Internalización y Degradación de HER3 Inducida por 2C2

La internalización y degradación objetivo son dos mecanismos comunes mediante los cuales los anticuerpos monoclonales inhiben sus funciones objetivo. Primero, los inventores estimaron la internalización de HER3 mediada por 2C2 en las células de cáncer de mama BT-474. En seguida, los inventores averiguaron si esta
25 internalización de HER3 inducida por 2C2 rápida podría ser seguida mediante la degradación objetivo.

3.3.1. Ensayo de Internalización de HER3

La internalización de HER3 se determinó utilizando un ensayo de
30 Clasificación de Células Activado por Fluorescencia (FACS). Las células BT-474 se desprendieron con la enzima Accutase y se suspendieron las células en PBS que

contiene BSA al 1% (solución amortiguadora FACS) a una densidad de célula de 10×10^6 células/ml. 50 μ l de células se adicionaron a cada célula de una placa de 96 cavidades de fondo U. 50 μ l de anticuerpos monoclonales anti-HER3 más el control de Isótopo (a 20 μ g/ml) se adicionaron en cada cavidad para lograr una concentración final de 10 μ g/ml. La

5 placa se incubó a 37°C durante 0.5 horas, 2 horas y 4.5 horas, respectivamente. Las células se lavaron con solución amortiguadora FACS fría dos veces (las células se formaron en pelotilla mediante centrifugación a 1,500 rpm durante 2 minutos). Las células se suspendieron con solución amortiguadora FACS fría que contiene anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano de ratón (No. de Cat. MAB3481, R&D Systems,

10 Minneapolis, MN) en 1 μ g/ml o 10 μ g/ml.

Las células y el anti-HER3 humano se incubaron en hielo durante 1 hora. Las células luego se lavaron dos veces con solución amortiguadora FACS fría. Las células se resuspendieron subsecuentemente con solución amortiguadora FACS fría que contiene un anticuerpo secundario marcado con 488 Alexa Fluor® (Invitrogen) (1:200 v/v)

15 y se incubaron en EL hielo durante 30-45 minutos. Las células luego se lavaron con solución amortiguadora FACS fría dos veces y se resuspendieron con 100 μ l de solución amortiguadora FACS fría. En este punto, FACS se realizó. La Media Geométrica Absoluta de Intensidades de Fluorescencia (GMFI) se obtuvo al sustraer la GMFI de los controles que incluyen únicamente el anticuerpo secundario. La evacuación de superficie de HER3

20 relativa se calculó al comparar con los resultados obtenidos utilizando un anticuerpo monoclonal de control IgG. Resultados representativos se muestran en la **FIGURA 15A**.

3.3.2. Ensayo de Degradación de Proteína HER3

Las células de cáncer de modelo colorrectal Lovo, HCT15 y SW620 (ATCC

25 Nos. CCL-229, CCL-225 y CCL-227, respectivamente) se sembraron en 1.5×10^5 /cavidad en placas de 24 cavidades. Después de la unión durante la noche, las células se trataron con 2C2 y el anticuerpo monoclonal de control durante 3-4 horas. Las células se lavaron con PBS frío una vez, directamente se lisaron con 50-60 μ l de solución amortiguadora de muestra 2X SDS y se sometieron a ebullición a 100°C durante 10 minutos. 20 μ l de las

30 muestras se cargaron en geles SDS-PAGE, se separaron electroforéticamente y se mancharon con Western con el anticuerpo contra HER3 (Santa Cruz Biotech) para

cuantificar los niveles de proteína HER3 totales. Los anticuerpos contra GAPDH (Sigma) también se utilizaron para cuantificar los niveles de GAPDH como un control de carga de proteína general.

5 **3.3.3. Resultados**

 Como se muestra en la **FIGURA 15A**, ambas dosis de 2C2 tuvieron un impacto muy similar. Un tratamiento de 30 minutos causó una pérdida de 39% de la población de HER3 de superficie (61% restante), mientras que un tratamiento de 2 horas causó una pérdida de 62% (38% restante), sugiriendo una internalización objetivo rápida mediante 2C2. Adicionalmente, cuando los tres diferentes modelos de cáncer colorrectal se incubaron con 2C2, se observó degradación de HER3 completa en las células SW620, mientras se observó casi degradación completa en las otras dos líneas de células (**FIGURA 15B**), demostrando que 2C2 fue capaz de una fuerte capacidad de degradación del objetivo.

15

3.4. Funciones Efectoras: Citotoxicidad Mediada por Célula Dependiente del Anticuerpo (ADCC) y Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC)

 ADCC es una manera reconocida a través de la cual un anticuerpo monoclonal puede conferir su eficacia antitumoral *in vivo*. Para estimar la actividad de ADCC del Clon 16, los inventores utilizaron un ensayo ADCC habilitado con PBMC *in vitro* en dos modelos de cáncer de mama amplificados con HER2: BT-474 y SkBR3. Herceptina/Trastuzumab se utilizó como control positivo puesto que se ha mostrado que confiere efecto de ADCC en este tipo de cáncer. En ambos modelos los inventores observaron efecto de exterminación de tumor significativo de Herceptina, pero los anticuerpos monoclonales restantes probados, Clon 16, AMG y MM, fueron grandemente inactivos, indicando que carecieron del efecto ADCC apreciable (datos no mostrados). 2C2-YTE se probó en ensayos CDC utilizando suero humano como una fuente de complemento. Además, el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab y el anticuerpo anti-CD20 rituximab, se incluyeron como controles. Ninguno de los anticuerpos que incluyen 2C2-YTE mostraron alguna actividad de CDC detectable en cualquier concentración (datos no

30

mostrados). Las células SkBR3 no expresan CD20. Como un control positivo, rituximab demostró actividad de exterminación celular sustancial en un ensayo CDC similar contra células Daudi, que expresa CD20 (datos no mostrados).

5 **3.5. Detención del Ciclo Celular**

3.5.1. Ensayo de Detención del Ciclo Celular en Células de Cáncer de Mama SkBR3

 BioSantecells (ATCC No.HTB-30) se colocaron en una densidad de 150,000 células/cavidad en una placa de 6 cavidades y se dejaron unir durante la noche.

10 Al siguiente día, el medio se removió y se reemplazó con medio de crecimiento fresco que contiene los anticuerpos de prueba y de control. Las células luego se incubaron a 37°C durante 48 horas. Al final del tratamiento, las células se tripsinizaron, se acumularon en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Las células luego se lavaron una vez con PBS y se fijaron en etanol al 70% enfriado con hielo a -20°C

15 durante la noche.

 Después de la fijación, las células se centrifugaron como es descrito en lo anterior, se lavaron una vez en PBS y se resuspendieron en solución de manchado (PBS + Triton X-100 al 0.1%, 0.2 mg/ml DNAasa a libre de RNAasa y 20 µg/ml de yoduro de propidio). Las células se mancharon durante 30 minutos a temperatura ambiente en la

20 oscuridad, y se analizaron utilizando un Sistema de Citómetro de Flujo LSRII (BD Biosciences). El yoduro de propidio se detectó utilizando el canal de Rojo Texas; los datos se analizaron utilizando el paquete de análisis de Citometría de flujo FlowJo (Tree Star. Inc., OR) utilizando el Modelo de Decan/Jett/Fox.

25 **3.5.2. Resultados**

 El análisis del ciclo celular a base de FACS mostró que en las células SkBR3, una línea de células de cáncer de mama amplificada con HER2 similar a BT-474, tanto Herceptina y el Clon 16 (guía parental para 2C2) causaron la detención del ciclo celular en la fase G1 (población G1 incrementada al disminuir las poblaciones S/G2 como

30 se muestra en la **FIGURA 16**).

3.6. Efectos Anti-angiogénicos al Bloquear la Secreción de VEGF Inducida por HRG

HRG se ha mostrado que induce la secreción de VEGF, una citoquina pro-angiogénica mayor, en varios modelos de cáncer. Por lo tanto los inventores estimaron los efectos inhibidores de 2C2 en suprimir la secreción de VEGF inducida por HRG en dos modelos de cáncer de mama: MCF-7 y BT-474.

3.6.1. Ensayo de Secreción de VEGF Inducida por HRG

Las células MCF-7 y células BT-474 se colocaron a una densidad de 100,000 células/cavidad en una placa de 24 cavidades, y se dejaron reposar durante 2 días. El medio luego se removió y se reemplazó con 500 µl del medio de crecimiento fresco que contiene FBS al 2% y los anticuerpos de control y de prueba. Después de 24 horas de incubación, el medio de cultivo de células se recolectó y los niveles de VEGF se determinaron utilizando un Equipo ELISA de VEGF (R&D Systems DY293B). El número de células relativo en cada cavidad se determinó al adicionar el medio fresco a las células junto con Cell Titer Glo (Promega, relación 1:1) y al incubar las placas durante 10 minutos a temperatura ambiente. La luminiscencia se leyó utilizando un lector de placa, y estos valores se utilizaron para la normalización de los datos.

3.6.2. Resultados

El tratamiento con HRG indujo incrementos notables en la secreción de VEGF en el BT-474 (**FIGURA 17A**) y MCF-7 (**FIGURA 17B**) ambas líneas de células de modelo de cáncer de mama que varían de 6.5 veces a 8 veces. Los anticuerpos monoclonales CL16 (Clon 16) y MM fueron capaces de suprimir la mayoría de los incrementos, sugiriendo que estos anticuerpos monoclonales anti-HER3 pueden conferir efectos de modulación vascular adicionales.

Ejemplo 4. Reactividad Cruzada con HER3 de Mono Cynomolgus y de Ratón

4.1. 2C2 Enlaza a HER3 de Cynomolgus y de ratón con Afinidad Similar al HER3

Humano

Se realizaron ensayos Biacore esencialmente como es descrito en lo

anterior para comparar la afinidad de 2C2 al HER3 de humano, de mono cynomolgus (cyno) y de ratón para permitir la selección de especie de toxicidad relevante (porción superior de la Tabla 7). Los ensayos Biacore adicionales se realizaron para 2C2-YTE utilizando un instrumento BiAcCore de más alta resolución, un reactivo de captura de Fc

5 alternativo y un protocolo de inyección refinado para corregir el enlace antes de fondo. Brevemente, el reactivo de captura de Proteína A se inmovilizó sobre dos células de flujo adyacentes conectadas en serie en el mismo chip sensor de CM5, utilizando un protocolo de amina estándar como es resumido por el fabricante del instrumento. Una de estas superficies de Proteína A se utilizó como una superficie de referencia para este

10 experimento, mientras que la otra sirvió como la superficie activa utilizada para registrar la captura de IgG y el enlace de HER3 (ECD) subsecuente. Las densidades de Proteína A finales en las superficies de células de flujo de referencia y activas se registraron como 1986 Rus y 1979 RUs, respectivamente. Como es configurado, el método se ajustó tal que IgG de 2C2-YTE primero se capturó sobre únicamente la superficie de Proteína A

15 activa, seguido por una inyección de una solución de proteína HER3 sobre ambas de las superficies de células de flujo activa de referencia. Al hacer esto, esta estrategia corrige la curva de enlace para cualquier enlace no específico del analito HER3 a la superficie de captura de Proteína A. Para la etapa de captura de IgG, IgG 2C2-YTE se preparó a 10 nM en solución amortiguadora de instrumento HBS-EP + (HEPES 0.01 M, pH 7.4, NaCl 0.15

20 M, EDTA 3 mM y P20 0.05%) luego se inyectaron sobre la superficie de célula de flujo de Proteína A activa durante 30 segundos a un gasto de 10 μ L/min. La proteína HER3 de humano, cyno y de murino luego se preparó inicialmente en soluciones de extracto de 500 nM en la solución amortiguadora del instrumento, luego las series de dilución en series de dos veces de cada una se generaron para proporcionar una concentración final de 0.39

25 nM. La proteína HER3 luego se inyectó sobre ambas de las superficies de Proteína A de célula activa y de referencia durante 120 segundos, en un gasto de 75 μ L/min. Los datos de disociación se recolectaron durante 15 minutos, seguido por dos pulsos de 60 segundos con solución amortiguadora Gly 10 mM, pH 1.7, entre las inyecciones para regenerar las células de flujo nuevamente las superficies de captura de Proteína A. Varias

30 inyecciones de solución amortiguadora también se interdispersaron por toda la serie de inyección. Las inyecciones de solución amortiguadora selectas se utilizaron

subsecuentemente junto con los datos de la celda de referencia para corregir los conjuntos de datos en bruto para los artefactos de inyección y/o las interacciones de enlace no específico, una técnica comúnmente referida como “doble referencia” (Myszka, 1999). Los datos de enlace completamente corregidos luego fueron globalmente

5 ajustados a un modelo de enlace 1:1 (software BIAevaluation 4.1) que incluyó un término para corregir el enlace limitado a transporte de masa, si es detectado. Este análisis determina las constantes de velocidad cinética (kon, koff), de las cuales el KD aparente luego se calculó como koff/kon (fondo de la Tabla 7). La variación en los valores K_{on} y K_{off} entre los dos conjuntos de experimentos son probablemente debido a las diferencias entre

10 los dos protocolos como es detallado anteriormente y fueron generalmente dentro del intervalo de error de dos veces aceptado para medir estos parámetros cinéticos. Como se muestra en la **TABLA 7**, la afinidad de 2C2 Y 2C2-YTE a HER3 de cyno fue virtualmente idéntica con aquella de HER3 de humano. La afinidad para HER3 de ratón estuvo dentro de 3 veces de la afinidad para HER3 de humano.

15 **TABLA 7:** Ensayo de enlace Biacore que muestra la afinidad de 2C2 a HER3 de humano, de cyno y de ratón.

Captura de IgG 2C2 2C2 2C2				
(exp34c, 34d, 43b) (exp43d) (exp43f)				
20	Receptor	huHER3 (ECD)-His	muHER3-His	Cyno HER3-His
	Formato	captura de IgG (Fc) captura de IgG (Fc) captura IgG (Fc)		
	Kon (1/Ms) (x10 ⁵)	4.27 (+/- 0.45)	3.26	4.66
	Koff (1/s) (x10 ⁻⁴)	1.71 (+/- 0.18)	3.78	1.81
	K _D (nM)	0.402 (+/- 0.029)	1.16	0.389
25	Captura de IgG	2C2-YTE	2C2-YTE	2C2-YTE
	Receptor	huHER3 (ECD)-His	muHER3-His	Cyno HER3-His
	Formato	captura de IgG (Fc) captura de IgG (Fc) captura de IgG (Fc)		
	Kon (1/Ms) (x10 ⁵)	1.61	1.11	1.52
	Koff (1/s) (x10 ⁻⁴)	0.743	1.91	0.734

K_D (nM) 0.461 1.721 0.483

4.2. Ensayo para la Fosforilación inducida por HRG del HER3 de Cynomolgus

Células Ad293 (Stratagene No. 240085) se transfectaron transientemente
5 con el vector de expresión cynoHER3 de longitud completa siguiendo el protocolo
proporcionado con el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Las células se dejaron
incubar a 37°C durante 48 horas antes del tratamiento. Se adicionaron antibióticos en 10
µg/ml en el medio de crecimiento completo durante 1 hora seguido por la estimulación con
20 ng/ml de HRGβ1 (R&D Systems) durante 10 minutos a 37°C. Al final del tratamiento, el
10 medio se removió y las células se lavaron una vez con PBS. Las células se lisaron con la
solución amortiguadora de muestra Tris-glicine 2x Novex (Invitrogen) y los niveles de
pHER3 y HER3 total se determinaron mediante el inmunomanchado (anticuerpo de
Señalización de Célula #4791 y anticuerpo Santa Cruz #285, respectivamente). La
densitometría de las bandas se realizó utilizando el software ImageJ (NIH,
15 imagej.nih.gov/ij/).

4.3. Resultados

Para establecer completamente el enlace y modulación cruzada de HER3
de cyno mediante 2C2, una línea de células Ad293 estable que expresa ectópicamente
20 HER3 de cyno de longitud completa se estableció, como es demostrado por el manchado
de Western (**FIGURA 18A**). Cuando se trató con HRG, el HER3 de cyno se sometió a la
activación robusta como es evidenciado por la inducción de la señal pHER3 (**FIGURA
18B**). Cuando las células se co-trataron con 2C2 pero no cuando se trataron con el
anticuerpo de control R347, la inducción de pHER3 fue completamente anulada,
25 demostrando que 2C2 no fue únicamente capaz de enlazar HER3 de cyno sobre la
superficie de la célula, sino también capaz de ablacionar eficientemente su activación
(**FIGURA 18B**). Combinado con los datos de medición de afinidad de Biacore anteriores
que muestran que 2C2 exhibió afinidad idéntica a HER3 de cyno en cuanto a HER3 de
humano, estos resultados validaron cyno como una especie de toxicidad relevante para
30 los experimentos de 2C2.

Estudios *In Vivo* para Anticuerpos Monoclonales Anti-HER3

4.4. Estudios de Modelo de Xenoinjerto de Cabeza y Cuello FADU Humano Subcutáneo

4.4.1. Método

5 Células de Cabeza y Cuello FADU humano (ATCC No.HTB-43) se mantuvieron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% en el medio RPMI 1640 que contiene 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Los xenoinjertos se establecieron al inyectar subcutáneamente 5 x 10⁶ células por ratón (suspendidas en matrigel al 50%) en los flancos derechos de ratones nu/nu atímicos de 4
10 a 6 semanas de edad. Los tumores se dejaron crecer hasta 200 mm³ antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. 2C2, 2C2-YTE, cetuximab, IgG1 de control o la combinación de 2C2 con anticuerpos monoclonales de cetuximab se administraron intraperitonealmente. Para los estudios de dependencia de dosis el 2C2 se administró en 3, 5, 7 y 10 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg), el control en 10 mg/kg. Para los
15 estudios de combinación 2C2 se administró en 3 mg/kg, cetuximab en 30 mg/kg y el anticuerpo de control en 6 mg/kg. Se utilizaron mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor utilizando la fórmula:

$$\text{volumen de tumor} = \pi \div 6(\text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{ancho})$$

para tumores crecidos en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el por
20 ciento delta de inhibición de crecimiento de tumor (TGI), que se calculó como sigue:

$$\text{por ciento delta TGI} = 1 - (dT \div dC) \times 100,$$

donde dT = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de tratamiento comparado con el valor en las etapas, y dC = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de control comparado con el valor en las etapas.

25 En la conclusión de los estudios de eficacia con 2C2, los ratones se trataron con 2C2 un tiempo final como es indicado para determinar los valores farmacocinéticos. La punción cardíaca se realizó para recolectar la sangre en Tubos Separadores de Suero Microtainer (SST). Los tubos con sangre se giraron en vórtice moderadamente durante 10 segundos y se mantuvieron a temperatura ambiente durante
30 20 minutos para permitir que coagule el suero. Las muestras se centrifugaron en 1000 x g durante 10 minutos, y las muestras de suero se transfirieron cuidadosamente en nuevos

tubos y se almacenaron a -80°C.

Un formato de Ensayo Inmunosorbente Enlazado a Enzima (ELISA) indirecto se utilizó para la determinación cuantitativa de 2C2 en el suero de ratón. Los estándares, controles de calidad y muestras de suero del ratón se incubaron con anticuerpos anti-IgG humano de cabra que se inmovilizaron en una placa de microtítulo de 96 cavidades. Después de la incubación, los materiales no enlazados se removieron mediante una etapa de lavado y 2C2 se detectó utilizando un anti-IgG humano de cabra con conjugado de peroxidasa de rábano picante. Una solución de detención ácida se adicionó y el grado de giro enzimático del sustrato se determinó al medir la absorbancia en 450 nm. La absorbancia medida fue directamente proporcional a la concentración de 2C2 presente en el suero del ratón. Una curva estándar de 2C2 para el ensayo se utilizó para interpolar la concentración de las muestras del suero.

4.4.2. Resultados

Utilizando un modelo de xenoinjerto de Cabeza y Cuello FADU humano cultivado subcutáneamente en ratones desnudos hembra, 2C2 demostró eficacia antitumoral dependiente de la dosis. La eficacia máxima de 99% de inhibición de crecimiento del tumor (dTGI) se observó con 7 mg/kg administrado dos veces por semana para la duración del estudio (**FIGURA 19A**).

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

2C2 reaccionó cruzadamente con HER3 de ratón y es bien establecido que HER3 se expresa en muchos tejidos de ratón no enfermos. Por lo tanto, HER3 del hospedero podría servir como un absorbedor para absorber el anticuerpo monoclonal 2C2 antes de que alcance el tejido del tumor. Utilizando ratones desnudos hembra que llevan tumor, 2C2 en 5 mg/kg se administró ya sea una vez o tres veces a estos ratones y los niveles de exposición de 2C2 fueron seguidos a través del tiempo. 2C2 solo fue

detectable 1 día después de la última dosis de 5 mg/kg de 2C2 y llegó a ser indetectable después de 3 días después del último tratamiento (**FIGURA 36**). Por otra parte, la dosificación con 30 mg/kg de 2C2 utilizando los mismos programas como para 5 mg/kg condujo a una ventana mucho más prolongada donde 2C2 podría ser medido en el suero del ratón. Estos descubrimientos demostraron farmacocinética no lineal para 2C2 después de la única dosis y la administración de dosis de repetición de 5 mg/kg o 30 mg/kg a ratones que llevan tumor. Los datos mostraron HER3 de ratón puede actuar como un absorbedor para enlazar 2C2 administrado a los ratones y que 30 mg/kg como una sola dosis fue suficiente para saturar el absorbedor.

La existencia de un absorbedor de HER3 en los ratones para 2C2 se confirmó funcionalmente al administrar una dosis de alta carga de 2C2 seguido por una baja dosis de mantenimiento en ratones con tumores de xenoinjerto FADU. La eficacia antitumoral de una dosis de carga de 10 mg/kg y una dosis de mantenimiento de 3 mg/kg de 2C2 se demostró en el modelo de tumor FADU. 10 mg/kg de 2C2 como una sola dosis tuvo únicamente eficacia antitumoral transiente. 2C2 dado en 3 mg/kg dos veces por semana tuvo eficacia moderada pero continua. La combinación de la dosis de carga de 10 mg/kg con la dosis de mantenimiento de 3 mg/kg de 2C2 fue más eficaz en bloquear el crecimiento del tumor comparado con cualquier programa de tratamiento solo (**FIGURA 21**).

La habilidad de 2C2 para modular los marcadores farmacodinámicos pHER3 y pAKT se probó en extractos de tumor de xenoinjerto FADU. 2C2 se administró dos veces en 30 mg/kg dentro de 48 horas a ratones que llevan tumores de xenoinjerto FADU humano y los extractos se analizaron 24 después. Brevemente, ratones desnudos atímicos se implantaron subcutáneamente con células de cáncer de cabeza y cuello FADU. Los animales se administraron con 2C2 en 30 mg/kg dos veces dentro de 48 horas. Los extractos se prepararon 24 horas después para el análisis de pHER3, pAKT y HER3 total (**FIGURA 22**, paneles superior, medio y de fondo, respectivamente). R347 se utilizó como el anticuerpo IgG1 de control. Hubo 6 animales por grupo de tratamiento. Los datos se presentan como la media $\pm$ desviación estándar. Aquí, 2C2 inhibió la fosforilación de tanto HER3 como AKT por 59.5% y 51.7%, respectivamente, comparados con los tumores de los ratones tratados con IgG1 de control (**FIGURA 22**, paneles superior y en

medio). No se observó modulación de HER3 total mediante 2C2 (**FIGURA 22**, panel del fondo).

4.5. Estudios de Modelo de Xenoinjerto de Cabeza y

5 Cuello Detroit562 Humano Subcutáneo

4.5.1. Método

Células de Cabeza y Cuello Detroit562 Humano (ATCC No.CCL-138) se mantuvieron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% en el medio RPMI 1640 que contiene 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%.
10 Los xenoinjertos se establecieron al inyectar subcutáneamente 5 x 10⁶ células por ratón en los flancos derechos de ratones un/un atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Los tumores se dejaron crecer hasta 200 mm³ antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. 2C2, 2C2-YTE, cetuximab, IgG1 de control o la combinación de 2C2 con anticuerpos monoclonales de cetuximab se administraron intraperitonealmente. Para los
15 estudios de dependencia de dosis 2C2 se administró en 1, 3, 10 y 30 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg). Para los estudios de combinación 2C2 se administró en 3 mg/kg, cetuximab en 30 mg/kg y el anticuerpo de control en 10 mg/kg. Se utilizaron mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor utilizando la fórmula:

$$\text{volumen de tumor} = \pi \div 6 (\text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{ancho})$$

20 para tumores crecidos en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como por ciento delta de inhibición de crecimiento de tumor (TGI), que se calculó como sigue:

$$\text{por ciento delta TGI} = 1 - (dT \div dC) \times 100,$$

donde dT = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de tratamiento comparado con el valor en las etapas y dC = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de
25 control comparación con el valor en las etapas.

En la conclusión de los estudios de eficacia con 2C2, los ratones se tratados con 2C2 en un tiempo final como es indicado para determinar los valores farmacocinéticos. La punción cardíaca se realizó para recolectar la sangre en tubos microtainer SST. Los tubos con sangre se giraron en vórtice moderadamente durante 10
30 segundos y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir que coagule el suero. Las muestras se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos, y las

muestras de suero se transfirieron cuidadosamente a nuevos tubos y se almacenaron a -80°C.

Se utilizó un formato de Ensayo Inmunosorbente Enlazado a Enzima (ELISA) indirecto para la determinación cuantitativa de 2C2 en el suero de ratón. Los
 5 estándares, controles de calidad y muestras de suero de ratón se incubaron con anticuerpos anti-IgG humano de cabra que se inmovilizaron en una placa de microtítulo de 96 cavidades. Después de la incubación, los materiales no enlazados se removieron mediante una etapa de lavado y 2C2 se detectó utilizando un anti-IgG humano de cabra con conjugado de peroxidasa de rábano picante. Se adicionó una solución de detención
 10 acídica y el grado de cambio enzimático del sustrato se determinó al medir la absorbancia en 450 nm. La absorbancia medida fue directamente proporcional a la concentración de 2C2 presente en el suero de ratón. Una curva estándar de 2C2 para el ensayo se utilizó para interpolar la concentración de las muestras de suero.

15 **4.5.2. Resultados**

2C2 mostró eficacia antitumoral en el modelo de xenoinjerto de Cabeza y Cuello Detroit562 humano crecido subcutáneamente en ratones desnudos hembra. 10 mg/kg de 2C2 administrado dos veces por semana fue máximamente eficaz en 72% de dTGI (**FIGURA 23A**). El modelo Detroit562 contiene una mutación PIK3CA.

20 El modelo de tumor Detroit562 fue sensible al anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab que causó la inhibición de crecimiento del tumor en 10 mg/kg administrado dos veces por semana. La combinación de 3 mg/kg de 2C2 con 10 mg/kg de cetuximab adicionado a la eficacia antitumoral de cetuximab y dio por resultado 9 de entre 10 regresiones parciales mientras que cetuximab solo produjo 5/10 regresiones parciales
 25 (**FIGURA 23B**).

4.6. Estudios de Modelo de Xenoinjerto de Cabeza y Cuello CAL27 Humano Subcutáneo

Cuello CAL27

4.6.1. Método

30 Células de Cabeza y Cuello CAL27 humano (ATCC No.CRL-2095) se mantuvieron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% en el medio de RPMI 1640 que

contiene 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Los xenoinjertos se establecieron al inyectar subcutáneamente 5×10^6 células por ratón en los flancos derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Los tumores se dejaron crecer hasta 200 mm^3 antes de la aleatorización para los estudios de
5 eficacia. 2C2-YTE, cetuximab o IgG1 de control se administraron intraperitonealmente. Para estudios de dependencia de dosis el 2C2-YTE se administró en 3, 10 y 30 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg). Se utilizaron mediciones con calibrador para calcular los volúmenes de tumor utilizando la fórmula:

$$\text{volumen de tumor} = \pi \div 6 (\text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{ancho})$$

10 para tumores crecidos en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como por ciento delta de inhibición de crecimiento de tumor (TGI) que se calculó como sigue:

$$\text{por ciento delta TGI} = 1 - (dT \div dC) \times 100,$$

donde dT = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de tratamiento comparado con el valor en las etapas y dC = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de
15 control comparación con el valor en las etapas.

4.6.2. Resultados

La actividad dependiente de dosis de 2C2-YTE se confirmó en un tercer modelo de tumor de cabeza y cuello, CAL27, utilizando 2C2-YTE. 2C2-YTE en 3, 10 o 30
20 mg/kg administrado dos veces por semana mostró TGI con 26.4%, 55.2% o 68.8%, respectivamente, comparado con los animales tratados con IgG1 de control (**FIGURA 24**).

El modelo de tumor CAL27 fue sensible al anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab que causó inhibición de crecimiento del tumor en 30 mg/kg administrado dos veces por semana con TGI de 75.0% (**FIGURA 24**).

25

4.7. Estudios de Modelo de Xenoinjerto NSCLC A549 KRAS Mutado Humano Subcutáneo

4.7.1. Método

30 Células NSCLC A549 humano (ATCC No.CCL-185) que contiene una mutación en el codón 12 del gen KRAS (se mantuvieron a 37°C en una incubadora de

CO₂ al 5% en el medio F12K de HAM que contiene 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Los xenoinjertos se establecieron al inyectar subcutáneamente 5 x 10⁶ células por ratón (suspendido en matrigel al 50%) en los flancos derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Los tumores se dejaron
5 crecer hasta 200 mm³ antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. 2C2, 2C2-YTE, cetuximab, IgG1 de control o la combinación de 2C2 con los anticuerpos monoclonales de cetuximab se administraron intraperitonealmente. Para estudios de dependencia de dosis el 2C2 se administró en 3, 10 y 30 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg) y 2C2-YTE en 10 mg/kg. Para los estudios de combinación 2C2 y
10 cetuximab se administraron cada uno en 10 mg/kg. Se utilizaron mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor utilizando la fórmula:

$$\text{volumen de tumor} = \pi \div 6 (\text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{ancho})$$

para tumores crecidos en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como por ciento delta de inhibición de crecimiento de tumor (TGI), que se calculó como sigue:

15
$$\text{por ciento delta TGI} = 1 - (dT \div dC) \times 100,$$

donde dT = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de tratamiento comparado con el valor en las etapas y dC = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de control comparado con el valor en las etapas.

20 **4.7.2. Resultados**

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

Cetuximab en 10 mg/kg solo no fue eficaz en este modelo de tumor A549.
30 Sin embargo, la adición de cetuximab en 10 mg/kg a 2C2 también en 10 mg/kg dio por resultado una eficacia antitumoral aditiva durante la fase de tratamiento comparado con el

mg/kg no fue eficaz en este modelo de tumor HARA-B. El modelo de xenoinjerto HARA-B contiene un alelo RAS de tipo silvestre.

4.9. Estudios de Modelo de Xenoinjerto CRC HT-29 Humano

5 Subcutáneo

4.9.1. Método

Células de carcinoma colorrectal HT-29 humano (ATCC No.HTB-38) se mantuvieron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% en el medio RPMI 1640 que contiene 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Los xenoinjertos se establecieron al inyectar subcutáneamente 5 x 10⁶ células por ratón en los flancos derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Los tumores se dejaron crecer hasta 200 mm³ antes de la aleatorización para estudios de eficacia. 2C2, 2C2-YTE y los anticuerpos monoclonales IgG1 de control se administraron intraperitonealmente. 2C2 se administró en 2, 10 y 30 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg), mientras que 2C2-YTE estuvo en 30 mg/kg. Se utilizaron mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor utilizando la fórmula:

$$\text{volumen de tumor} = \pi \div 6 (\text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{ancho})$$

para tumores crecidos en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el por ciento delta de inhibición de crecimiento de tumor (TGI), que se calculó como sigue:

20
$$\text{por ciento delta TGI} = 1 - (dT \div dC) \times 100,$$

donde dT = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de tratamiento comparado con el valor en las etapas y dC = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de control comparado con el valor en las etapas.

25 4.9.2. Resultados

2C2 mostró eficacia antitumoral dependiente de dosis utilizando el modelo de xenoinjerto colorrectal HT-29 humano inyectado subcutáneamente en ratones desnudos hembra. 30 mg/kg de 2C2 administrado dos veces por semana fue eficaz máximamente en 56% de dTGI durante la fase de tratamiento (**FIGURA 27**). 2C2-YTE exhibió la misma eficacia como 2C2 ambos dados en 30 mg/kg. Una vez que se detuvo el tratamiento los tumores crecieron a la misma velocidad como los tumores de control. El

modelo de xenoinjerto HT-29 contiene una mutación BRAF. Cetuximab en 10 mg/kg solo no tuvo actividad antitumoral medible en este modelo. La actividad de 2C2 30 mg/kg en combinación con cetuximab en 10 mg/kg fue indistinguible de la actividad de 2C2 30 mg/kg solo al final de la fase de tratamiento (datos no mostrados). Esto indica que este modelo de tumor CRC que expresa EGFR, que responde bien a 2C2, no fue además inhibido por la adición de 2C2-YTE a cetuximab.

4.10. Estudios de Modelo de Xenoinjerto CRC HCT-116

Humano Subcutáneo

4.10.1. Método

Células de carcinoma colorrectal HCT-116 humano se mantuvieron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% en el medio RPMI 1640 que contiene 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Los xenoinjertos se establecieron al inyectar subcutáneamente 5 x 10⁶ células por ratón en los flancos derechos de los ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Los tumores se dejaron crecer hasta 200 mm³ antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. 2C2, 2C2-YTE, cetuximab y los anticuerpos monoclonales IgG1 de control se administraron intraperitonealmente. 2C2 se administró en 3, 10 y 30 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg), mientras que 2C2-YTE estuvo en 30 mg/kg. Se utilizaron mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor utilizando la fórmula:

$$\text{volumen de tumor} = \pi \div 6 (\text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{ancho})$$

para tumores crecidos en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como el por ciento delta de inhibición de crecimiento de tumor (TGI) que se calculó como sigue:

$$\text{por ciento delta TGI} = 1 - (dT \div dC) \times 100,$$

donde dT = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de tratamiento comparado con el valor en las etapas y dC = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de control comparado con el valor en las etapas.

4.10.2. Resultados

2C2 en varias concentraciones diferentes y 2C2-YTE en 10 mg/kg administrado dos veces por semana exhibió eficacia antitumoral moderada en el modelo

de xenoinjerto colorrectal HCT-116 humano inyectado subcutáneamente en ratones desnudos hembra (**FIGURA 28**). La eficacia máxima se observó en 43% dTGI para 2C2 en 10 mg/kg. El anticuerpo monoclonal anti-EGFR cetuximab no tuvo eficacia en 10 mg/kg. El modelo de xenoinjerto HCT-116 contiene una mutación KRAS.

5

4.11. Estudios de Modelo de Xenoinjerto CRC LOVO Humano

Subcutáneo

4.11.1. Método

Células de carcinoma colorrectal LOVO humano (ATCC No.CCL-229) se mantuvieron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% en el medio F12K de HAM que contiene 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Los xenoinjertos se establecieron al inyectar subcutáneamente 5 x 10⁶ células por ratón en los flancos derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Los tumores se dejaron crecer hasta 200 mm³ antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. 2C2, 2C2-YTE, cetuximab y los anticuerpos monoclonales IgG1 de control se administraron intraperitonealmente. 2C2 se administró en 10 o 30 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg), 2C2-YTE y cetuximab se administraron en 10 mg/kg y el control en 30 mg/kg. Se utilizaron mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor utilizando la fórmula:

20
$$\text{volumen del tumor} = \pi \div 6 (\text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{ancho})$$

para tumores crecidos en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como por ciento delta de inhibición de crecimiento de tumor (TGI) que se calculó como sigue:

$$\text{por ciento delta TGI} = 1 - (dT \div dC) \times 100,$$

donde dT = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de tratamiento comparado con el valor en las etapas y dC = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de control comparado con el valor en las etapas.

25

4.11.2. Resultados

2C2 en 30 mg/kg administrado dos veces por semana logró eficacia antitumoral de 48% dTGI en el modelo de xenoinjerto colorrectal LOVO humano crecido subcutáneamente en ratones desnudos hembra (**FIGURA 29**). 2C2, 2C2-YTE y cetuximab

30

todos en 10 mg/kg tuvieron eficacia comparable. El modelo de xenoinjerto LOVO contiene una mutación KRAS.

4.12. Estudios de Modelo de Xenoinjerto de Carcinoma de

5 Próstata DU145 Humano Subcutáneo

4.12.1. Método

Células de carcinoma de próstata DU145 humano (ATCC No.HTB-81) se mantuvieron a 37°C en una incubadora de CO₂ a 5% en el medio MEM que contiene sales de Earle, 1-glutamina y suero bovino fetal al 10%. Los xenoinjertos se establecieron al
10 inyectar subcutáneamente 5 x 10⁶ células por ratón (suspendidas en Matrigel al 50%) en los flancos derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Los tumores se dejaron crecer hasta 200 mm³ antes de la aleatorización para los estudios de eficacia. 2C2, MM y AMG de los anticuerpos monoclonales se administraron intraperitonealmente en 30 mg por kilogramo de peso corporal. Se utilizaron mediciones con calibrador para
15 calcular los volúmenes del tumor utilizando la fórmula:

volumen del tumor = $\pi \div 6$ (longitud x ancho x ancho)

para tumores crecidos en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como por ciento delta de inhibición de crecimiento de tumor (TGI) que se calculó como sigue:

por ciento delta TGI = $1 - (dT \div dC) \times 100$,

20 donde dT = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de tratamiento comparado con el valor en las etapas y dC = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de control comparado con el valor en las etapas.

4.12.2. Resultados

25 Utilizando un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata DU145 humano crecido subcutáneamente en ratones desnudos macho 2C2 en 30 mg/kg administrados dos veces por semana demostró eficacia antitumoral de 77% dTGI en este modelo de tumor (**FIGURA 30**). El modelo de xenoinjerto DU145 contiene una supresión LKB-1. Los anticuerpos monoclonales anti-HER3 AMG y MM utilizados en 30 mg/kg demostraron
30 eficacia antitumoral pero fueron menos efectivos que 2C2 en la misma dosis de 30 mg/kg.

**4.13. Estudios de Modelo de Xenoinjerto de Cáncer de
Mama BT-474 Humano Ortotópico**

4.13.1. Método

Células de cáncer de mama BT-474 humano se mantuvieron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% en el medio RPMI 1640 que contiene 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Los xenoinjertos ortotópicos se establecieron al inyectar 1 x 10⁷ células por ratón (suspendidas en matrigel al 50%) en la almohadilla de grasa mamaria en el flanco derecho de ratones un/un atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Pelotillas de estrógenos (0.36 mg) se colocaron bajo de la piel del flanco izquierdo 1-2 días antes de la inyección de células. Los tumores se dejaron crecer hasta 200 mm³ antes de la aleatorización para estudios de eficacia. 2C2, 2C2-YTE y/o anticuerpos anti-HER2 conocidos en la técnica: MM, AMG y trastuzumab (nombre comercial Herceptin®; por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,821,337) se administraron intraperitonealmente en 30 mg por kilogramo de peso corporal. Lapatinib se administró mediante cebadura oral en 100 mg por kilogramo de peso corporal. Se utilizaron mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor utilizando la fórmula:

$$\text{volumen del tumor} = \pi \div 6 (\text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{ancho})$$

para tumores crecidos en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como por ciento delta de inhibición de crecimiento de tumor (TGI) que se calculó como sigue:

$$\text{por ciento delta TGI} = 1 - (dT \div dC) \times 100,$$

donde dT = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de tratamiento comparado con el valor en las etapas y dC = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de control comparado con el valor en las etapas.

4.13.2. Resultados

Utilizando un modelo de cáncer de mama humano inducido por HER2, BT-474, inyectado ortotópicamente en la almohadilla de grasa mamaria de ratones desnudos hembra con administración de 2C2 en 30 mg/kg inyectado dos veces por semana condujo a 55% de dTGI en xenoinjertos de BT-474 (**FIGURA 31A**). BT-474 expresa HER2 en niveles muy altos de 3+ caracterizado por HercepTest. AMG y MM ambos administrados

en 30 mg/kg no mostraron eficacia antitumoral en este modelo inducido por HER2.

Lapatinib es un fármaco de molécula pequeña que inhibe EGFR y HER2. Puesto que los tumores BT-474 son inducidos por HER2, lapatinib se probó en este modelo y encontró que causa estasis de tumor en el modelo de tumor BT-474. El
 5 tratamiento de combinación de 30 mg/kg de 2C2 con 100 mg/kg de lapatinib dio por resultado una eficacia antitumoral mejorada de lapatinib solo que fue más claramente visible en un retardo en el recrecimiento de los tumores en la ausencia de tratamientos adicionales (**FIGURA 31B**). La actividad antitumoral de 2C2-YTE fue similar a aquella de 2C2. El anticuerpo anti-HER2 trastuzumab también se probó en este modelo y mostró que
 10 es muy activo en este modelo de xenoinjerto inducido por HER2 con un dTGI de 111.6%. Hubo poco mejoramiento adicional en la actividad de trastuzumab en 30 mg/kg mediante la adición de 30 mg/kg de 2C2 que mostró un dTGI de 118.5% (**FIGURA 31C**).

La habilidad del clon 16 (el clon parental del cual se derivó 2C2) para modular los marcadores farmacodinámicos pHER3 y pAKT se probó en extractos de
 15 tumor de xenoinjerto BT-474. Brevemente, ratones desnudos atímicos hembra se implantaron ortotópicamente con células de cáncer de mama BT-474 que expresan altamente HER2. Los animales se administraron con el Clon 16 en 30 mg/kg dos veces dentro de 48 horas. Los extractos se prepararon 24 horas después para el análisis de pHER3, pAKT y HER3 total (tHER3). Los resultados se normalizan para los animales de
 20 control tratados con PBS. Hubo tres animales por grupo de tratamiento. Como se muestra en la **FIGURA 32**, el Clon 16 inhibió la fosforilación de tanto HER3 como AKT por 50.0% y 46.1%, respectivamente, comparado con los tumores de los ratones tratados con PBS y nada de modulación del HER3 total se observó mediante el Clon 16.

25

4.14. Estudios de Modelo de Xenoinjerto de Cáncer de

Mama MCF-7 Humano Ortotópico

4.14.1. Método

Células de cáncer de mama MCF-7 humano se mantuvieron a 37°C en una
 30 incubadora de CO₂ al 5% en el medio Optimem que contiene glutamax, 2.4/L de bicarbonato de sodio, Hepes y suero bovino fetal al 5%. Los xenoinjertos ortotópicos se

establecieron al inyectar 5×10^6 células por ratón (suspendidas en matrigel al 50%) en la almohadilla de grasa mamaria en el flanco derecho de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Pelotillas de estrógenos (0.36 mg) se colocaron bajo la piel del flanco izquierdo 1-2 días antes de la inyección de células. Los tumores se dejaron crecer hasta 200 mm³ antes de la aleatorización para estudios de eficacia. 2C2, 2C2-YTE y los anticuerpos monoclonales trastuzumab se administraron intraperitonealmente. 2C2 se administró en 10 o 30 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg) 2C2-YTE y trastuzumab en 10 mg/kg. El paclitaxel se administró intravenosamente en 10 mg por kilogramo de peso corporal. Se utilizaron mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor utilizando la fórmula:

$$\text{volumen del tumor} = \pi \div 6 (\text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{ancho})$$

para tumores crecidos en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como por ciento delta de inhibición de crecimiento de tumor (TGI) que se calculó como sigue:

$$\text{por ciento delta TGI} = 1 - (dT \div dC) \times 100,$$

donde dT = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de tratamiento comparado con el valor en las etapas y dC = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de control comparado con el valor en las etapas.

4.14.2. Resultados

2C2 en ya sea 10 mg/kg o 30 mg/kg mostró la eficacia antitumoral moderada de 34% dTGI en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama MCF-7 humano inyectado ortotópicamente en la almohadilla de grasa mamaria de ratones desnudos hembra. 2C2-YTE en 10 mg/kg tuvo eficacia similar como en 2C2 a la misma concentración (**FIGURA 33A**). Trastuzumab no demostró eficacia en este modelo que expresa HER2 lo cual indicó que HER2 no es suficiente para inducir el crecimiento de tumor. Los tumores MCF-7 expresaron bajos niveles de HER2 (1+) medido mediante el HercepTest.

Paclitaxel mostró clara eficacia antitumoral en el modelo de cáncer de mama ortotópico MCF-7 cuando se dosificó en 10 mg/kg cada segundo día por diez días. La adición de 10 mg/kg de 2C2 al tratamiento de paclitaxel incrementó la eficacia antitumoral del paclitaxel solo al final de la fase de tratamiento (**FIGURA 33B**). Los

tumores volvieron a crecer a la misma velocidad como los tumores tratados con paclitaxel después de que se detuvo el tratamiento.

**4.15. Estudios de Modelo de Xenoinjerto de Cáncer de
Mama MDA-MB-361 Humano Ortotópico**

4.15.1. Método

Células de cáncer de mama MDA-MB-361 humano se mantuvieron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% en el medio RPMI 1640 que contiene 4.5 g/L glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Los xenoinjertos ortotópicos se establecieron al inyectar 5 x 10⁶ células por ratón (suspendidas en matrigel al 50%) en la almohadilla de grasa mamaria en el flanco derecho de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Pelotillas de estrógenos (0.36 mg) se colocaron bajo la piel del flanco izquierdo 1-2 días antes de la inyección de células. Los tumores se dejaron crecer hasta 230 mm³ antes de la aleatorización de los estudios de eficacia. 2C2-YTE y/o anticuerpos anti-HER2 conocidos en la técnica, en particular trastuzumab (nombre comercial Herceptin®; por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,821,337) y RhuMAb 2C4 (por ejemplo, Publicación de Patente WO2001/00245) designado en la presente como trastuzumab y 2C4, respectivamente. Trastuzumab y los anticuerpos monoclonales 2C4 se administraron intraperitonealmente en 30 mg por kilogramo de peso corporal (2C2-YTE) o en 10 mg por kilogramo de peso corporal (trastuzumab y 2C4). Lapatinib se administró mediante cebadura oral en 100 mg por kilogramo de peso corporal. Se utilizaron mediciones con calibrador para calcular los volúmenes de tumor utilizando la fórmula:

$$\text{volumen del tumor} = \pi \div 6 (\text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{ancho})$$

para tumores crecidos en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como por ciento delta de inhibición de crecimiento de tumor (TGI) que se calculó como sigue:

$$\text{por ciento delta TGI} = 1 - (dT \div dC) \times 100,$$

donde dT = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de tratamiento comparado con el valor en las etapas y dC = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de control comparado con el valor en las etapas.

4.15.2. Resultados

Utilizando un modelo de cáncer de mama humano inducido por HER2, MDA-MB-361 (Hercept test +2) inyectado ortotópicamente en la almohadilla de grasa mamaria de ratones desnudos hembra, la administración de 2C2-YTE en 30 mg/kg inyectado dos veces por semana por cinco dosis condujo a un 70.1% dTGI en los xenoinjertos MDA-MB-361 (**FIGURA 34A-C**). Las células MDA-MB-361 expresan HER2 en niveles medios de 2+ caracterizados por HercepTest y un registro positivo por el análisis FISH (análisis de hibridización in situ fluorescente). Trastuzumab y rhuMAb 2C4 ambos administrados en 10 mg/kg y lapatinib en 100 mg/kg administrados dos veces diariamente también mostraron eficacia antitumoral en el modelo de tumor MDA-MB-361.

Puesto que los tumores MDA-MB-361 son inducidos por HER2, 2C2-YTE se combinó con fármacos que se dirigen a HER2 tal como trastuzumab, rhuMAb 2C4 o lapatinib. El tratamiento de combinación de 30 mg/kg de 2C2-YTE con 10 mg/kg de trastuzumab dio por resultado una eficacia antitumoral aditiva comparada con el trastuzumab solo. Un efecto aditivo también fue visible en un retardo en el recrecimiento de los tumores en la ausencia de tratamientos adicionales (**FIGURA 34A**). La combinación de 2C2-YTE con trastuzumab fue mejor comparada con las combinaciones de 2C2-YTE con ya sea rhuMAb 2C4 (**FIGURA 34B**) o lapatinib (**FIGURA 34C**) en este modelo.

4.16. Ratones Transgénicos que Expresan el Receptor FcRn Humano para Estudiar la Exposición de Anticuerpos con la Modificación YTE

4.16.1. Método

Ratones SCID de hembra transgénicos que expresan el receptor FcRn humano se les dio una sola dosis de 60 mg/kg del Clon 16-GL, 2C2 o 2C2-YTE por la vía de la ruta intravenosa. El suero se recolectó de estos ratones en varios puntos de tiempo después de la dosificación mediante punción cardíaca y la sangre se recolectó en tubos microtainer SST. Los tubos se giraron en vórtice moderadamente durante 10 segundos y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir que coagule el suero. Las muestras se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos, y las muestras de suero se transfirieron cuidadosamente en nuevos tubos y se almacenaron a -80°C. Se

utilizó un formato de Ensayo Inmunosorbente Enlazado a Enzima (ELISA) indirecto para la determinación cuantitativa de 2C2 en el suero de ratón. Los estándares, controles de calidad y muestras de suero de ratón se incubaron con anticuerpos anti-IgG humano de cabra que se inmovilizaron en una placa de microtítulo de 96 cavidades. Después de la incubación, los materiales no enlazados se removieron mediante una etapa de lavado y 2C2 se detectó utilizando un anti-IgG humano de cabra con el conjugado de peroxidasa de rábano picante. Una solución de detención ácida se adicionó y el grado de cambio enzimático del sustrato se determinó al medir la absorbancia en 450 nm. La absorbancia medida fue directamente proporcional a la concentración de 2C2 o 2C2-YTE presente en el suero de ratón. Una curva estándar de 2C2 o 2C2-YTE para el ensayo se utilizó para interpolar la concentración de las muestras de suero.

4.16.2. Resultados

2C2-YTE, que contiene la mutación YTE en la cadena principal de 2C2, mostró niveles de exposición más altos a través del tiempo comparado con 2C2 o el Clon 16-GL (**FIGURA 35**). Catorce días después de la única dosis de anticuerpo a estos ratones el nivel de exposición en el suero de 2C2-YTE fue arriba de 100 µg/ml mientras que tanto 2C2 como el Clon 16-GL estuvieron abajo de 1 µg/ml. Este descubrimiento demostró que YTE podría prolongar la vida media de 2C2-YTE comparado con su anticuerpo parental 2C2.

4.17. El Inhibidor MEK Induce la Expresión de HER3 y en Combinación con el Anticuerpo Anti-HER3 Muestra Eficacia Antitumoral Aditiva

Las mutaciones KRAS (V-Ki-ras2 oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten) y BRAF (v-raf oncogén viral de sarcoma de murino B1) condujeron a la activación constitutiva de la señalización de EGFR a través de la ruta oncogénica Ras/Raf/Mek/Erk. La mutación Kras está entre los eventos de mutación que ocurren más frecuentemente en muchos tumores sólidos, especialmente cánceres colorrectal (CRC, 30-40%) y de pulmón (LC, 20-25%). La mutación Braf también ocurre en frecuencia relativamente alta en CRC (~15%). Debido a su habilidad para activar constitutivamente la ruta ERK, el mutante Kras y Braf se han mostrado que confieren resistencia de tumor a las terapias con RTK,

especialmente mAbs de EGFR tales como Cetuximab y Panitumumab. El efecto de inhibir la proteína quinasa activada con mitógeno (MEK) en la ruta HER3 en modelos CRC y LC se examinó utilizando el inhibidor de MEK selumetinib (AstraZeneca, ver, por ejemplo, WO03/077914 y WO2007/076245) solo o en combinación con 2C2 (o 2C2-YTE). Un
 5 número de modelos CRC y LC se examinaron incluyendo aquellos que albergan un mut-Kras (por ejemplo A549, LOVO) o mut-Braf (por ejemplo, HT-29, Colo205) o un RAS de tipo silvestre (por ejemplo, HARA-B, KNS-62).

4.17.1. Métodos

10 Estudios de cultivo de células: las células se colocaron en 10^5 por cavidad en placas de 24 cavidades y en el medio que contiene FBS inactivado con calor al 10% y se dejaron alcanzar una confluencia de 80% o más antes del tratamiento. 2C2 (10 μ g/mL) o anticuerpo de control, inhibidor MEK selumetinib (1 o 10 μ M) o una combinación de 2C2 (10 μ g/mL) y selumetinib (10 μ M) se prepararon en el medio completo. Los tratamientos
 15 se aplicaron después de la remoción del medio colocado en placa. Después de una incubación de 24 horas en CO₂ al 5% a 37°C, las células se lavaron una vez con PBS enfriado con hielo y luego se lisaron al adicionar 60 μ L de solución amortiguadora de muestra de 2x dodecil sulfato de sodio (SDS) (Invitrogen). Las muestras se calentaron durante 5 minutos y luego se enfriaron en hielo durante 2 minutos. Las muestras se
 20 analizaron mediante el manchado de Western esencialmente como es descrito en lo anterior (ver los Ejemplos, sección 2.4).

Estudios de xenoinjerto: Células NSCLC A549 humanas (ATCC No. CCL-185) que contiene una mutación en el codón 12 del gen KRAS (se mantuvieron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% en el medio F12K de HAM que contiene 4.5 g/L de glucosa,
 25 L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Los xenoinjertos se establecieron al inyectar subcutáneamente 5×10^6 células por ratón (suspendidas en matrigel al 50%) en los flancos derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Las células de carcinoma colorrectal HT-29 humano (ATCC No. HTB-38) se mantuvieron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% en el medio RPMI 1640 que
 30 contiene 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Los xenoinjertos se establecieron al inyectar subcutáneamente 5×10^6 células por ratón

en los flancos derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Las células de carcinoma colorrectal LOVO humano (ATCC No. CCL-229) se mantuvieron a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% en el medio F12K de HAM que contiene 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 10%. Los xenoinjertos se establecieron al inyectar subcutáneamente 5 x 10⁶ células por ratón en los flancos derechos de ratones nu/nu atímicos de 4 a 6 semanas de edad. Para todos los tres modelos de tumor, los tumores se dejaron crecer hasta 200 mm³ antes de la aleatorización para estudios de eficacia. 2C2-YTE o IgG1 de control se administraron intraperitonealmente, selumetinib se administró oralmente. Para los estudios de combinación 2C2-YTE y selumetinib se administraron en 30 mg/kg o 75 mg/kg, respectivamente. Se utilizaron mediciones con calibrador para calcular los volúmenes del tumor utilizando la fórmula:

$$\text{volumen de tumor} = \pi \div 6(\text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{ancho})$$

para tumores crecidos en ratones. Los efectos antitumorales se expresan como por ciento delta de inhibición de crecimiento de tumor (TGI) que se calculó como sigue:

$$\text{por ciento delta TGI} = 1 - (dT \div dC) \times 100,$$

donde dT = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de tratamiento comparado con el valor en las etapas y dC = cambio en el volumen de tumor medio en el grupo de control comparado con el valor en las etapas.

Preparación de lisados a partir de tumores congelados: Ratones se eutanizaron humanamente mediante asfixia con CO₂ de acuerdo con el protocolo in vivo de los inventores y los tumores se extirparon y se transfirieron a tubos de Matriz de Lisado A. La solución amortiguadora de lisis RIPA (500 µL) que contiene el cóctel de inhibidor de proteasa y el cóctel de inhibidor de fosfatasa conjunto I y II se adicionó, las muestras luego se homogenizaron utilizando una máquina Fast Prep. Las muestras se enfriaron en hielo durante 30 minutos y se sometieron a un ciclo de homogenización adicional antes de la clarificación mediante la centrifugación a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. los lisados clarificados se transfirieron a tubos de 1.5 mL nuevos y se midió el contenido de proteína. Los lisados luego se almacenaron a -80°C hasta el análisis. Las muestras se analizaron mediante el manchado Western esencialmente como es descrito en lo anterior (ver los Ejemplos, sección 2.4).

4.17.2. Resultados

Como se muestra en la **FIGURA 36**, ambos niveles totales y de proteínas de pHER3 se incrementaron después del tratamiento con el inhibidor de MEK selumetinib en células de cáncer colorrectal HT-29 cultivadas en cultivo que expresan BRAF mutante y en células LOVO que expresan un KRAS mutante (**FIGURA 36**, manchas izquierda y media respectivamente). También se observó un incremento de HER3 en las células Colo205 que expresan MUT-BRAF y en las células DLD-1 y HCT, que expresan el mutante KRAS (**FIGURA 36**, mancha derecha, y datos no mostrados), después del tratamiento con selumetinib. Los incrementos ocurrieron en ambas de las dosis de 1 μ M y 10 μ M de selumetinib. La actividad de selumetinib se confirmó mediante la reducción en pERK en todas las líneas de células en ambas de las dosis 1 μ M y 10 μ M. La inhibición de MEK da por resultado una inhibición de la fosforilación de ERK. El anticuerpo anti-HER3, 2C2, inhibió tanto el total y pHER3 en las células HT-29 y LOVo. 2C2 también disminuyó HER3 en las células Colo205 y DLD-1. Además, el co-tratamiento de 2C2 con selumetinib bloqueó la inducción de HER3 total y pHER3 mediante selumetinib en las células HT-29, LOVO y DLD-1 (**FIGURA 36**, y datos no mostrados). Ningún HER3 o pHER3 detectable podría ser observado en las células de cáncer colorrectal SW480, que expresan el KRAS mutante, en las células ya sea no tratadas o tratadas con selumetinib.

Como se muestra en la **FIGURA 37A**, el tratamiento de combinación de 30 mg/kg de 2C2-YTE con 75 mg/kg de selumetinib dio por resultado una eficacia antitumoral aditiva en xenoinjertos NSCLC A549 comparados con selumetinib solo. Un efecto aditivo también fue visible en un retardo en el recrecimiento de los tumores en ausencia de tratamientos adicionales (panel superior). El análisis de manchado de Western de los lisados de tumor de los ratones tratados con la combinación de 30 mg/kg de 2C2-YTE con 75 mg/kg de selumetinib durante un período de 4 días mostró que fosfo-HER3 y fosfo-ERK se inhibieron completamente. Ambos marcadores sirven como lecturas farmacodinámicas para la acción de 2C2-YTE y selumetinib. Se hicieron descubrimientos similares con los modelos de xenoinjerto CRC de HT-29 (**FIGURA 37B**, panel superior e inferior) y LoVo (**FIGURA 37C**, panel superior e inferior). Además, fosfo-AKT se encontró que se reduce y los lisados de tumor HT-29 tratados con la combinación de 30 mg/kg de

2C2-YTE con 75 mg/kg de selumetinib comparado con los tratamientos individuales (**FIGURA 37B**, panel inferior). El tratamiento con selumetinib solo en 75 mg/kg condujo un incremento en fosfo-HER3 en los extractos de tumor LoVo que se previno en tumores tratados con la combinación de 2C2-YTE y selumetinib (**FIGURA 37C**, panel inferior).

5 Resultados similares se observaron en HARA-B (datos no mostrados).

En el cultivo de células los niveles de proteína HER3 se observaron que se incrementan en respuesta al inhibidor MEK a través de la mayoría de los modelos examinados, indicando que la ruta HER3 puede desempeñar una función en la resistencia a los inhibidores MEK. En un número de estudios de modelo de xenoinjerto CRC y LC
10 ortotópico la combinación de 2C2-YTE y selumetinib se observó que incrementa la eficacia antitumoral de cualquier agente solo. Estos datos sustentan el uso de 2C2 en combinación con un inhibidor de MEK similar a selumetinib para aumentar la actividad antitumoral e impedir la resistencia.

15 **4.18. Estudios de Toxicología en Mono Cynomolgus**

4.18.1. Método

Veinte monos cynomolgus machos (*Macaca fascicularis*) se asignaron a cuatro grupos (5 animales por grupo) y un total de cinco dosis de control de vehículo o 2C2-YTE en 10, 30 o 120 mg/kg se administraron. Los animales se dosificaron una vez a
20 la semana por la vía de la infusión IV de 5 minutos en un volumen de dosis de 5 mL/kg. Tres animales por grupo se sometieron a necropsia en el Día 32 (tres días después de la administración de dosis final en el Día 29 de la fase de dosificación) y dos animales por grupo se sometieron a necropsia en el Día 43 de la fase de recuperación (cuarenta y cinco días después de la administración de dosis final en el Día 29 de la fase de
25 dosificación). La estimación de toxicidad se basó en un número de factores que incluyen la mortalidad, observaciones clínicas, pesos corporales, registro de irritación del sitio de dosis, evaluaciones de patología clínicas y anatómicas.

Muestras de plasma de mono cynomolgus se aislaron y se analizaron para los niveles de HER3 soluble (sHER3) utilizando un formato de intercalación anti-HER3
30 con un sistema de detección de electroquimioluminiscencia (ECL) para la cuantificación de sHER3 libre. Placas de 96 cavidades limpias de Descubrimiento de Meso Escala (MSD)

(MSD, número de catálogo L15XA-6/L11XA-6) se recubrieron con 0.5 µg/ml de 2C2-YTE durante la noche a 2 a 8°C y subsecuentemente se bloquearon con el Bloqueador A de MSD (MSD, número de catálogo R93BA-1). El Estándar de Referencia y los Controles de Calidad (QC) y las muestras de prueba no diluidas de plasma de mono cynomolgus se
5 adicionaron a placas bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo anti-hErbB3/HER3 biotinilado (R&D Systems, número de catálogo BAM348) seguido por la adición de Sulfo-TAG (MSD, número de catálogo R32AD-1) dio por resultado la emisión de luz cuando es estimularon electroquímicamente. La señal ECL se capturó y se registró en un MSD de Sector Imager MSD 2400. La cantidad de luz generada directamente se
10 correlacionó con la cantidad de sHER3 en las muestras de plasma de mono cynomolgus. Los datos en bruto (conteos ECL) se exportaron en SOFTmax^R PRO. La curva estándar para los estándares de HER3 humano recombinantes se ajustó utilizando un programa de ajuste de 5 parámetros. Las concentraciones de HER3 de plasma de mono cynomolgus de calcularon en base a la curva estándar utilizando la función estadística de SOFTmax
15 PRO.

Además, se recolectaron muestras de biopsia de piel para el bioanálisis. Brevemente, círculos de 10 mm igualados se dibujan sobre la piel del animal y ~100 µL de PBS o HRG en 0.1 mg/ml se inyectó intradérmicamente en el centro de cada círculo. Aproximadamente 20 minutos después, se recolectó una muestra de piel de cada sitio de
20 inyección y se congeló instantáneamente. Alternativamente, se recolectan muestras de biopsia igualadas (sin inyección intradérmica previa) de cada una y se incuban durante aproximadamente 30 min a temperatura ambiente en el medio de cultivo con o sin 100 µg/mL de HRG seguido por dos lavados con PBS enfriado en hielo. La muestra lavada luego se congela instantáneamente. Los tejidos luego se homogenizaron en tubos Matriz
25 de Lisado A (MP Biomedicals) que contienen solución amortiguadora de lisis RIPA y el cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich) y el cóctel inhibidor de fosfatasa conjunto I y II (EMD-Millipore) utilizando una máquina Fast Prep (MP Biomedicals). Las muestras luego se sometieron a un ciclo de congelación-descongelación y un ciclo de homogenización adicional antes de la clarificación mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 5 minutos
30 a 4°C. Los lisados clarificados se transfirieron a tubos de 1.5 mL nuevos y el contenido de proteína se midió. Los niveles de HER3 total y pHER3 se determinan utilizando un ensayo

de ELISA de intercalación.

4.18.2. Resultados

Un estudio de toxicidad de dosis de repetición, de 1 mes, sin GLP, de 2C2-YTE con una fase de recuperación de seis semanas se realizó en los monos cynomolgus para evaluar la toxicidad y actividad de 2C2-YTE, cuando se administró una vez por semana por medio de una infusión IV a los monos cynomolgus durante por lo menos 1 mes (5 dosis totales) y para estimar la reversibilidad, persistencia u ocurrencia retardada de cualquiera de los efectos después de un período de recuperación de 6 semanas. No se observaron efectos adversos después de la administración IV una vez a la semana (infusión de 5 minutos) de hasta 120 mg/kg/dosis de 2C2-YTE, durante 5 semanas (5 dosis totales), en monos cynomolgus machos.

La habilidad de 2C2-YTE para bloquear pHER3 inducido por HRG en la piel de los monos cynomolgus se confirmó mediante evaluaciones in vivo y ex vivo. La supresión completa del HER3 soluble circulante se observó en todos los animales que reciben 2C2-YTE intravenoso. La estimulación ex vivo de las biopsias de piel con HRG dio por resultado un incremento en la relación de pHER3:tHER3, demostrando que HER3 presente en la piel de los monos cynomolgus se puede activar mediante HRG, el ligando predominante para HER3. La supresión completa de pHER3 inducido por HRG se logró en todos los grupos tratados con 2C2-YTE al final de la fase de dosificación (datos no mostrados). Así, 2C2-YTE bloqueó la fosforilación de HER3 inducido por HRG in vivo y ex vivo en las muestras de biopsia de piel del mono cynomolgus.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la presente se incorporan aquí por referencia en su totalidad como si cada publicación o patente individual fuera específicamente e individualmente indicada que es incorporada por referencia. Además, las Solicitudes Provisionales de los Estados Unidos Nos: 61/563,092 presentada el 23 de noviembre de 2011; 61/656,670 presentada el 7 de junio 2012; y 61/722,558 presentada el 5 de noviembre 2012, se incorporan por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

La descripción precedente de los aspectos específicos de esta manera completamente revelará la naturaleza general de la invención que otros, al aplicar el conocimiento dentro de la habilidad de la técnica, pueden fácilmente modificar y/o adaptar para varias aplicaciones de tales aspectos específicos, sin experimentación indebida, sin apartarse del concepto general de la presente invención. Por lo tanto, tales adaptaciones y modificaciones se proponen para estar dentro del significado e intervalo de equivalentes de los aspectos descritos, en base a la enseñanza y guía presentadas en la presente. Se va entender que la fraseología o terminología en la presente es para el propósito de descripción y no de limitación, tal que la terminología o fraseología de la presente especificación se va a interpretar por la persona experta en vista de las enseñanzas y la guía.

INDICACIONES

1. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a un epítipo dentro del dominio extracelular de HER3,
5 en donde la molécula de unión se une específicamente al mismo epítipo HER3 como un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo caracterizado porque comprende la región variable de cadena pesada (VH) y la región variable de cadena ligera (VL) de CL16 ó 2C2.

2. Como molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3, e inhibe competitivamente la unión de HER3
10 por un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo que comprende el VH y VL de CL16 o 2C2.

3. La molécula de unión o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizada porque el VH y VL de CL16
15 comprenden la SEQ ID NOs: 2 y 1, respectivamente, y la VH y VL de 2C2 comprenden la SEQ ID NOs: 2 y 3, respectivamente.

4. La molécula de unión o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque comprende un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo.

20 5. La molécula de unión o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque la molécula de unión se madura por afinidad.

6. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 caracterizada porque comprende un
25 anticuerpo de VL, en donde el VL comprende la secuencia de aminoácidos:

[FW₁]_{X₁}GSX₂SNIGLNYVS[FW₂]RNNQRPS[FW₃]AAWDDX₃X₄X₅GEX₆[FW₄]

en donde [FW₁], [FW₂], [FW₃] y [FW₄] representan regiones de estructura VL, y en donde

- (a) X₁ representa residuos de aminoácido de la Arginina (R) o Serina (S),
- 30 (b) X₂ representa residuos de aminoácidos Serina (S) o Leucina (L),
- (c) X₃ representa residuos de aminoácidos Serina (S) o Glicina (G),
- (d) X₄ representa residuos de aminoácidos Leucina (L) o Prolina (P),

(e) X_5 representa residuos de aminoácidos Arginina (R), Isoleucina (I), Prolina (P) o Serina (S), y

(f) X_6 representa residuos de aminoácidos Valina (V) o Alanina (A).

7. La molécula o fragmento de unión del mismo de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada porque FW_1 comprende la SEQ ID NO: 40 o 44, FW_2 comprende la SEQ ID NO: 41, FW_3 comprende la SEQ ID NO: 42, y FW_4 comprende la SEQ ID NO: 43.

8. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo la cual se une específicamente a HER3, caracterizada porque comprende un anticuerpo VH, en donde la VH comprende la secuencia de aminoácido:

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

en donde $[FW_5]$, $[FW_6]$, $[FW_7]$ y $[FW_8]$ representa regiones de estructura VH, y en donde X_7 representa residuos de aminoácidos Tirosina (Y), Isoleucina (I) o Valina (V).

9. La molécula o fragmento de unión del mismo de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque FW_5 comprende la SEQ ID NO: 36, FW_6 comprende la SEQ ID NO: 37, FW_7 comprende la SEQ ID NO: 38 y FW_8 comprende la SEQ ID NO: 39.

10. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 caracterizada porque comprende un anticuerpo de VL y un anticuerpo de VH, donde VL comprende la secuencia de aminoácidos:

$[FW_1]X_1GSX_2SNIGLNLYVS[FW_2]RNNQRPS[FW_3]AAWDDX_3X_4X_5GEX_6[FW_4]$

en donde $[FW_1]$, $[FW_2]$, $[FW_3]$ y $[FW_4]$ representan regiones de estructura VL, y en donde

(a) X_1 representa residuos de aminoácido de la Arginina (R) o Serina (S),
 (b) X_2 representa residuos de aminoácidos Serina (S) o Leucina (L),
 (c) X_3 representa residuos de aminoácidos Serina (S) o Glicina (G),
 (d) X_4 representa residuos de aminoácidos Leucina (L) o Prolina (P),
 (e) X_5 representa residuos de aminoácidos Arginina (R), Isoleucina (I), Prolina (P) o Serina (S), y

(f) X_6 representa residuos de aminoácidos Valina (V) o Alanina (A), y en

donde la VH comprende la secuencia de aminoácidos:

[FW₅]YYMQ[FW₆]X₇IGSSGGVTNYADSVKG[FW₇]VGLGDAFDI[FW₈]

en donde [FW₅], [FW₆], [FW₇] y [FW₈] representa regiones de estructura VH, y en donde X₇ representa residuos de aminoácidos Tirosina (Y), Isoleucina (I) o Valina (V).

5 11. La molécula o fragmento de unión del mismo de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque FW₁ comprende la SEQ ID NO: 40 ó 44, FW₂ comprende la SEQ ID NO: 41, FW₃ comprende la SEQ ID NO: 42, FW₄ comprende la SEQ ID NO: 43, FW₅ comprende la SEQ ID NO: 36, FW₆ comprende la SEQ ID NO: 37, FW₇ comprende la SEQ ID NO: 38, y FW₈ comprende la SEQ ID NO: 39.

10 12. La molécula de unión o fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, caracterizada porque comprende un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo.

15 13. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo la cual se une específicamente a HER3 caracterizada porque comprende un anticuerpo de VL, donde VL comprende una región 1 determinante complementaria de VL secuencia de aminoácidos (VL-CDR1) idéntica a, o idéntica excepto para cuatro, tres, dos o una sustituciones de aminoácidos a: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, o SEQ ID NO: 20.

20 14. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 caracterizada porque comprende un anticuerpo de VL, donde VL comprende una región 2 determinante complementaria de VL-2 secuencia de aminoácidos (VL-CDR2) idéntica a, o idéntica excepto para cuatro, tres, dos o una sustituciones de aminoácidos en la SEQ ID NO: 21.

25 15. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 caracterizada porque comprende un anticuerpo de VL, en donde VL comprende una región 3 determinante complementaria de secuencia de aminoácidos (VL-CDR3) idéntica a, o idéntica excepto para cuatro, tres, dos, o uno sustituciones de aminoácidos a: SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, o SEQ ID NO: 30.

30 16. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo el cual se une específicamente a HER3 caracterizada porque comprende un

anticuerpo VH, en donde VH comprende una región 1 determinante complementaria secuencia de aminoácidos (VH-CDR1) idéntica a, o idéntica excepto para cuatro, tres, dos, o unas sustituciones de aminoácidos en la SEQ ID NO: 31.

17. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 caracterizada porque comprende un anticuerpo VH, en donde VH comprende una región 2 determinante complementaria secuencia de aminoácidos (VH-CDR2) idéntica a, o idéntica excepto para cuatro, tres, dos, o una sustituciones de aminoácidos a: SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, o SEQ ID NO: 34.

18. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo el cual se une específicamente a HER3 caracterizada porque comprende un anticuerpo VH, en donde VH comprende una región 3 determinante complementaria (VH-CDR3) de secuencia de aminoácidos idéntica a, o idéntica excepto para cuatro, tres, dos, o una sustituciones de aminoácidos en la SEQ ID NO: 35.

19. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo el cual se une específicamente a HER3 caracterizada porque comprende un anticuerpo de VL, en donde VL comprende secuencias de aminoácidos VL-CDR1, VL-CDR2, y VL-CDR3 idénticas a, o idénticas a excepción de cuatro, tres, dos, o una sustituciones de aminoácidos en una o más de la VL-CDRS a: SEQ ID NOS: 18, 21 y 22, SEQ ID NOS: 18, 21, y 26, SEQ ID NOS: 18, 21, y 27, SEQ ID NOS: 20, 21, y 22, SEQ ID NOS: 19, 21, y 22, SEQ ID NOS: 18, 21, y 25, SEQ ID NOS: 18, 21, y 28, SEQ ID NOS: 18, 21, y 29, SEQ ID NOS: 18, 21, y 30, SEQ ID NOS: 18, 21, y 23, SEQ ID NOS: 19, 21, y 23, SEQ ID NOS: 20, 21, y 23, SEQ ID NOS: 18, 21, y 24, o SEQ ID NOS: 18, 21, y 25, respectivamente.

20. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo el cual se une específicamente a HER3 caracterizada porque comprende un anticuerpo VH, en donde VH comprende secuencias de aminoácidos VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 idénticas a, o idénticas a excepción de cuatro, tres, dos, o una sustituciones de aminoácidos en uno o más de los VH-CDRS a: la SEQ ID NOS: 31, 32 y 35, SEQ ID NOS: 31, 33, y 35, o SEQ ID NOS: 31, 34, y 35, respectivamente.

21. La molécula de unión de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 13 a 20, caracterizada porque la molécula o fragmento de unión del mismo comprende un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo.

22. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígeno del mismo el cual se une específicamente a HER3 caracterizada porque comprende una VL y una VH que comprende secuencias de aminoácidos de VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2-y VH-CDR3 idénticas o idénticas a excepción de cuatro, tres, dos, una o sustituciones de aminoácidos en una o más de las CDR en: la SEQ ID NOs: 18, 21, 22, 31, 32, y 35, SEQ ID NOs: 18, 21, 26, 31, 32 y 35, SEQ ID NOs: 18, 21, 27, 31, 32 y 35, SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 31, 32 y 35, SEQ ID NOs: 21, 22, 31, 32 y 35, SEQ ID NOs: 18, 21, 25, 31, 32 y 35, SEQ ID NOs: 18, 28, 31, 32 y 35, SEQ ID NOs: 18, 21, 29, 31, 32 y 35, SEQ ID NOs: 18, 21, 31, 32 y 35, SEQ ID NOs: 18, 21, 23, 31, 32 y 35, SEQ ID NOs: 19, 21, 23, 32 y 35, SEQ ID NOs: 20, 21, 23, 31, 32 y 35, SEQ ID NOs: 18, 21, 24, 31, 32 y 35, o SEQ ID NOs: 18, 21, 25, 31, 32 y 35, respectivamente.

23. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo el cual se une específicamente a HER3 caracterizada porque comprende un anticuerpo de VL y un anticuerpo VH, en donde VL comprende una secuencia de aminoácidos al menos alrededor de 90% a alrededor de 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17.

24. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a HER3 caracterizada porque comprende un anticuerpo de VL y un anticuerpo VH, en donde VH comprende una secuencia de aminoácidos al menos alrededor de 90% a alrededor de 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.

25. La molécula de unión o fragmento del mismo de conformidad con la reivindicación 23 o la reivindicación 24, caracterizada porque comprende un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo.

26. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígeno del mismo el

cual se une específicamente a HER3, caracterizado porque el fragmento de unión a anticuerpo o antígeno comprende una VL que comprende una secuencia de al menos alrededor de 90% a alrededor de 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17, y en donde el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno comprende una VH que comprende una secuencia de al menos alrededor de 90% a alrededor de 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.

27. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígeno del mismo, caracterizado porque comprende una VL que comprende la secuencia de consenso VL proporcionada en la Tabla 4 y una VH que comprende la secuencia de consenso de VH proporcionada en la Tabla 4.

28. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígeno del mismo, caracterizada porque comprende una VL que comprende la SEQ ID NO: 3 y una VH que comprende la SEQ ID NO: 2.

29. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, o 25-28, caracterizado porque comprende una región constante de cadena pesada o fragmento del mismo.

30. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con la reivindicación 29, caracterizada porque la región constante de cadena pesada o fragmento del mismo es una región constante de IgG.

31. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque la región constante de IgG se selecciona de una región constante de IgG1, una región constante de IgG2, una región constante de IgG3 y una región constante de IgG4.

32. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque la región constante de IgG es una región constante de IgG1.

33. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de

conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, o 25-32, caracterizada porque comprende una región constante de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste de una región constante kappa humana y una región constante lambda humana.

34. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30-32, caracterizado porque el dominio constante de IgG comprende uno o más sustituciones de aminoácidos con relación a un dominio constante de IgG de tipo silvestre en donde la IgG modificada tiene una vida media incrementada en comparación con la vida media de una IgG que tiene el dominio constante de IgG de tipo silvestre.

35. El anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígeno de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el dominio constante de IgG comprende una o más sustituciones de aminoácidos de los residuos de aminoácidos en las posiciones 251-257, 285-290, 308-314, 385-389, y 428-436, en donde la numeración es de acuerdo al índice de EU como se establece en Kabat.

36. El anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígeno de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque al menos una sustitución de aminoácidos del dominio constante de IgG se selecciona del grupo que consiste de:

(a) sustitución del aminoácido en la posición 252 con Tirosina (Y), Fenilalanina (F), Triptófano (W), o Treonina (T),

(b) sustitución del aminoácido en la posición 254 con la Treonina (T),

(c) sustitución del aminoácido en la posición 256 con Serina (S), Arginina (R), Glutamina (Q), Ácido glutámico (E), Ácido aspártico (D), o Treonina (T),

(d) sustitución del aminoácido en la posición 257 con Leucina (L),

(e) sustitución del aminoácido en la posición 309 con Prolina (P),

(f) sustitución del aminoácido en la posición 311 con Serina (S),

(g) sustitución del aminoácido en la posición 428 con Treonina (T), Leucina (L), Fenilalanina (F), o Serina (S),

(h) sustitución del aminoácido en la posición 433 con Arginina (R), Serina (S), Isoleucina (I), Prolina (P), o Glutamina (Q),

(i) sustitución del aminoácido en la posición 434 con Triptófano (W), Metionina (M), Serina (S), Histidina (H), Fenilalanina (F), o Tirosina, y

(j) una combinación de dos o más de tales sustituciones,
en donde la numeración es de acuerdo al índice de EU como se establece
en Kabat.

37. El anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígeno de conformidad
5 con la reivindicación 36, caracterizado porque el dominio constante de IgG humana
comprende sustituciones de aminoácidos con relación a un dominio constante de IgG
humana de tipo silvestre en las posiciones 252, 254, y 256, en donde

(a) el aminoácido en la posición 252 se sustituye con Tirosina (Y),
(b) el aminoácido en la posición 254 se sustituye por Treonina (T), y
10 (c) el aminoácido en la posición 256 se sustituye con Ácido glutámico (E),
en donde la numeración es de acuerdo al índice de EU como se establece
en Kabat.

38. El anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígeno de conformidad
con la reivindicación 37, caracterizado porque el aminoácido en la posición 434 se
15 sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Triptófano (W),
Metionina (M), Tirosina (Y), y Serina (S), y en donde la numeración es de acuerdo al
índice de EU como se establece en Kabat.

39. El anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígeno de conformidad
con la reivindicación 38, caracterizado porque el aminoácido en la posición 428 se
20 sustituye con un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en Treonina (T),
Leucina (L), Fenilalanina (F), y Serina (S), y en donde la numeración es de acuerdo al
índice de EU como se establece en Kabat.

40. El anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígeno de conformidad
con la reivindicación 38, caracterizado porque el aminoácido en la posición 257 se
25 sustituye con Leucina (L), y el aminoácido en la posición 434 de Kabat se sustituye con
Tirosina (Y), y en donde la numeración es de acuerdo con la índice de EU, establecido en
Kabat.

41. El anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígeno de conformidad
con la reivindicación 39, caracterizado porque el aminoácido en la posición 428 de Kabat
30 se sustituye con leucina (L), y el aminoácido en la posición de Kabat 434 se sustituye con
serina (S).

42. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo el cual se une específicamente a un epítipo dentro del dominio extracelular de HER3, caracterizado porque comprende un anticuerpo de VL de la SEQ ID NO: 3, un anticuerpo VH de la SEQ ID NO: 2, y una región constante de IgG1 de la SEQ ID 46.

5 43. Una molécula de unión aislada o fragmento de unión de antígeno del mismo el cual se une específicamente a un epítipo dentro del dominio extracelular de HER3, caracterizada porque consiste de un anticuerpo de VL de la SEQ ID NO: 3, un anticuerpo VH de la SEQ ID NO: 2, y una región constante de IgG1 de la SEQ ID 46.

10 44. El anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígeno de conformidad con la reivindicación 29 o la reivindicación 30, caracterizada porque la región constante de IgG humana, comprende sustituciones de aminoácidos con relación a un dominio constante de IgG humana de tipo silvestre en las posiciones 252, 254, y 256, la numeración es de acuerdo con la índice de EU como se establece en Kabat, y en donde

- 15 (a) el aminoácido en la posición 252 se sustituye con Tirosina (Y),
 (b) el aminoácido en la posición 254 se sustituye por Treonina (T), y
 (c) el aminoácido en la posición 256 se sustituye con Ácido glutámico (E).

20 45. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, o 25-44, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo multiespecífico, o un fragmento de unión de antígeno del mismo.

25 46. El fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, o 25-45, caracterizado porque es Fv, Fab, F (ab')₂, Fab', dsFv, scFv, y sc(Fv)₂.

 47. El anticuerpo o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, o 25-46, caracterizado porque está conjugado con al menos un agente heterólogo.

30 48. Una composición caracterizada porque comprende el anticuerpo o un fragmento del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, o 25-47, y un portador.

49. Un ácido nucleico caracterizado porque comprende una secuencia que codifica el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, o 25-48.

50. Una composición caracterizada porque comprende un ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 49.

51. Un vector caracterizado porque comprende un ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 49.

52. Una célula huésped caracterizada porque comprende una secuencia de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 49, la composición de conformidad con la reivindicación 50, o el vector de conformidad con la reivindicación 51.

53. Un método de hacer el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, o 25-46, caracterizada porque comprende (a) cultivar la célula de conformidad con la reivindicación 46; y (b) aislar el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo.

54. La composición de conformidad con la reivindicación 48, caracterizada porque comprende además un agente anticancerígeno.

55. Un reactivo de diagnóstico caracterizado porque comprende el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, o 25-47 el cual está etiquetado.

56. Un kit caracterizado porque comprende el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, o 25-47, o la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 48 ó 54.

57. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, o 25-47, caracterizado porque no induce la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

58. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque no induce la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) en células BT-474, células SKBR3, o una combinación de los mismos.

59. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, 57 ó 52, caracterizado porque es un antagonista de HER3.

60. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado porque es un antagonista de HER3 en las células seleccionadas del grupo que consiste de células BT-474, células SKBR3, células MDA-MB-175, células MDA-MB-361, células A549, células HARA-B, células HMCB, células HCC827, células MCF-7, células MKN45, células Kato III, células HCC827 resistentes a gefitinib, o una combinación de dos o más de las células citadas.

61. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 59 ó 60, caracterizado porque el HER3 es HER3 humana.

62. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47 ó 57-61, caracterizado porque la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno a HER3 puede reducir la proliferación celular.

63. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno a HER3 puede reducir la proliferación celular en células BT-474, células MDA-MB-175, células MDA-MB-361, células HMCB, o una combinación de dos o más de las células citadas.

64. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-63, caracterizado porque la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno a HER3 puede reducir la transducción de la señal mediada por HER3.

65. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con la reivindicación 64, caracterizado porque la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno a HER3 puede reducir la transducción de señales mediada por HER3 en las células seleccionadas del grupo que consiste de células BT-474, células SKBR3, células MDA-MB-175, células MDA-MB-361, células A549, células HARA-B, células HMCB, células HCC827, células MCF-7, células MKN45, células Kato III, células HCC827 resistente a gefitinib, o una combinación de dos o más de las células citadas.

66. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47 ó 57-65, caracterizado porque la

unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno a HER3 puede reducir la fosforilación de HER3 dependiente del ligando.

67. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno a HER3 puede reducir la fosforilación de HER3 dependiente del ligando en células MCF-7, células HMCB, células HCC827, células MKN45, células Kato III, o una combinación de dos o más de las células citadas.

68. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 66 ó 67, caracterizado porque la fosforilación HER3 dependiente de ligando es activado por HRG, activado por EGFR, activado por cMET, o activado por FGFR2, o una combinación de los mismos.

69. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47 ó 57-68, caracterizado porque la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno a HER3 puede reducir la fosforilación dependiente del ligando de la proteína cinasa Akt.

70. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con la reivindicación 69, caracterizado porque la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno a HER3 puede reducir la fosforilación dependiente del ligando de la proteína cinasa Akt en las células A549, células HMCB, células MKN45, células Kato III, o una combinación de dos o más de las células citadas.

71. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69 ó 70, caracterizado porque la fosforilación de Akt dependiente del ligando es activada por cMET, activada por FGFR2, o ambas.

72. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47 ó 57-71, caracterizado porque la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno a HER3 puede reducir la fosforilación HER3 o AKT independiente del ligando.

73. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con la reivindicación 72, caracterizado porque la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno a HER3 puede reducir la fosforilación de AKT independiente del ligando, la fosforilación de HER3, o ambas, en células BT-474.

74. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47 ó 57-73, caracterizado porque la fosforilación de unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno a HER3 puede reducir a HER3 en las células resistentes a Inhibidores de Tirosina Cinasa (TKI) dirigidos a EGFR.

75. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con la reivindicación 74, caracterizado porque la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno a HER3 puede reducir la fosforilación de HER3 en las células resistentes a los inhibidores de tirosina cinasa (TKI) dirigidos a EGFR en células HCC827 resistentes a gefitinib.

76. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47 ó 57-75, caracterizado porque el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno se pueden unir a HER3 humano, mono cynomolgus HER3, y ratón de HER3.

77. Un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa HER3 caracterizado porque comprende poner en contacto la célula con el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 25-47, o 57-76.

78. Un método de tratamiento de cáncer en un sujeto, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76.

79. El método de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de mama, y cáncer de cabeza y cuello.

80. El método de conformidad con la reivindicación 79, caracterizado porque el cáncer comprende células que comprenden una mutación KRAS.

81. El método de conformidad con la reivindicación 80, caracterizado porque la mutación KRAS comprende una mutación del codón 12 de un gen KRAS humano.

82. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 78-81,

caracterizado porque el sujeto es un humano.

83. Un método de tratamiento de cáncer en un sujeto caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un primer agente que es el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de las
5 reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de un segundo agente, que es un agente anti-cáncer diferente al primer agente.

84. El método de conformidad con la reivindicación 83, caracterizado porque la combinación del primer agente y el segundo agente es efectiva de manera
10 sinérgica.

85. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 83 u 84, caracterizado porque el segundo agente es un inhibidor de EGFR, un inhibidor de HER2, un inhibidor de HER3 o un inhibidor de MEK.

86. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 83-85,
15 caracterizado porque el segundo agente comprende un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo.

87. El método de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado porque el segundo agente se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

20 88. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 83-87, caracterizado porque el segundo agente es cetuximab, panitumumab, matuzumab o nimotuzumab.

89. El método de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado porque el segundo agente se une específicamente a HER2.

25 90. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 83-87 y 89, caracterizado porque el segundo agente es trastuzumab, emtansina de trastuzumab, pertuzumab, MM-111 o pertuzumab.

91. El método de conformidad con la reivindicación 85, caracterizado porque se selecciona del grupo que consiste de gefitinib, canertinib, lapatinib, erlotinib,
30 afatinib, neratinib, selumetinib, WX-554, selumetinib, trametinib, refametinib, E-6201 y MEK-162.

92. Un método para inhibir el crecimiento de una célula resistente a los inhibidores de tirosina cinasa, caracterizado porque comprende poner en contacto la célula con una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47 ó 57-75.

93. Un método de tratamiento resistente a los inhibidores de la tirosina cinasa en un sujeto, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47 ó 57-75.

94. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 92 ó 93, caracterizado porque los inhibidores de la tirosina cinasa se dirigen a EGFR o HER2.

95. Un método para inhibir el cultivo de una célula resistente a los inhibidores de la cinasa de treonina, caracterizado porque comprende poner en contacto la célula con una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47 ó 57-75.

96. Un método de tratamiento de la resistencia a un inhibidor de treonina en un sujeto, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47 ó 57-75.

97. El método de conformidad con las reivindicaciones 95 ó 96, caracterizado porque los inhibidores de la cinasa de treonina se dirigen a MEK.

98. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, que pueden unirse específicamente a un polipéptido HER3 o fragmento del mismo con una afinidad caracterizada por una constante de disociación (K_D) de alrededor de 0.45 nM (+/- 0.05 nM) o mejor como se mide por un ensayo de resonancia de plasmón de superficie Biacore™ en donde el anticuerpo o fragmento de unión del mismo antígeno está unido al chip de Biacore™.

99. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, que

puede unirse específicamente a un polipéptido HER3 o fragmento del mismo con una afinidad caracterizada por una constante de disociación (K_D) de alrededor de 0.1 nM o mejor como se mide por un ensayo de resonancia de plasmón de superficie Biacore™ en donde el polipéptido HER3 o fragmento del mismo está unido al chip de Biacore™.

5 100. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, que puede unirse específicamente a un polipéptido HER3 o fragmento del mismo con una afinidad caracterizada por una K_{on} de entre $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y/o un K_{off} de entre $0.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $2.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ como se mide por un ensayo de resonancia de plasmón de
10 superficie Biacore™ en donde el anticuerpo o la unión al antígeno o fragmento del mismo se enlazan al chip de Biacore™

101. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, caracterizado porque puede suprimir específicamente la fosforilación de HER3 en células
15 de MCF-7 activadas por HRG con una IC_{50} de alrededor de 30 ng/mL o mejor como se mide por ELISA.

102. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, caracterizado porque puede suprimir específicamente la fosforilación de HER3 en células
20 de MCF-7 activadas por HRG con una IC_{50} de alrededor de 10 ng/mL o mejor como se mide por ELISA.

103. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, caracterizado porque pueden suprimir específicamente el crecimiento de células en
25 células MDAMB-175 con una IC_{50} de alrededor de 0.90 µg/mL o mejor.

104. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, caracterizado porque pueden suprimir específicamente el crecimiento de células en
células MDAMB-175 con una IC_{50} de alrededor de 0.15 µg/mL o mejor.

30 105. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76,

caracterizado porque puede suprimir específicamente el crecimiento celular en células HMCB con una IC₅₀ de alrededor de 0.2 µg/mL o mejor.

106. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76,
5 caracterizado porque puede suprimir específicamente el crecimiento celular en células HMCB con una IC₅₀ de alrededor de 0.03 µg/mL o mejor.

107. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, caracterizado porque puede suprimir específicamente la fosforilación de HER3 en células
10 HCC827 con una IC₅₀ de alrededor de 20 ng/mL o mejor.

108. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, caracterizado porque puede suprimir específicamente la fosforilación de HER3 en células HCC827 con una IC₅₀ de alrededor de 2 ng/mL o mejor.

109. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, caracterizado porque puede suprimir específicamente la fosforilación de HER3 en las células HCC827 resistentes al inhibidor de la tirosina cinasa con una IC₅₀ de alrededor de 25 ng/mL o mejor.

110. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, que pueden suprimir específicamente la fosforilación de HER3 en las células HCC827 resistentes al inhibidor de la tirosina cinasa con una IC₅₀ de alrededor de 5 ng/mL o mejor.

111. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, caracterizado porque puede suprimir específicamente la fosforilación de HER3 en células MKN45 con una IC₅₀ de alrededor de 10 ng/mL o mejor.

112. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76,
30 caracterizado porque puede suprimir específicamente la fosforilación de HER3 en células MKN45 con una IC₅₀ de alrededor de 5 ng/mL o mejor.

113. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, caracterizado porque pueden suprimir específicamente células pAKT en MKN45 con una IC_{50} de alrededor de 10 ng/mL o mejor.
- 5 114. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, caracterizado porque pueden suprimir específicamente células pAKT en MKN45 con una IC_{50} de alrededor de 5 ng/mL o mejor.
- 10 115. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, caracterizado porque puede suprimir específicamente células pHER en Kato III con una IC_{50} de alrededor de 8 ng/mL o mejor.
- 15 116. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, caracterizado porque puede suprimir específicamente células pHER en Kato III con una IC_{50} de alrededor de 1 ng/mL o mejor.
- 20 117. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 12, 21, 22, 25-47, o 57-76, caracterizado porque puede suprimir específicamente células pAKT en Kato III con una IC_{50} de alrededor de 5 ng/mL o mejor.
- 25 118. El anticuerpo o fragmento de unión de antígeno del mismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 21, 22, 25-47, o 57-76, caracterizado porque puede suprimir específicamente células pAKT en Kato III con una IC_{50} de alrededor de 1 ng/mL o mejor.
119. El método ex-vivo que determina el nivel de actividad de HER3 que comprende determinar el nivel de HER3 fosforilado en una biopsia de piel de un sujeto, caracterizado porque la piel se trata con HRG antes o después de la biopsia.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmento de unión de antígeno de los mismos que se unen al dominio extracelular del receptor HER3 e inhiben

5 diversas funciones relacionadas con los receptores de HER3 mediante mecanismos dependientes de ligando y/o independiente de ligando. También se proporcionan composiciones con vida media incrementada. Además, la invención proporciona composiciones y métodos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades asociadas con la transducción de señal mediada por HER3.