CONJUGADO ANTICUERPO ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO HUMANO 3 (ANTI-HER3-FÁRMACO)

CAMPO DE LA INVENCIÓN

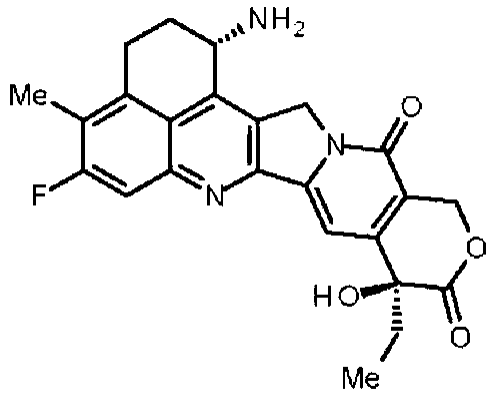
La presente invención se refiere a un conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene un anticuerpo anti-HER3 y un fármaco antitumoral conjugados entre sí mediante una porción de estructura enlazadora, el conjugado siendo útil como un fármaco antitumoral.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que tiene un fármaco con citotoxicidad conjugado con un anticuerpo que se une a un antígeno expresado sobre una superficie de células de cáncer y capaz de internalización celular (el anticuerpo que se une al antígeno también es capaz de internalización celular), puede suministrar el fármaco de forma selectiva a las células cancerosas y por lo tanto se espera que cause la acumulación del fármaco en las células cancerosas y mate las células cancerosas (véanse literaturas no de patente 1 a 3). Como un ADC, Milotarg (marca registrada; Gemtuzumab ozogamicina) en el que caliqueamicina se conjuga con un anticuerpo anti-CD33 está aprobado como agente terapéutico para la leucemia mieloide aguda. Además, Adcetris (marca registrada; Brentuximab vedotin), en el que auristatina E se conjuga con un anticuerpo anti-CD30, ha sido aprobado

recientemente como un agente terapéutico para el linfoma de Hodgkin y el linfoma anaplásico de células grandes (véase literatura no de patente 4). Los medicamentos contenidos en los ADCs que han sido aprobados hasta ahora se dirigen a ADN o tubulina.

Como antitumorales, se conocen compuestos de bajo peso molecular, derivados de camptotecina, que inhiben topoisomerasa I para exhibir un efecto antitumoral. Entre ellos, un compuesto antitumoral representado por la siguiente fórmula (exatecano, nombre químico: (1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-diona) es un derivado soluble en agua de camptotecina (literatura de patente 1 y 2).



A diferencia de irinotecano que se usa actualmente en el ámbito clínico, este compuesto no requiere activación por una enzima para ejercer su efecto antitumoral. Además, en comparación con SN-38 como ingrediente farmacéuticamente

activo principal de irinotecano y topotecano que también se usan en el ámbito clínico, tiene una mayor actividad inhibidora de la topoisomerasa I y tiene una mayor actividad citocida *in vitro* contra varias células cancerosas. En particular, presenta el efecto contra células cancerosas que tienen resistencia a SN-38 o similar debido a la expresión de P-glicoproteína. Además, en un modelo de ratón con un tumor humano trasplantado por vía subcutánea, exhibió un potente efecto antitumoral, y por lo tanto ha sido objeto de estudios clínicos, pero no se ha puesto en el mercado todavía (véanse literaturas no de patente 5 a 10). Aún no está claro si exatecano funciona efectivamente o no como un ADC.

DE-310 es un complejo en el que exatecano es conjugado a un polímero de polialcohol carboximetildextrano biodegradable a través de un separador de péptido GGFG (literatura de patente 3). Al hacer al exatecano en una forma de un profármaco de polímero, puede mantenerse una alta propiedad de retención en la sangre y también una alta propiedad de penetración de un área del tumor se incrementa de forma pasiva al utilizar la mayor permeabilidad de los vasos del tumor recién formados y la propiedad de retención en los tejidos tumorales. Con DE-310, el separador de péptido es escindido por una enzima para liberar continuamente exatecano como un ingrediente activo principal y exatecano con glicina unido a un grupo amino, y como

resultado, se mejora la farmacocinética. Según varios modelos de evaluación de tumor en estudios no clínicos, se encontró que una mayor eficacia fue obtenida por DE-310 que con exatecano administrado solo a pesar de que la cantidad total de exatecano contenida en el mismo es menor que en el caso de la administración de exatecano solo. Un estudio clínico se llevó a cabo para DE-310, y se confirmaron casos efectivos. También hay un informe que sugiere que el ingrediente activo principal se acumula en un tumor que en los tejidos normales. Sin embargo, también existe un informe que indica que la acumulación de DE-310 y el principal ingrediente activo en un tumor no es muy diferente de la acumulación en los tejidos normales, y por lo tanto no se observa direccionamiento pasivo en seres humanos (véanse literaturas no de patente 11 a 14). Como resultado de ello, DE-310 tanpoco fue comercializado, y no queda claro si el exatecano efectivamente funciona o no como un fármaco orientado a tal direccionamiento.

Como un compuesto relacionado con DE-310, también se conoce un complejo en el que una porción de estructura representada por -NH-$(CH_2)_4$-C(=O)- se inserta entre -GGFG- separador y exatecano para formar -GGFG-NH-$(CH_2)_4$-C(=O)- usado como una estructura separadora (literatura de patente 4). Sin embargo, el efecto antitumoral del complejo no se conoce en absoluto.

El receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 3 (también conocido como HER3 y ErbB3) es una proteína tirosina cinasa receptora y pertenece al subfamilia receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de proteínas tirosina cinasa receptoras, que también incluyen HER1 (también conocido como EGFR), HER2 y HER4 (ver literaturas no de patente 15 a 17). Al igual que con el receptor del factor de crecimiento epidérmico prototípico, el receptor de transmembrana HER3 consiste en un dominio de unión a ligando extracelular (ECD), un dominio de dimerización en el ECD, un dominio de transmembrana, y un dominio de fosforilación carboxilo-terminal. HER1, HER2 y HER4 portan un dominio de proteína tirosina cinasa (TKD) intracelular además de estos dominios, mientras que HER3 carece de este dominio y por lo tanto incapaz de ser autofosforilado.

El ligando heregulina (HRG) se une al dominio extracelular de HER3 y activa la vía de señalización mediada por receptor al promover la dimerización con otros miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER) y transfosforilación de su dominio intracelular. La formación de dímeros de HER3 con otros miembros de la familia HER expande el potencial de señalización de HER3 y sirve como un medio no sólo para la diversificación de señales, pero también para la amplificación de señales. Por ejemplo, el heterodímero

HER2/HER3 induce una de las señales mitogénicas más importantes entre los miembros de su familia. HER3 es sobreexpresado en varios tipos de cánceres como los cánceres de mama, gastrointestinal y de páncreas. Curiosamente, se ha demostrado una correlación entre la expresión de HER2/HER3 y la progresión de una etapa no invasiva a una etapa invasiva (véanse literaturas no de patente 18 a 20). Por consiguiente, son deseables agentes que interfieran con la señalización mediada por HER3. Anticuerpos anti-HER3 e inmunoconjugados de los mismos han sido reportados en, por ejemplo, las literaturas de patente 5 a 10, respectivamente.

Lista de citas

Literatura de patentes

PTL 1 patente japonesa abierta a inspección pública No. 5-59061

PTL 2 patente japonesa abierta a inspección pública No. 8-337584

PTL 3 Publicación Internacional No. WO 1997/46260

PTL 4 Publicación Internacional No. WO 2000/25825

PTL 5 Patente de E.U.A. No. 5.968.511

PTL 6 Patente de E.U.A. No. 5.480.968

PTL 7 Publicación Internacional No. WO 2003/013602

PTL 8 Publicación Internacional No. WO 2007/077028

PTL 9 Publicación Internacional No. WO 2008/100624

PTL 10 Publicación Internacional No. WO 2012/019024

Literatura no patente

NPL 1 Ducry, L., et al., Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13.

NPL 2 Alley, S. C., et al., Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.

NPL 3 Damle N. K. Expert Opin. Biol. Ter. (2004) 4, 1445-1452.

NPL 4 Senter P. D., et al., Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637.

NPL 5 Kumazawa, E., Tohgo, A., Exp. Opin. Invest. Drugs (1998) 7, 625-632.

NPL 6 Mitsui, I., et al., Jpn J. Cancer Res. (1995) 86, 776-786.

NPL 7 Takiguchi, S., et al., Jpn J. Cancer Res. (1997) 88, 760-769.

NPL 8 Joto, N. et al., Int J Cancer (1997) 72, 680-686.

NPL 9 Kumazawa, E. et al., Cancer Chemoter. Pharmacol. (1998) 42, 210-220.

NPL 10 De Jager, R., et al., Ann N Y Acad Sci (2000) 922, 260-273.

NPL 11 Inoue, K. et al. Polymer Drugs in the Clinical Stage, editado por Maeda et al., (2003) 145-153.

NPL 12 Kumazawa, E. et al., Cancer Sci (2004) 95, 168-175.

NPL 13 Soepenberg, O. et al., Clinical Cancer Research, (2005) 11, 703-711.

NPL 14 Wente M. N. et al., Investigational New Drugs (2005) 23, 339-347.

NPL 15 Plowman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1990) 87, 4905-4909.

NPL 16 Kraus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1989) 86, 9193-9197.

NPL 17 Kraus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1993) 90, 2900-2094.

NPL 18 Alimandi et al., Oncogene (1995) 10, 1813-1821.

NPL 19 DeFazio et al., Int. J. Cancer (2000) 87, 487-498.

NPL 20 Nadiu et al., Br. J. Cancer (1998) 78, 1385-1390.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Problema técnico

Con respecto al tratamiento de tumores usando un anticuerpo, un efecto antitumoral insuficiente puede observarse incluso cuando el anticuerpo reconoce un antígeno y se une a las células tumorales, y por lo tanto a veces se necesita un anticuerpo antitumoral más eficaz. Además, muchos compuestos antitumorales de bajo peso molecular tienen un problema en la seguridad como efecto secundario y

toxicidad incluso cuando los compuestos tienen un excelente efecto antitumoral. Así, sigue siendo un objetivo lograr un efecto terapéutico superior al aumentar aún más la seguridad. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un fármaco antitumoral que tenga un excelente efecto terapéutico, que sea excelente en términos de efecto antitumoral y seguridad.

Solución al problema

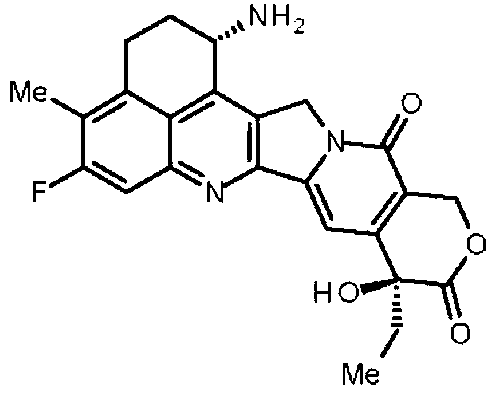
Los inventores pensaron que, puesto que el anticuerpo anti-HER3 es un anticuerpo capaz de dirigirse a las células tumorales, es decir, es un anticuerpo que tiene una propiedad de reconocer las células tumorales, una propiedad de unirse a las células tumorales, una propiedad de internalización en las células tumorales, una actividad citocida contra células tumorales, o similares, cuando exatecano como un compuesto antitumoral se convierte en un conjugado anticuerpo-fármaco por conjugación al anticuerpo a través de una porción de estructura enlazadora, el compuesto antitumoral puede ser suministrado en forma más segura a las células tumorales para exhibir específicamente el efecto antitumoral del compuesto en las células tumorales, y por lo tanto el efecto antitumoral puede ser exhibidor en forma segura y también se espera un efecto citocida mejorado del anticuerpo anti-HER3, y una dosis del compuesto antitumoral puede reducirse en comparación con un caso de la

administración del compuesto solo, y por lo tanto una influencia del compuesto antitumoral en las células normales se pueden aliviar de manera que una mayor seguridad se puede lograr.

En relación con esto, los inventores crearon un enlazador con una estructura específica y tuvieron éxito en la obtención de un conjugado anticuerpo-fármaco en donde el anticuerpo anti-HER3 y exatecano se conjugan entre sí a través del enlazador, y confirmaron un excelente efecto antitumoral exhibido por el conjugado para completar de este modo la presente invención.

Específicamente, la presente invención se refiere a lo siguiente.

1. Un conjugado anticuerpo-fármaco en el que un compuesto antitumoral representado por la siguiente fórmula



se conjuga con un anticuerpo anti-HER3 por un enlace tioéter que se forma en una porción de enlace de disulfuro presente en una parte de bisagra del anticuerpo anti-HER3 través de un enlazador que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ o $-L^1-L^2-L^P-$.

Aquí, el anticuerpo anti-HER3 está conectado a la terminal de L^1, el compuesto antitumoral se conecta al grupo carbonilo de la porción $-(CH_2)n^2-C(=O)-$ o la C-terminal de L^P, con el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 como una posición de conexión.

En la fórmula, n^1 representa un número entero de 0 a 6,

n^2 representa un número entero de 0 a 5,

L^1 representa $-(Succinimid-3-il-N)-(CH_2)n^3-C(=O)-$,

en donde n^3 representa un número entero de 2 a 8,

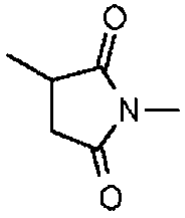
L^2 representa $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$ o un enlace sencillo,

en donde n^4 representa un número entero de 1 a 6,

L^P representa un residuo péptido que consiste en 2 a 7 aminoácidos,

L^a representa -O- o un enlace sencillo,

-(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



que está conectada al anticuerpo anti-HER3 en la posición 3 del mismo y está conectada en el átomo de nitrógeno en la posición 1 a un grupo metileno en la estructura enlazadora que contiene esta estructura.

La presente invención se refiere además a cada uno de los siguientes.

2. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 1, en donde el residuo péptido de L^P es un residuo péptido que comprende un aminoácido seleccionado de fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico.

3. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 1 ó 2, en donde L^P es un residuo péptido seleccionado del siguiente grupo

-GGF-,

-DGGF-,

-(D-)D-GGF-,

-EGGF-,

-GGFG-,

-SGGF-,

-KGGF-,

-DGGFG-,

-GGFGG-,

-DDGGFG-,

-KDGGFG-, y

-GGFGGGF-;

(en donde, "(D-)D" representa ácido D-aspártico).

4. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 1 ó 2, en donde L^P es un residuo péptido que comprende 4 ó 5

aminoácidos.

5. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 1 a 4, en donde L^P es -GGFG- o -DGGFG-.

6. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 1 a 4, en donde L^P es -GGFG-.

7. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 1 a 6, en donde n^3 es un número entero de 2 a 5 y L^2 es un enlace sencillo.

8. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 1 a 7, en donde el enlazador es $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$.

9. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 8, en donde n^3 es un número entero de 2 a 5, L^2 es $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$, y n^4 es 2 ó 4.

10. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 8 ó 9, en donde $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ es una estructura parcial que tiene una longitud de cadena de 4 a 7 átomos.

11. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 8 ó 9, en donde $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ es una estructura parcial que tiene una longitud de cadena de 5 ó 6 átomos.

12. El conjugado anticuerpo-fármaco descrito en 10 ó 11, en donde $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ es

$-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$,

$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,

-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-, o

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-.

13. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 12, en donde -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)- es cualquiera de los siguientes:

-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-, o

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-.

14. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 1 a 5, en donde el enlazador es -L^1-L^2-L^P-.

15. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 14, en donde L^P es -DGGFG-.

16. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 15, en donde n^3 es un número entero de 2 a 5 y L^2 es un enlace sencillo.

17. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 1, en donde la porción fármaco-estructura enlazadora en la que un fármaco se une a -L^1-L^2-L^P-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)- o -L^1-L^2-L^P- es una estructura fármaco-enlazador seleccionada del siguiente grupo:

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

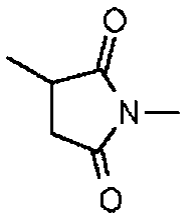
-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-(NH-DX),

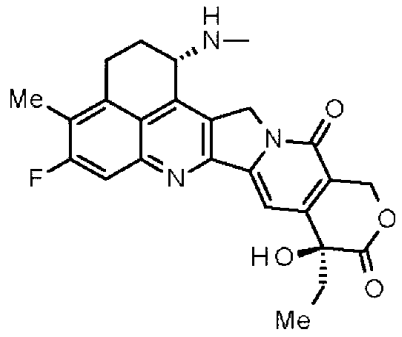
-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX).

En lo anterior, -(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



que está conectada al anticuerpo anti-HER3 en la posición 3 y está conectada a un grupo metileno en la estructura enlazadora que la contiene en el átomo de nitrógeno en la posición 1,

-(NH-DX) representa un grupo representado por la siguiente fórmula, en la que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es la posición conectora,



-GGFG- representa un residuo tetrapéptido de Gly-Gly-Phe-Gly y -DGGFG- representa un residuo pentapéptido de Asp-Gly-Gly-Phe-Gly.

18. El conjugado anticuerpo-fármaco descrito en 1, en donde la porción de la estructura fármaco-enlazador que tiene un fármaco unido a $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ es una estructura fármaco-enlazador seleccionada del siguiente grupo:

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

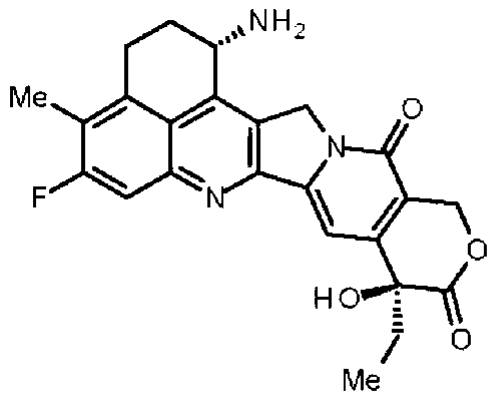
-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX).

Aquí, -(Succinimid-3-il-N)-, -(NH-DX), -GGFG-, y -DGGFG- son como se describió anteriormente.

19. Un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un compuesto antitumoral representado por la siguiente fórmula:



conjugado a un anticuerpo anti-HER3 por un enlace tioéter que se forma en una porción de enlace de disulfuro presente en una parte de bisagra del anticuerpo anti-HER3 través de un enlazador que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$.

Aquí, el anticuerpo anti-HER3 está conectado a la terminal de L^1 y el compuesto antitumoral se conecta al grupo carbonilo de la porción $-(CH_2)n^2-C(=O)-$.

En la fórmula, n^1 representa un número entero de 0 a 6,

n^2 representa un número entero de 0 a 5,

L^1 representa -(Succinimid-3-il-N)-$(CH_2)n^3-C(=O)-$,

en donde n^3 representa un número entero de 2 a 8,

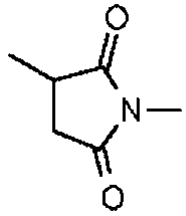
L^2 representa $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$ o un enlace sencillo,

en donde n^4 representa un número entero de 1 a 6,

L^P representa un residuo de tetrapéptido -GGFG-,

L^a representa -O- o un enlace sencillo,

-(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



que está conectada al anticuerpo anti-HER3 en la posición 3 del mismo y se une en el átomo de nitrógeno en la posición 1 a un grupo metileno en una estructura enlazadora que contiene esta estructura.

20. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 19, en donde n^1 es 3, n^2 es 0, n^3 es 2, L^2 es -NH-$(CH_2CH_2$-O$)n^4$-CH_2CH_2-C(=O)-, n^4 es 2, y L^a es un enlace sencillo, o

n^1 es 1, n^2 es 1, n^3 es 5, L^2 es un enlace sencillo, y L^a es -O-, o

n^1 es 2, n^2 es 1, n^3 es 5, L^2 es un enlace sencillo, y L^a es -O-.

21. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 19 ó 20, en donde n^3 es 2 ó 5 y L^2 es un enlace sencillo.

22. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 19 ó 20, en donde n^3 es 2 ó 5, L^2 es -NH-$(CH_2CH_2$-O$)n^4$-CH_2CH_2-C(=O)-, y n^4 es 2 ó 4.

23. El conjugado anticuerpo-fármaco descrito en cualquiera de 19 a 22, en donde -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)- es

-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-, o

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-.

24. El conjugado anticuerpo-fármaco descrito en cualquiera de 19 a 23, en donde la porción de la estructura fármaco-enlazador que tiene un fármaco unido a -L^1-L^2-L^P-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)- es una estructura de fármaco-enlazador seleccionada del siguiente grupo:

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

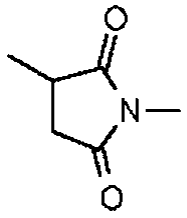
-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX);

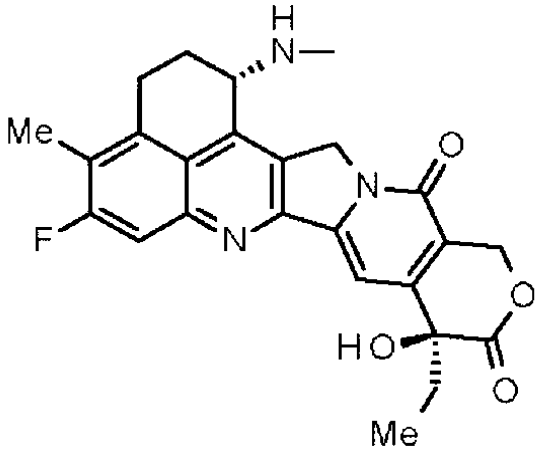
-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

En lo anterior, -(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



que está conectada al anticuerpo anti-HER3 en la posición 3 del mismo y está conectada en el átomo de nitrógeno en la posición 1 a un grupo metileno en una estructura enlazadora que contiene esta estructura.

-(NH-DX) representa un grupo representado por la siguiente fórmula, en la que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es la posición conectora:



-GGFG- representa un residuo tetrapéptido de Gly-Gly-Phe-Gly.

25. El conjugado anticuerpo-fármaco descrito en cualquiera de 19 a 23, en donde la porción de la estructura fármaco-enlazador que tiene un fármaco unido a $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ es una estructura fármaco-enlazador seleccionada del siguiente grupo:

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX).

En lo anterior, -(Succinimid-3-il-N)-, -(NH-DX), y

-GGFG- se definen como antes.

26. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 1 a 25, en donde el número promedio de unidades de la estructura fármaco-enlazador seleccionada conjugada por anticuerpo se encuentra en un intervalo de 1 a 10.

27. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 1 a 25, en donde el número promedio de unidades de la estructura fármaco-enlazador seleccionada conjugada por anticuerpo está en un intervalo de 2-8.

28. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 1 a 25, en donde el número promedio de unidades de la estructura fármaco-enlazador seleccionada conjugada por anticuerpo está en un intervalo de 3-8.

29. Un medicamento que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 1 a 28, una sal del mismo o un hidrato del mismo.

30. Un medicamento antitumoral y/o medicamento contra el cáncer que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 1 a 28, una sal del mismo o un hidrato del mismo.

31. El medicamento antitumoral y/o medicamento contra el cáncer de acuerdo con 30, que se aplica al cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama,

melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer epidermoide, cáncer peritoneal, glioblastoma multiforme del adulto, cáncer hepático, carcinoma hepatocelular, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de colon y rectal, cáncer endometrial, cáncer de útero, cáncer salival, cáncer renal, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma de ano o cáncer de pene.

32. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 1 a 28, una sal del mismo o un hidrato del mismo como componente activo, y un componente de formulación farmacéuticamente aceptable.

33. La composición farmacéutica de acuerdo con 32, que se aplica al cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer epidermoide, cáncer peritoneal, glioblastoma multiforme del adulto, cáncer hepático, carcinoma hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de

recto, cáncer de colon y recto, cáncer de endometrio, cáncer de útero, cáncer salival, cáncer renal, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma de ano o cáncer de pene.

34. Un método para el tratamiento de un tumor y/o cáncer que comprende administrar el conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 1 a 28, una sal del mismo o un hidrato del mismo.

35. El medicamento de acuerdo con 29, el medicamento antitumoral y/o medicamento contra el cáncer de acuerdo con 30 ó 31, la composición farmacéutica de acuerdo con 32 ó 33, o el método de tratamiento de acuerdo con 34, que se usa en la administración en combinación con un medicamento adicional.

36. La composición farmacéutica de acuerdo con 32 ó 33, que comprende además incluso un medicamento adicional como un ingrediente activo.

35. Un método para producir un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende hacer reaccionar un compuesto representado por la siguiente fórmula:

(maleimid-N-il)-$(CH_2)n^3$-C(=O)-L^2-L^P-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-(NH-DX) o (maleimid-N-il)-$(CH_2)n^3$-C(=O)-L^2-L^P-(NH-DX) con un anticuerpo anti-HER3 o un

derivado reactivo del mismo y conjugar una porción de fármaco-enlazador al anticuerpo mediante un método para formar un enlace tioéter en una porción de enlace de disulfuro presente en una parte de bisagra del anticuerpo.

En la fórmula, n^3 representa un número entero de 2 a 8,

L^2 representa $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$ o un enlace sencillo en donde n^4 representa un número entero de 1 a 6,

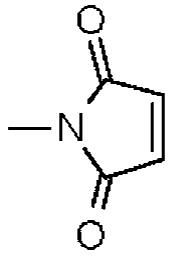
L^P representa un residuo péptido que consiste en 2 a 7 aminoácidos seleccionados a partir de fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico,

n^1 representa un número entero de 0 a 6,

n^2 representa un número entero de 0 a 5,

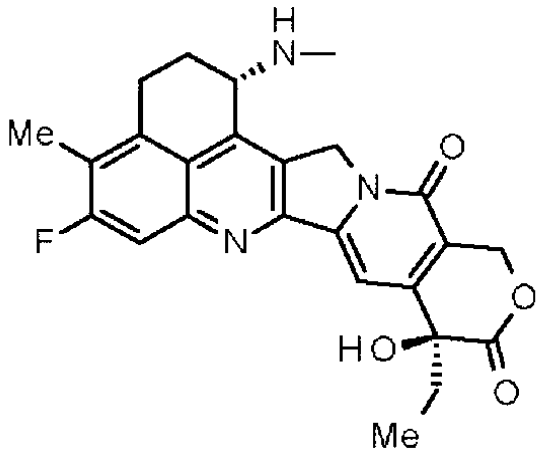
L^a representa -O- o un enlace sencillo,

(maleimid-N-il)- es un grupo representado por la siguiente fórmula y tiene un átomo de nitrógeno como una posición de conexión.



-(NH-DX) representa un grupo representado por la

siguiente fórmula, en la que el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es la posición conectora:



36. El método de producción descrito en 35, en donde el método para conjugar una porción de fármaco-enlazador a un anticuerpo anti-HER3 es un método para reducir el anticuerpo para su conversión en un derivado reactivo.

37. El método de producción descrito en 35 ó 36, en donde el número promedio de unidades de la estructura de fármaco-enlazador seleccionada conjugada por anticuerpo está en el intervalo de 1-10.

38. El método de producción descrito en 35 ó 36, en donde el número promedio de unidades de la estructura de fármaco-enlazador seleccionada conjugada por anticuerpo está en el intervalo de 2-8.

39. El método de producción descrito en 35 ó 36, en donde el número promedio de unidades de la estructura de fármaco-enlazador seleccionada conjugada por anticuerpo está

en el intervalo de 3-8.

40. Un conjugado anticuerpo-fármaco obtenido por el método de producción de acuerdo con cualquiera de 35 a 39.

41. Un conjugado anticuerpo-fármaco obtenido mediante la formación de un enlace tioéter en un sitio de enlace de disulfuro presente en una parte de bisagra de un anticuerpo anti-HER3, en donde el anticuerpo anti-HER3 es tratado en una condición reductora y después se hace reaccionar con un compuesto seleccionado del grupo de compuestos que se muestra a continuación:

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-

$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-CH_2CH_2O-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH -DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-

CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-(NH-DX),

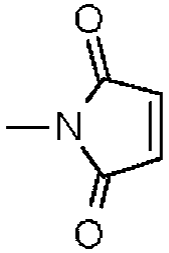
(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX), o

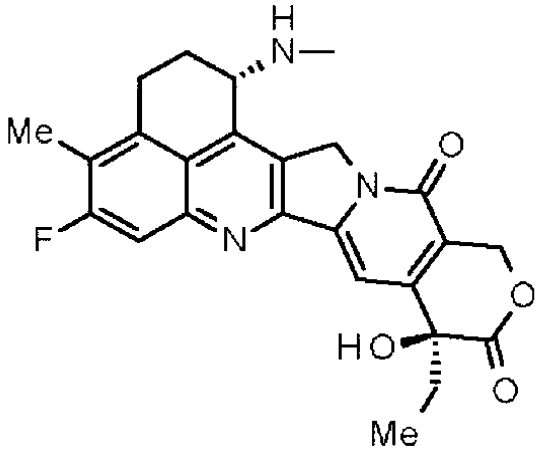
(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX).

En lo anterior, (maleimid-N-il)- es un grupo representado por la siguiente fórmula:



que tiene un átomo de nitrógeno como una posición de conexión.

-(NH-DX) representa un grupo representado por la siguiente fórmula, el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 siendo una posición de conexión.



-GGFG- representa un residuo tetrapéptido de Gly-Gly-Phe-Gly y -DGGFG- representa un residuo pentapéptido de Asp-Gly-Gly-Phe-Gly.

42. Un conjugado anticuerpo-fármaco obtenido mediante la formación de un enlace tioéter en un sitio de enlace de disulfuro presente en una parte de bisagra de un anticuerpo anti-HER3, y caracterizado por tratar el anticuerpo anti-HER3 con una condición reductora y posteriormente haciendo reaccionar con un compuesto seleccionado del grupo de compuesto que se muestra a continuación:

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX), o

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX).

En lo anterior, (maleimid-N-il)-, -(NH-DX), y -

GGFG- son como se definió anteriormente.

43. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 41 ó 42, en donde un número conjugado promedio de la estructura de fármaco-enlazador seleccionada por anticuerpo está en un intervalo de 1 a 10.

44. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 41 ó 42, en donde un número conjugado promedio de la estructura de fármaco-enlazador seleccionada por anticuerpo está en un intervalo de 2 a 8.

45. El conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con 41 ó 42, en donde un número conjugado promedio de la estructura de fármaco-enlazador seleccionada por anticuerpo está en un intervalo de 3 a 8.

46. Un medicamento que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 40 a 45, una sal del mismo o un hidrato del mismo.

47. Un medicamento antitumoral y/o medicamento contra el cáncer que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 40 a 45, una sal del mismo o un hidrato del mismo.

48. El medicamento antitumoral y/o medicamento contra el cáncer de acuerdo con 47, que se aplica al cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, el glioblastoma multiforme, el cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama,

melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer epidermoide, cáncer peritoneal, glioblastoma multiforme del adulto, cáncer hepático, carcinoma hepatocelular, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de colon y rectal, cáncer endometrial, cáncer de útero, cáncer salival, cáncer renal, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma de ano o cáncer de pene.

49. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 40 a 45, una sal del mismo o un hidrato del mismo como componente activo, y un componente de formulación farmacéuticamente aceptable.

50. La composición farmacéutica de acuerdo con 49, que se aplica al cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer epidermoide, cáncer peritoneal, glioblastoma multiforme del adulto, cáncer hepático, carcinoma hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de colon y recto, cáncer de endometrio, cáncer del

útero, cáncer salival, cáncer renal, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma de ano o cáncer de pene.

51. Un método para el tratamiento de un tumor y/o cáncer que comprende la administración del conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con cualquiera de 40 a 45, una sal del mismo o un hidrato del mismo.

52. El medicamento de acuerdo con 46, el medicamento antitumoral y/o medicamento contra el cáncer de acuerdo con 47 ó 48, la composición farmacéutica de acuerdo con 49 ó 50, o el método de tratamiento de acuerdo con 51, que se usa en la administración en combinación con un medicamento adicional.

53. La composición farmacéutica de acuerdo con 49 ó 50, que comprende además incluso un medicamento adicional como un ingrediente activo.

Efectos adecuados de la invención

Con un conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco que tiene un compuesto antitumoral exatecano conjugado a través de un enlazador con una estructura específica, se puede lograr un excelente efecto antitumoral y seguridad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de longitud completa de una cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-59 (SEQ ID NO: 583).

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de longitud completa de una cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-59 (SEQ ID NO: 584).

La Figura 3 muestra la intensidad de fluorescencia media de HCC1569 tratado con diluciones en serie de U1-59 o cada conjugado anticuerpo-fármaco. Los valores de Kd y Bmax fueron calculados usando Software GraphPad Prism.

La Figura 4 muestra que células A549 se cultivaron durante 2 días con U1-59 o conjugados anticuerpo-fármaco variados. HER3 o HER3 fosforilado se evaluó por Western Blot. pan-Actina se detectó como un control de electroforesis.

La figura 5 muestra un valor promedio de reducción en la expresión HER3 en la superficie de células HCC1569 tratadas con U1-59 o cada conjugado anticuerpo-fármaco (37C ("C" representa "grados Celsius"), 1 hr).

Las Figuras 6A-6B muestran los resultados de una prueba sobre la inhibición de señales mitogénicas o de supervivencia por cada conjugado anticuerpo HER3-fármaco en una línea de cáncer de mama humano (HCC1569). La Figura 6A muestra el crecimiento o supervivencia celular derivados del conjugado anticuerpo-fármaco en presencia de 10% de FBS. Los datos se indican por media +/- desviación estándar de triplicados. La ordenada representa un valor de luminiscencia que indica la actividad ATP de cada muestra.

La abscisa representa la concentración de cada conjugado anticuerpo-fármaco. La Figura 6B muestra el porcentaje de reducción en la luminiscencia causado por el tratamiento con conjugado anticuerpo-fármaco cuando la luminiscencia de un grupo no tratado se definió como 100%.

Las Figuras 7A-7B muestran los resultados de una prueba sobre la inhibición de señales mitogénicas o supervivencia por cada conjugado anticuerpo HER3-fármaco en una línea de cáncer de mama humano (MDA-MB 453). La Figura 7A muestra el crecimiento o supervivencia celular derivados del conjugado anticuerpo-fármaco en presencia de 10% de FBS. La ordenada representa un valor de luminiscencia que indica la actividad ATP de cada muestra. La abscisa representa la concentración de cada conjugado anticuerpo-fármaco. Los datos se indican por media +/- desviación estándar de triplicados. La Figura 7B muestra la velocidad de reducción de la luminiscencia causada por el tratamiento con conjugado anticuerpo-fármaco cuando la luminiscencia de un grupo no tratado se definió como 100%.

Las Figuras 8A-8B muestran los resultados de una prueba sobre la inhibición de señales mitogénicas o supervivencia por cada conjugado anticuerpo HER3-fármaco en una línea de melanoma humano (A375). La Figura 8A muestra el crecimiento o supervivencia celular derivados del conjugado anticuerpo-fármaco en presencia de 10% de FBS. La ordenada

representa un valor de luminiscencia que indica la actividad ATP de cada muestra. La abscisa representa la concentración de cada conjugado anticuerpo-fármaco. Los datos se indican por media +/- desviación estándar de triplicados. La Figura 8B muestra el porcentaje de reducción en la luminiscencia causado por el tratamiento conjugado anticuerpo-fármaco cuando la luminiscencia de un grupo no tratado se definió como 100%.

Las Figuras 9A-9B muestran los resultados de una prueba sobre la inhibición de señales mitogénicas o supervivencia por cada conjugado anticuerpo HER3-fármaco en una línea de cáncer colorrectal humano (HT29). La Figura 9A muestra el crecimiento o supervivencia celular derivados del conjugado anticuerpo-fármaco en presencia de 10% de FBS. La ordenada representa un valor de luminiscencia que indica la actividad ATP de cada muestra. La abscisa representa la concentración de cada conjugado anticuerpo-fármaco. Los datos se indican por media +/- desviación estándar de triplicados. La Figura 9B muestra la tasa de reducción de la luminiscencia causada por el tratamiento conjugado anticuerpo-fármaco cuando la luminiscencia de un grupo no tratado se definió como 100%.

Las Figuras 10A-10B muestran los resultados de una prueba sobre la inhibición de señales mitogénicas o de supervivencia por cada conjugado anticuerpo HER3-fármaco en

una línea de cáncer de pulmón humano (A549). La Figura 10A muestra el crecimiento o supervivencia celular derivados del conjugado anticuerpo-fármaco en presencia de 10% de FBS. La ordenada representa un valor de luminiscencia que indica la actividad ATP de cada muestra. La abscisa representa la concentración de cada conjugado anticuerpo-fármaco. Los datos se indican por media +/- desviación estándar de triplicados. La Figura 10B muestra el porcentaje de reducción en la luminiscencia causado por el tratamiento conjugado anticuerpo-fármaco cuando la luminiscencia de un grupo no tratado se definió como 100%.

Las Figura 11 muestra los resultados de la comparación de la tasa de inhibición del crecimiento o supervivencia celular entre el conjugado anticuerpo-fármaco (3) y el conjugado anticuerpo-fármaco (4). El diagrama de la izquierda muestra la tasa de inhibición del crecimiento o supervivencia celular derivados del conjugado anticuerpo-fármaco en presencia de 10% de FBS. La ordenada representa la luminiscencia que indica la actividad ATP de cada muestra. La abscisa representa la concentración de cada conjugado anticuerpo-fármaco. Los datos se indican por media +/- desviación estándar de triplicados. El diagrama de la derecha muestra la comparación de la tasa de reducción de la luminiscencia causada por el tratamiento conjugado anticuerpo-fármaco entre alta carga de fármaco (HDL) y media

carga de fármaco (MDL) cuando la luminiscencia de un grupo no tratado se definió como 100%.

La Figura 12 muestra los resultados de la comparación de la tasa de inhibición del crecimiento o la supervivencia celular entre el conjugado anticuerpo-fármaco (10) y el conjugado anticuerpo-fármaco (11). El diagrama de la izquierda muestra la tasa de inhibición del crecimiento o supervivencia celular derivados del conjugado anticuerpo-fármaco en presencia de 10% de FBS. La ordenada representa la luminiscencia que indica la actividad ATP de cada muestra. La abscisa representa la concentración de cada conjugado anticuerpo-fármaco. Los datos se indican por media +/- desviación estándar de triplicados. El diagrama de la derecha muestra la comparación de la tasa de reducción de la luminiscencia causada por el tratamiento conjugado anticuerpo-fármaco entre alta carga de fármaco (HDL) y media carga de fármaco (MDL) cuando la luminiscencia de un grupo no tratado se definió como 100%.

La Figura 13 muestra los resultados de la comparación de la tasa de inhibición del crecimiento o la supervivencia celular entre el conjugado anticuerpo-fármaco (13) y el conjugado anticuerpo-fármaco (14). El diagrama de la izquierda muestra la tasa de inhibición del crecimiento o supervivencia celular derivados del conjugado anticuerpo-fármaco en presencia de 10% de FBS. La ordenada representa

la luminiscencia que indica la actividad ATP de cada muestra. La abscisa representa la concentración de cada conjugado anticuerpo-fármaco. Los datos se indican por media +/- desviación estándar de triplicados. El diagrama de la derecha muestra la comparación de la tasa de reducción de la luminiscencia causada por el tratamiento conjugado anticuerpo-fármaco entre alta carga de fármaco (HDL) y media carga de fármaco (MDL) cuando la luminiscencia de un grupo no tratado se definió como 100%.

La Figura 14 muestra los resultados de una prueba antitumoral de cáncer de mama humano (HCC1569) usando el conjugado anticuerpo-fármaco (3), (10), o (13). La ordenada representa un volumen promedio del tumor. La abscisa representa el número de días desde el trasplante de células. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

La Figura 15 muestra los resultados de una prueba antitumoral de melanoma humano (HT-144) usando el conjugado anticuerpo-fármaco (3), (10), o (13). La ordenada representa un volumen promedio del tumor. La abscisa representa el número de días desde el trasplante de células. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la

media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

La Figura 16 muestra los resultados de una prueba antitumoral de cáncer de mama humano (MDA-MB-453) usando el conjugado anticuerpo-fármaco (3), (10), o (13). La ordenada representa un volumen medio del tumor. La abscisa representa el número de días de administración. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

La Figura 17 muestra los resultados de una prueba antitumoral de línea humana de cáncer colorrectal (HT-29) usando el conjugado anticuerpo-fármaco (3), (10), o (13). La ordenada representa un volumen medio del tumor. La abscisa representa el número de días de administración. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

La Figura 18 muestra los resultados de una prueba antitumoral de línea de cáncer de pulmón humano (A549) usando

el conjugado anticuerpo-fármaco (3), (10), o (13). La ordenada representa un volumen medio del tumor. La abscisa representa el número de días desde el trasplante de células. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

La figura 19 muestra los resultados de una prueba antitumoral de línea de cáncer de mama humana triple negativa (MDA-MB-468) usando el conjugado anticuerpo-fármaco (13). La ordenada representa un volumen medio del tumor. La abscisa representa el número de días desde el trasplante de células. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

La Figura 20 muestra los resultados de una prueba antitumoral de línea de cáncer de mama luminal humano (MCF-7) usando el conjugado anticuerpo-fármaco (16a). La ordenada representa un volumen medio del tumor. La abscisa representa el número de días desde el trasplante de células. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial

del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

La Figura 21 muestra los resultados de una prueba antitumoral de línea de melanoma humano (WM-266-4) usando el conjugado anticuerpo-fármaco (16a). La ordenada representa un volumen medio del tumor. La abscisa representa el número de días desde el trasplante de células. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

La Figura 22 muestra los resultados de una prueba antitumoral de línea de cáncer de ovario humano (OVCAR-8) usando el conjugado anticuerpo-fármaco (16a). La ordenada representa un volumen medio del tumor. La abscisa representa el número de días desde el trasplante de células. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

La Figura 23 muestra los resultados de una prueba antitumoral de línea de cáncer de vejiga humano (SW-780) usando el conjugado anticuerpo-fármaco (16a). La ordenada

representa un volumen medio del tumor. La abscisa representa el número de días desde el trasplante de células. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

La figura 24 muestra los resultados de una prueba antitumoral de línea de cáncer de mama humano (MDA-MB-453) usando el conjugado anticuerpo-fármaco (16a). La ordenada representa un volumen medio del tumor. La abscisa representa el número de días desde el trasplante de células. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

La figura 25 muestra los resultados de una prueba antitumoral de línea de cáncer de mama humano (MDA-MB-453) usando el conjugado anticuerpo-fármaco (16a). La ordenada representa un volumen medio del tumor. La abscisa representa el número de días desde el trasplante de células. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos

(desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

La Figura 26 muestra los resultados de una prueba antitumoral de línea de cáncer de mama humano (JIMT-1) usando el conjugado anticuerpo-fármaco (15). La ordenada representa un volumen medio del tumor. La abscisa representa el número de días desde el trasplante de células. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

La figura 27 muestra los resultados de una prueba antitumoral de línea de cáncer de pulmón humano (PC9) usando el conjugado anticuerpo-fármaco (16a). La ordenada representa un volumen medio del tumor. La abscisa representa el número de días desde el trasplante de células. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

Las Figuras 28A-28B muestran los resultados de una prueba antitumoral de línea de cáncer de mama humano triple negativo (MDA-MB-468) usando el conjugado anticuerpo-fármaco (16a). La ordenada representa un volumen medio del tumor.

La abscisa representa el número de días desde el trasplante de células. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

Las Figuras 29A-29B muestran los resultados de una prueba antitumoral de línea de cáncer de cabeza y cuello humano (Fadu) usando el conjugado anticuerpo-fármaco (16a). La ordenada representa un volumen medio del tumor. La abscisa representa el número de días desde el trasplante de células. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

Las Figuras 30A-30B muestra los resultados de una prueba antitumoral usando una sección de tumor derivada de paciente de cáncer de estómago humano (NIBIO-G016) y el conjugado anticuerpo-fármaco (16a). La ordenada representa un volumen medio del tumor. La abscisa representa el número de días desde el trasplante de células. Todos los valores se indican mediante la desviación estándar de la media +/-. El volumen del tumor inicial y el peso inicial del ratón se analizaron sobre la base de datos descriptivos (desviación

media y desviación estándar) usando Microsoft Excel 2009.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

De aquí en adelante, las modalidades preferidas para llevar a cabo la presente invención se explican en vista de las figuras. Mientras tanto, las modalidades explicadas a continuación son los ejemplos de las modalidades representativas de la presente invención y el alcance de la presente invención no deberá interpretarse estrechamente con base en ellas.

La presente invención proporciona un conjugado de proteína de unión a HER3-fármaco. Preferiblemente, la proteína de unión a HER3 de la invención es una proteína de andamiaje que tiene un anticuerpo como la actividad de unión o un anticuerpo, es decir, un anticuerpo anti-HER3.

El conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención es un medicamento antitumoral en donde un anticuerpo anti-HER3 se conjuga con un compuesto antitumoral a través de una porción de estructura enlazadora y se explica en detalle a continuación.

En el contexto de la presente invención, el término "proteína de andamiaje", como se usa aquí, significa un polipéptido o proteína con áreas superficiales expuestas en las que inserciones, sustituciones o supresiones de aminoácidos son altamente tolerables. Ejemplos de proteínas de andamiaje que se pueden usar de acuerdo con la presente

invención son la proteína A de *Staphylococcus aureus*, la proteína de unión a bilina de *Pieris brassicae* u otras lipocalinas, proteínas de repetición de anquirina y fibronectina humana (revisado en Binz y Plucktun, Curr Opin Biotechnol, 16, 459-69). La ingeniería de una proteína de andamiaje puede ser considerada como injertar o integrar una función de afinidad sobre o en el marco estructural de una proteína plegada de manera estable. Función de afinidad significa una afinidad de unión a proteína de acuerdo con la presente invención. Un andamiaje puede ser estructuralmente separable de las secuencias de aminoácidos que confieran especificidad de unión. En general, las proteínas que parecen adecuadas para el desarrollo de tales reactivos de afinidad artificiales se pueden obtener por técnicas de ingeniería de proteínas racionales, o más comúnmente, combinatorias, tales como tamizando contra HER3, ya sea proteína purificada o proteína que aparece en la superficie celular, para los agentes de unión en una biblioteca de andamiaje artificial que se muestre *in vitro*, habilidades que son conocidas en la técnica (Skerra, J. Mol. Recog., 2000; Binz y Plucktun, 2005). Además, una proteína de andamiaje que tenga una actividad de unión tipo anticuerpo puede ser derivada de un polipéptido aceptor que contenga el dominio de andamiaje, que puede ser injertado con dominios de unión de un polipéptido donante para conferir la especificidad de

unión del polipéptido donante en el dominio de andamiaje que contenga el polipéptido aceptor. Dichos dominios de unión insertados pueden ser, por ejemplo, la región determinante de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo, en particular, un anticuerpo anti-HER3. La inserción se puede realizar mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la síntesis de polipéptidos, síntesis de ácido nucleico de un aminoácido de codificación, así por varias formas de métodos recombinantes bien conocidos por los expertos en la técnica.

Anticuerpo

Además, el término "anticuerpo" o "anticuerpo anti-HER3", como se usa aquí, significa un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humanizado (Jones et al., Nature 321 (1986), 522-525; Riechmann et al., Nature 332 (1988), 323-329; y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2 (1992), 593-596), un anticuerpo quimérico (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 (1984), 6851-6855), un anticuerpo humano y un anticuerpo completamente humano (Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, p.133-143; Kuroiwa, Y. et al, Nucl. Acids Res. (1998) 26, p. 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects, vol. 10, p. 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. y Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. U.S.A. (2000) 97, p. 722-727, Publicación Internacional No. WO 2007/077028, etc.), un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) formado a partir de al menos dos anticuerpos, o un fragmento de anticuerpo de los mismos. El término "fragmento de anticuerpo" comprende cualquier porción de los anticuerpos mencionados anteriormente, preferiblemente su región de unión al antígeno o regiones variables. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fv, diacuerpos (Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (1993), 6444-6448), moléculas de anticuerpo de cadena individual (Plucktun en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies 113, Rosenburg y Moore, EDS, Springer Verlag, N.Y. (1994), 269-315) y otros fragmentos, siempre que presenten la capacidad deseada de la unión a HER3.

Además, el término "anticuerpo" o "anticuerpo anti-HER3", como se usa en este documento, puede incluir moléculas tipo anticuerpo que contengan subdominios diseñados de anticuerpos o variantes de anticuerpos de origen natural. Estas moléculas tipo anticuerpo pueden ser anticuerpos de un solo dominio, tales como de sólo dominio VH o sólo dominio VL derivados ya sea a partir de fuentes naturales tales como camélidos (Muildermans et al., Reviews in Molecular Biotechnology 74, 277-302) o por medio de presentación *in*

vitro de bibliotecas humanas, de camélidos o de otras especies (Holt et al., Trends Biotechnol., 21, 484-90).

De acuerdo con la presente invención, el "fragmento Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis CDRs confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDRs específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque normalmente a una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El "fragmento Fab" también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. El "fragmento Fab" se diferencia del "fragmento Fab^1" por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio de cadena pesada CH1 que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. El "fragmento F(ab')$_2$" originalmente se produce como un par de "fragmentos Fab'" que tienen cisteínas bisagra entre ellos. Los métodos para preparar esos fragmentos de

anticuerpo, tales como la digestión con papaína o pepsina, se conocen por los expertos en la técnica.

En otra modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo anti-HER3 de la invención es un anticuerpo anti-HER3 dirigido contra el dominio extracelular (ECD) de HER3.

El anticuerpo anti-HER3 usado en un conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención puede derivarse de cualquier especie. Ejemplos preferidos de la especie pueden incluir humanos, ratas, ratones y conejos. El anticuerpo anti-HER3 derivado de otra especie que no es la humana es, preferiblemente, quimerizado o humanizado usando una técnica bien conocida. El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal y es preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo anti-HER3 puede ser aquellos que sean capaces de atacar a las células tumorales y por lo tanto posea la propiedad de ser capaz de reconocer células tumorales, la propiedad de ser capaz de unirse a las células tumorales, la propiedad de ser internalizado en las células tumorales, y actividad citocida frente a las células tumorales, etc. El anticuerpo anti-HER3 puede conjugarse con un compuesto que tenga actividad antitumoral a través de un enlazador para formar un conjugado anticuerpo-fármaco.

La actividad de unión del anticuerpo contra las

células tumorales se puede confirmar mediante citometría de flujo. La internalización del anticuerpo en las células tumorales puede confirmarse usando (1) un ensayo de visualizar un anticuerpo incorporado en las células bajo un microscopio de fluorescencia usando un anticuerpo secundario (marcado con fluorescencia) que se una al anticuerpo terapéutico (Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761), (2) un ensayo de medición de la cantidad de fluorescencia incorporada en las células usando un anticuerpo secundario (marcado con fluorescencia) que se una al anticuerpo terapéutico (Molecular Biology of the Cell, Vol. 15, 5268-5282, diciembre de 2004), o (3) un ensayo de Mab-ZAP usando una inmunotoxina que se una al anticuerpo terapéutico en donde la toxina sea liberada tras su incorporación en las células para inhibir el crecimiento celular (Bio Techniques 28: 162-165, enero de 2000). Una proteína de un complejo recombinante de un dominio catalítico de toxina de la difteria y proteína G puede ser usado como la inmunotoxina.

La actividad antitumoral del anticuerpo se puede confirmar *in vitro* mediante la determinación de la actividad inhibitoria contra el crecimiento celular. Por ejemplo, una línea celular de cáncer que sobreexprese una proteína objetivo para el anticuerpo se cultiva, y se añade el anticuerpo en concentraciones variables al sistema de cultivo

para determinar la actividad inhibidora frente a la formación de focos, la formación de colonias y el crecimiento de esferoides. La actividad antitumoral puede confirmarse *in vivo*, por ejemplo, mediante la administración del anticuerpo a un ratón desnudo con una línea celular de tumor trasplantada que exprese altamente la proteína objetivo, y determinando el cambio en las células cancerosas (tumorales).

Ya que el compuesto conjugado en el conjugado anticuerpo-fármaco ejerce un efecto antitumoral, se prefiere pero no es esencial que el propio anticuerpo deba tener un efecto antitumoral. Con el fin de ejercer la citotoxicidad del compuesto antitumoral específica y selectivamente para células tumorales, es importante y también preferido que el anticuerpo debe tener la propiedad de ser internalizado para migrar en las células tumorales.

El anticuerpo anti-HER3 se puede obtener usando un método llevado a cabo por lo general en la técnica, que implica la inmunización de los animales con un polipéptido antigénico y la recolección y purificación de los anticuerpos producidos *in vivo*. El origen del antígeno no se limita a los seres humanos y los animales pueden ser inmunizados con un antígeno derivado de un animal no humano tal como un ratón o una rata y similares. En este caso, la reactividad cruzada de los anticuerpos que se unen al antígeno heterólogo obtenido con antígenos humanos puede ser probada para la

detección de un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

Como alternativa, células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos contra el antígeno se fusionan con células de mieloma de acuerdo con un método conocido en la técnica (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497; y Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, NY (1980)) para establecer hibridomas, de los cuales a su vez pueden ser obtenidos anticuerpos monoclonales.

El antígeno se puede obtener al manipular genéticamente células hospederas para producir un gen que codifique para la proteína antigénica. Específicamente, vectores que permiten la expresión del gen de antígeno se preparan y se transfieren a las células hospederas de manera que el gen sea expresado. El antígeno así expresado se puede purificar. El anticuerpo también se puede obtener mediante el uso de un método que implica inmunizar animales con las células que expresan al antígeno genéticamente manipuladas o una línea celular con un antígeno expresado.

El anticuerpo anti-HER3 se puede obtener por medios conocidos en la técnica.

El anticuerpo anti-HER3 que se puede usar en la presente invención no está particularmente limitado y es deseablemente, por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos que tienen propiedades como los descritos a continuación.

(1) Un anticuerpo anti-HER3 que tiene las siguientes propiedades:

(a) se une específicamente a HER3 y/o

(b) tiene la actividad de internalizarse en células que expresan HER3 a través de la unión a HER3.

(2) El anticuerpo de acuerdo con (1), en donde el anticuerpo se une al dominio extracelular de HER3.

(3) El anticuerpo de acuerdo con (1) o (2), en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

(4) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (3), en donde el anticuerpo tiene actividad de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) y/o actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

(5) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de ratón, un anticuerpo monoclonal quimérico, un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo (monoclonal) humano o completamente humano.

(6) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (5), en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2.

(7) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (6), en donde el anticuerpo carece de un residuo de lisina en la C-terminalarboxi de la cadena pesada.

(8) El anticuerpo de acuerdo con (7), en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada representada por la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 70 y una región variable de la cadena ligera representada por la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO : 72.

(9) Un anticuerpo obtenido por un método para producir el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (8), comprendiendo el método las etapas de: cultivar una célula hospedera transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica para el anticuerpo; y recoger el anticuerpo de interés a partir de los cultivos obtenidos en la etapa anterior.

En lo sucesivo, se describirá el anticuerpo anti-HER3 usado en la presente invención.

En la presente memoria, los términos "cáncer" y "tumor" se usan indistintamente.

En la presente descripción, el término "gen" incluye no sólo ADN sino su ARNm, ADNc y ARNc del mismo.

En la presente memoria, el término "polinucleótido" se usa indistintamente con un ácido nucleico y también incluye ADN, ARN, sondas, oligonucleótidos y cebadores.

En la presente memoria, los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente.

En la presente memoria, el término "célula" también incluye células en individuos animales y células cultivadas.

En la presente memoria, el término "HER3" se usa de forma intercambiable con proteína HER3.

En la presente memoria, el término "CDR" significa una región determinante de la complementariedad (CDR). Una molécula de anticuerpo es conocida por tener tres CDRs en cada una de las cadenas pesada y ligera. CDRs, también llamadas dominios hipervariables, se encuentran en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo. Estos sitios tienen una estructura primaria particularmente muy variable y se separan en tres posiciones en las respectivas estructuras primarias de hebras de polipéptidos de cadena pesada y ligera. En la presente memoria, las CDRs de anticuerpos se conocen como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 desde la terminal amino de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada en cuanto a CDRs de la cadena pesada y como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 desde la terminal amino de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera en cuanto a CDRs de la cadena ligera. Estos sitios son proximales entre sí en la estructura tridimensional y determinan la especificidad para el antígeno que será unido.

En la presente invención, la frase "hibridar en

condiciones rigurosas" se refiere a hibridación a 68ºC en una solución de hibridación disponible en el mercado ExpressHyb Hybridization Solution (fabricada por Clontech Laboratories, Inc.), o la hibridación identificable bajo condiciones que implican la hibridación a 68ºC en presencia de NaCl 0.7 a 1.0 M usando un filtro de ADN inmovilizado, seguido de lavado a 68ºC usando 0.1 a 2 × solución SSC (1 × SSC se compone de NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM), o hibridación bajo condiciones equivalentes a las mismas.

1. HER3

El receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 3 (HER3, también conocido como ErbB3) es una proteína tirosina cinasa receptora y pertenece al subfamilia de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de proteínas tirosina cinasas receptoras, que también incluyen HER1 (también conocido como EGFR), HER2, y HER4. HER3 es un receptor transmembrana y consta de un dominio extracelular de unión al ligando (ECD), un dominio de dimerización en el ECD, un dominio transmembrana, un dominio intracelular de proteína tirosina cinasa (TKD) y un dominio de fosforilación C-terminal. HER3 se ha encontrado que se sobreexpresa en varios tipos de cáncer tales como cánceres de mama, gastrointestinal y pancreático. Se ha demostrado una correlación entre la expresión de HER2/HER3 y la progresión de una etapa no invasiva a una invasiva.

La proteína HER3 usado en la presente invención se puede usar después de la purificación directa a partir de células de mamífero humano o no humano (rata, ratón, etc.) que expresan HER3 o se puede usar mediante la preparación de fracciones de membrana celular de las células. Como alternativa, HER3 se puede sintetizar *in vitro* o puede ser producido a partir de células hospederas por ingeniería genética. En la ingeniería genética, específicamente, ADNc de HER3 se integra en vectores que permiten la expresión del mismo, y HER3 se puede expresar después por síntesis en una solución que contenga las enzimas necesarias para transcripción y traducción, sustratos y sustancias energéticas o por transformación de otras células procariotas hospederas o células eucariotas hospederas para producir la proteína. Como alternativa, las células que expresan HER3 manipuladas genéticamente descritas anteriormente, o una línea celular con HER3 expresado pueden usarse como la proteína HER3.

Una secuencia de ARN, una secuencia de ADNc, y una secuencia de aminoácidos de HER3 están disponibles en bases de datos públicas, y pueden ser referidas por el número de registro tal como AAA35979 (precursor que incluye una secuencia señal que consiste en el residuo de aminoácido 19 de la terminal amino), M34309 (NCBI), por ejemplo.

La anterior secuencia de aminoácidos de HER3 se

compone de una secuencia de aminoácidos que se somete a sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de por lo menos un aminoácido, y proteínas que tienen una actividad biológica equivalente a la de la proteína también se incluyen en HER3.

2. Producción de anticuerpo anti HER3

El anticuerpo contra HER3 de la presente invención se puede obtener mediante la inmunización de un animal con HER3 o un polipéptido arbitrario seleccionado de la secuencia de aminoácidos de HER3, y recolectando y purificando el anticuerpo producido *in vivo* de acuerdo con un método por lo general llevado a cabo en la técnica. Las especies biológicas de HER3 para ser usadas como un antígeno no se limitan a ser humanas, y un animal puede ser inmunizado con HER3 derivado de un animal que no sea el ser humano tal como un ratón o una rata. En este caso, mediante el examen de la reactividad cruzada entre un anticuerpo que se une al HER3 heterólogo obtenido y HER3 humano, un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana puede ser seleccionado.

Además, un anticuerpo monoclonal se puede obtener de un hibridoma establecido por la fusión de células productoras de anticuerpos que produzcan un anticuerpo contra HER3 con células de mieloma de acuerdo con un método conocido (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature, (1975) 256, pp. 495-497; Kennet, R. ed, Monoclonal Antibodies, pp. 365-367,

Plenum Press, N.Y. (1980)).

HER3 para ser usado como un antígeno puede obtenerse mediante la expresión del gen HER3 en una célula hospedera usando ingeniería genética.

Específicamente, se produce un vector capaz de expresar el gen HER3, y el vector resultante se transfecta en una célula hospedera para expresar el gen, y luego se purifica el HER3 expresado.

También es posible usar células que expresen HER3 obtenidas por ingeniería genética o una línea celular que exprese HER3 como proteína HER3. En lo que sigue, se explica específicamente un método para obtener un anticuerpo contra HER3.

(1) Preparación de antígeno

Ejemplos del antígeno a usarse para la producción del anticuerpo antiHER3 incluyen HER3, un polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos parcial que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de HER3, y un derivado obtenido mediante la adición de una secuencia de aminoácidos dada o vehículo a la misma.

HER3 se puede purificar directamente a partir de tejidos tumorales o células tumorales humanos y usarse. Además, HER3 se puede obtener sintetizándolo *in vitro* o produciéndolo en una célula hospedera mediante ingeniería genética.

Con respecto a la ingeniería genética, específicamente, después de que ADNc de HER3 se integra en un vector capaz de expresar ADNc de HER3, HER3 se puede obtener sintetizándolo en una solución que contenga una enzima, un sustrato y una sustancia de energía requerida para la transcripción y traducción, o mediante la expresión de HER3 en otra célula hospedera procariota o eucariota transformada.

Además, el antígeno también se puede obtener como una proteína secretora mediante la expresión de una proteína de fusión obtenida ligando el dominio extracelular de HER3, que es una proteína de membrana, a la región constante de un anticuerpo en un sistema anfitrión-vector apropiado.

ADNc de HER3 se puede obtener, por ejemplo, mediante un denominado método de PCR en donde una reacción en cadena de la polimerasa (referida como "PCR"; ver Saiki, R. K., et al, Science, (1988) 239, pp. 487-489) se lleva a cabo usando una biblioteca de ADNc que expresa ADNc de HER3 como plantilla y cebadores que amplifican específicamente ADNc de HER3.

Como la síntesis *in vitro* del polipéptido, por ejemplo, Rapid Translation System (RTS) fabricado por Roche Diagnostics, Inc. se puede ejemplificar, pero no se limita a ello.

Ejemplos de las células hospederas procariotas incluyen *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Con el fin de

transformar las células hospederas con un gen objetivo, las células hospederas se transforman mediante un vector plasmídico que comprende un replicón, es decir, un origen de replicación derivado de una especie compatible con el anfitrión, y una secuencia reguladora. Además, el vector tiene preferiblemente una secuencia capaz de imponer selectividad fenotípica en la célula transformada.

Ejemplos de las células hospederas eucariotas incluyen células de vertebrados, células de insectos y células de levadura. Como las células de vertebrados, por ejemplo, se usan a menudo células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650; ATCC: American Type Culture Collection), fibroblastos murinos NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), y cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) de células de ovario de hámster chino (células CHO; ATCC: CCL-61) y similares, sin embargo, las células no se limitan a las mismas.

El transformante así obtenido puede cultivarse de acuerdo con un método llevado a cabo usualmente en la técnica, y por el cultivo del transformante, un polipéptido objetivo se produce intracelularmente o extracelularmente.

Un medio adecuado para ser usado para el cultivo puede seleccionarse de entre diversos medios de cultivo usados comúnmente dependiendo de las células hospederas

empleadas. Si se emplea *Escherichia coli*, por ejemplo, se puede usar un medio LB complementado con un antibiótico tal como ampicilina o IPMG según sea necesario.

Una proteína recombinante producida intracelularmente o extracelularmente por el transformante a través de tal cultivo puede separarse y purificarse mediante cualquiera de diversos métodos de separación conocidos que usan la propiedad física o química de la proteína.

Ejemplos específicos de los métodos incluyen el tratamiento con un precipitante de proteína común, ultrafiltración, varios tipos de cromatografía líquida tales como cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de afinidad, diálisis, y una combinación de los mismos.

Además, mediante la fijación de una etiqueta de seis residuos de histidina a una proteína recombinante que será expresa, la proteína se puede purificar de manera eficiente con una columna de afinidad a níquel. Como alternativa, uniendo la región Fc de IgG a una proteína recombinante que será expresada, la proteína se puede purificar de manera eficiente con una columna de proteína A.

Mediante la combinación de los métodos descritos anteriormente, una gran cantidad de un polipéptido objetivo puede producirse fácilmente con alto rendimiento y alta

pureza.

También es posible usar el propio transformante arriba mencionado como un antígeno. También es posible usar una línea celular que exprese HER3 como un antígeno. Ejemplos de la línea celular incluyen. Sin embargo, siempre y cuando HER3 sea expresado, no se limita a esas líneas celulares.

(2) Producción de anticuerpo monoclonal anti-HER3

Ejemplos de la unión específica de anticuerpo a HER3 incluyen una unión específica de anticuerpo monoclonal a HER3, y un método para obtener el anticuerpo es como se describe a continuación.

La producción de un anticuerpo monoclonal generalmente requiere los siguientes pasos operativos de:

(a) purificar un biopolímero usado como un antígeno o preparación de células que expresan el antígeno;

(b) preparar células productoras de anticuerpos mediante la inmunización de un animal por inyección del antígeno, toma de la sangre, el ensayo de su título de anticuerpos para determinar cuando se extirpe el bazo;

(c) preparar células de mieloma (denominadas en adelante como "mieloma");

(d) fusionar las células productoras de anticuerpos con el mieloma;

(e) seleccionar un grupo de hibridomas que

produzcan un anticuerpo deseado;

(f) dividir los hibridomas en clones de células individuales (clonación);

(g) opcionalmente, cultivar el hibridoma o criar un animal implantado con el hibridoma para producir una gran cantidad de un anticuerpo monoclonal;

(h) examinar el anticuerpo monoclonal producido de este modo para la actividad biológica y especificidad de unión, o ensayar el mismo para propiedades como un reactivo marcado; y similares.

En lo sucesivo, se describirá el método de producción de un anticuerpo monoclonal en detalle siguiendo los pasos anteriores, sin embargo, el método no se limita al mismo, y, por ejemplo, se pueden usar células productoras de anticuerpos que no sean células de bazo y mieloma.

(a) Purificación de antígeno

Como el antígeno, puede usarse HER3 preparado por el método como el descrito anteriormente o un péptido parcial del mismo.

Además, una fracción de membrana preparada a partir de células recombinantes que expresen HER3 o las células recombinantes que expresen al propio HER3, y también un péptido parcial de la proteína de la invención sintetizado químicamente por un método conocido para los expertos en la técnica también se puede usar como el antígeno.

Además, una línea celular que exprese HER3 puede también ser usada como un antígeno.

(B) Preparación de células productoras de anticuerpos

El antígeno obtenido en la etapa (a) se mezcla con un adyuvante tal como adyuvante completo o incompleto de Freund o sulfato de aluminio potasio y la mezcla resultante se usa como un inmunógeno para inmunizar un animal experimental. En un método alternativo, un animal de ensayo es inmunizado con células que expresan el antígeno como inmunógeno. Como el animal experimental, cualquier animal usado en un método de producción de hibridoma conocido puede ser usado sin ningún problema. Específicamente, por ejemplo, un ratón, una rata, una cabra, ovejas, ganado, un caballo, o similares puede ser usado. Sin embargo, desde el punto de vista de la facilidad de disponibilidad de células de mieloma que van a fusionarse con las células productoras de anticuerpos extraídos, un ratón o una rata se usa preferiblemente como el animal a inmunizar.

Además, la cepa de un ratón o una rata a ser usada no está particularmente limitada, y en el caso de un ratón, por ejemplo, se pueden usar diversas cepas tales como A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HT, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB y 129 y similares, y en el caso de una rata, por ejemplo, se pueden usar Wistar,

Low, Lewis, Sprague, Dawley, ACI, BN, Fischer y similares.

Estos ratones y ratas están disponibles comercialmente de los criadores/distribuidores de animales de experimentación, por ejemplo, CLEA Japan, Inc. y Charles River Laboratories Japan, Inc.

Como el animal a inmunizar, en consideración de la compatibilidad de fusión con células de mieloma descritas a continuación, en el caso de un ratón, cepa BALB/c, y en el caso de una rata, cepas Wistar y Low son particularmente preferidas.

Además, tomando en cuenta la homología antigénica entre los seres humanos y los ratones, también se prefiere el uso de un ratón que tenga disminución de la función biológica para eliminar autoanticuerpos, es decir, un ratón con una enfermedad autoinmune.

La edad de tal ratón o rata en el momento de la inmunización es preferiblemente de 5 a 12 semanas de edad, más preferentemente 6 a 8 semanas de edad.

Con el fin de inmunizar un animal con HER3 o un recombinante del mismo, por ejemplo, pueden usarse un método conocido descrito en detalle en, por ejemplo, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Tomas Publisher Springfield, Illinois (1964) o similares.

Entre estos métodos de inmunización, un método específico preferido en la invención es, por ejemplo, como sigue.

Es decir, primero, una fracción de proteína de membrana que actúa como antígeno o células hechas expresar el antígeno es/son administrados por vía intradérmica o intraperitoneal a un animal. Sin embargo, se prefiere la combinación de ambas vías de administración para aumentar la eficiencia de la inmunización, y cuando la administración intradérmica se realiza en la primera mitad y la administración intraperitoneal se realiza en la última mitad o sólo en la última mitad de la dosificación, la eficiencia de inmunización puede aumentar particularmente.

El esquema de administración del antígeno varía dependiendo del tipo de animal que se inmunizará, la diferencia individual o similares. Sin embargo, en general, se prefiere un esquema de administración en el que la frecuencia de administración del antígeno es de 3 a 6 veces y el intervalo de dosificación es de 2 a 6 semanas, y se prefiere más un esquema de administración en donde la frecuencia de administración del antígeno es de 3 a 4 veces y el intervalo de dosificación es de 2 a 4 semanas.

Además, la dosis del antígeno varía dependiendo del tipo de animal, diferencias individuales o similares, sin embargo, la dosis generalmente se establece en 0.05 a 5 mg,

preferiblemente alrededor de 0.1 a 0.5 mg.

Una inmunización de refuerzo se realiza 1 a 6 semanas, preferiblemente de 1 a 4 semanas, más preferiblemente de 1 a 3 semanas después de la administración del antígeno como se describió anteriormente. Cuando el inmunógeno es una célula, se usan 1×10^6 a 1×10^7 células.

La dosis del antígeno en el momento de llevar a cabo la inmunización de refuerzo varía dependiendo del tipo o tamaño de los animales o similares, sin embargo, en el caso de, por ejemplo, un ratón, la dosis se ajusta en general a de 0.05 a 5 mg, preferiblemente 0.1 a 0.5 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0.1 a 0.2 mg. Cuando el inmunógeno es una célula, se usan 1×10^6 a 1×10^7 células.

Las células de bazo o linfocitos, incluyendo las células productoras de anticuerpos se retiran asépticamente del animal inmunizado 1 a 10 días, preferiblemente de 2 a 5 días, más preferiblemente de 2 a 3 días después de la inmunización de refuerzo. En este momento, se mide el título de anticuerpos, y si un animal que tiene un título de anticuerpos suficientemente incrementado se usa como una fuente de suministro de las células productoras de anticuerpos, el procedimiento posterior se puede llevar a cabo de manera más eficiente.

Ejemplos del método para medir el título de anticuerpos para ser usados aquí incluyen un método de RIA y

un método de ELISA, pero el método no se limita a ellos. Por ejemplo, si se emplea un método de ELISA, la medición de los títulos de anticuerpos en la invención se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos que se describen a continuación.

Primero, un antígeno purificado o parcialmente purificado se adsorbe a la superficie de una fase sólida tal como una placa de 96 pocillos para ELISA, y la superficie de la fase sólida que no tiene antígeno adsorbido a la misma se cubre con una proteína no relacionada con el antígeno, tal como albúmina de suero bovino (denominada en lo sucesivo como "BSA"). Después de lavar la superficie, ésta se pone en contacto con una muestra diluida en serie (por ejemplo, suero de ratón) como anticuerpo primario para permitir que el anticuerpo en la muestra se una al antígeno.

Además, como un anticuerpo secundario, se añade un anticuerpo marcado con una enzima contra un anticuerpo de ratón y se deja que se una al anticuerpo de ratón. Después del lavado, se añade un sustrato para la enzima y se mide un cambio en la absorbancia que se produce debido al desarrollo de color inducido por la degradación del sustrato o similar, y el título de anticuerpos se calcula basándose en la medición.

La separación de las células productoras de anticuerpos a partir de las células de bazo o linfocitos del

animal inmunizado se puede llevar a cabo de acuerdo con un método conocido (por ejemplo, Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977), 6, p. 511; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550; Walsh, Nature (1977), 266, p. 495). Por ejemplo, en el caso de células del bazo, se puede emplear un método general en el que las células productoras de anticuerpos se separan homogeneizando el bazo para producir las células a través de filtración con una malla de acero inoxidable y suspender las células en medio esencial mínimo de Eagle (MEM).

(c) Preparación de células de mieloma (en adelante denominadas "mieloma")

Las células de mieloma que se usarán para la fusión de células no están particularmente limitadas y las células adecuadas pueden seleccionarse de las líneas de células conocidas. Sin embargo, en consideración de la conveniencia cuando un hibridoma se seleccione de células fusionadas, se prefiere usar una cepa deficiente en HGPRT (hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa) cuyo procedimiento de selección se ha establecido.

Más específicamente, ejemplos de la cepa deficiente en HGPRT incluyen X63-Ag8 (X63), NS1-ANS/1 (NS1), P3X63-Ag8.U1 (P3U1), X63-Ag8.653 (X63.653), SP2/0 -Ag14 (SP2/0), MPC11-45.6TG1.7 (45.6TG), FO, S149/5XXO, y BU.1 derivadas de ratones; 210.RSY3.Ag.1.2.3 (Y3) derivada de ratas; y U266AR

(SKO-007), GM1500·GTG-A12 (GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2 (HMy2) y 8226AR/NIP4-1 (NP41) derivadas de humanos. Estas cepas deficientes en HGPRT están disponibles de, por ejemplo, ATCC o similares.

Estas cepas celulares se subcultivan en un medio apropiado tal como un medio de 8-azaguanina [un medio obtenido por la adición de 8-azaguanina a un medio RPMI 1640 suplementado con glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina y suero de ternero fetal (denominado en lo sucesivo como "FBS")], de Medio de Dulbecco Modificado por Iscove; IMDM), o medio de Eagle modificado por Dulbecco (en lo sucesivo denominado "DMEM"). En este caso, 3 a 4 días antes de realizar la fusión celular, las células se subcultivan en un medio normal por ejemplo, un medio ASF104 (fabricado por Ajinomoto Co., Ltd.) que contiene 10% de FCS para asegurar no menos de 2×10^7 células en el día de la fusión celular.

(d) Fusión celular

La fusión entre las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma puede llevarse a cabo apropiadamente de acuerdo con un método conocido (Weir, D. M. Handbook of Experimental Immunology Vol I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Tomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), etc.), en condiciones tales que la tasa de supervivencia de las células

no se reduzca excesivamente.

Como un método tal, por ejemplo, puede usarse un método químico en el cual las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma se mezclen en una solución que contenga un polímero tal como polietilenglicol a una alta concentración, un método físico que use estimulación eléctrica, o similares. Entre estos métodos, un ejemplo específico del método químico es como se describe a continuación.

Es decir, en el caso en que se usa polietilenglicol en la solución que contiene un polímero en una alta concentración, las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma se mezclan en una solución de polietilenglicol que tiene un peso molecular de 1500 a 6000, más preferiblemente 2000-4000 a una temperatura de 30 a 40ºC, preferiblemente de 35 a 38°C durante 1 a 10 minutos, preferiblemente de 5 a 8 minutos.

(e) Selección de un grupo de hibridomas

El método de selección de hibridomas obtenidos mediante la fusión celular descrita anteriormente no está particularmente limitado. Por lo general, se usa un método de selección con HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) (Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Milstein et al., Nature (1977), 266 p 550).

Este método es eficaz cuando los hibridomas se

obtienen usando las células de mieloma de una cepa deficiente en HGPRT que no puede sobrevivir en presencia de aminopterina. Es decir, mediante el cultivo de las células no fusionadas e hibridomas en un medio HAT, solamente a hibridomas resistentes a aminopterina se les permite selectivamente sobrevivir y proliferar.

(f) División en clon de una sola célula (clonación)

Como un método de clonación para hibridomas, se puede usar un método conocido tal como un método de metilcelulosa, un método de agarosa suave, o un método de dilución limitante (ver, por ejemplo, Barbara, B. M. y Stanley, M. S.: Selected Metods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Entre estos métodos, en particular, se peude usar un método de cultivo en tres dimensiones tal como un método de metilcelulosa. Por ejemplo, el grupo de hibridomas producidos por fusión de células se suspenden en un medio de metilcelulosa tal como medio de selección D ClonaCell-HY Selection (fabricado por StemCell Technologies, inc., # 03804) y se cultiva. Luego, las colonias de hibridomas formadas se recogen, con lo cual se pueden obtener los hibridomas monoclonales. Las respectivas colonias de hibridoma recogidas se cultivan, y un hibridoma que se haya confirmado que tenga un título de anticuerpo estable en un sobrenadante de cultivo del hibridoma obtenido se selecciona como una cepa de hibridoma

monoclonal que produce el anticuerpo anti-HER3.

(g) Preparación de anticuerpo monoclonal por cultivo de hibridoma

Al cultivar el hibridoma así seleccionado, un anticuerpo monoclonal se puede obtener de manera eficiente. Sin embargo, antes del cultivo, se prefiere llevar a cabo la detección de un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal objetivo.

En tal detección, un método conocido puede ser empleado.

La medición de los títulos de anticuerpos en la invención puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, un método de ELISA explicado en el punto (b) descrito anteriormente.

El hibridoma obtenido por el método descrito anteriormente se puede almacenar en un estado congelado en nitrógeno líquido o en un congelador a -80ºC o debajo.

Después de concluir la clonación, el medio se cambia de un medio HT a un medio normal, y el hibridoma se cultiva.

Cultivo a gran escala se realiza mediante cultivo de rotación usando una botella de cultivo de gran tamaño o por cultivo giratorio. A partir del sobrenadante obtenido por el cultivo a gran escala, un anticuerpo monoclonal que se una específicamente a la proteína de la invención puede

obtenerse por purificación usando un método conocido para los expertos en la técnica tales como filtración en gel.

Además, el hibridoma se inyecta en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que el hibridoma (por ejemplo, la BALB/c descrita anteriormente) o un ratón Nu/Nu para proliferar el hibridoma, por lo que las ascitis que contienen una gran cantidad del anticuerpo monoclonal de la invención se pueden obtener.

En el caso en donde el hibridoma se administra en la cavidad abdominal, si un aceite mineral tal como 2,6,10,14-tetrametil pentadecano (pristano) se administra de 3 a 7 días antes de ella, se puede obtener una mayor cantidad de la ascitis.

Por ejemplo, un inmunosupresor se inyecta previamente en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que el hibridoma para inactivar las células T. Veinte días después, 10^6 a 10^7 células del clon de hibridoma se suspenden en un medio libre de suero (0.5 mL), y la suspensión se administra en la cavidad abdominal del ratón. En general, cuando el abdomen se expande y se llena de la ascitis, la ascitis se recoge del ratón. Por este método, el anticuerpo monoclonal se puede obtener a una concentración que sea alrededor de 100 veces o mucho más alta que en la solución de cultivo.

El anticuerpo monoclonal obtenido por el método

descrito anteriormente se puede purificar por un método descrito en, por ejemplo, Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978).

El anticuerpo monoclonal así obtenido tiene alta especificidad de antígeno para HER3.

(h) Ensayo de anticuerpo monoclonal

El isotipo y subclase del anticuerpo monoclonal obtenido de este modo se pueden determinar de la siguiente manera.

Primero, ejemplos del método de identificación incluyen un método Ouchterlony, un método ELISA, y un método RIA.

Un método Ouchterlony es simple, pero cuando la concentración del anticuerpo monoclonal es baja, se requiere una operación de condensación.

Por otra parte, cuando se usa un método ELISA o un método RIA, haciendo reaccionar directamente el sobrenadante del cultivo con una fase sólida de antígeno adsorbido y usando anticuerpos correspondientes a diversos tipos de isotipos y subclases de inmunoglobulinas como anticuerpos secundarios, el isotipo y subclase del anticuerpo monoclonal pueden ser identificados.

Además, como un método más simple, también se puede usar un kit de identificación comercialmente disponible (por

ejemplo, Mouse Typer Kit fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.) o similares.

Además, la determinación cuantitativa de una proteína puede realizarse por el método de Folin Lowry y un método de cálculo basado en la absorbancia a 280 nm [1.4 (OD 280) = Inmunoglobulina 1 mg/mL].

Además, incluso cuando el anticuerpo monoclonal se obtiene de forma es separada e independiente realizando de nuevo las etapas de (a) a (h) en (2), es posible producir un anticuerpo que tiene una actividad citotóxica equivalente a la del anticuerpo anti-HER3. Como un ejemplo de tal anticuerpo, un anticuerpo que se une al mismo epítopo que el anticuerpo anti-HER3 puede ejemplificarse. Si un anticuerpo monoclonal recién producido se une a un péptido parcial o una estructura terciaria parcial a la que se una el anticuerpo anti-HER3, se puede determinar que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítopo que el anticuerpo anti-HER3. Además, mediante la confirmación de la competición por el anticuerpo monoclonal para la unión del anticuerpo anti-HER3 a HER3 (la unión entre el anticuerpo anti-HER3 y HER3 es interferida por el anticuerpo monoclonal), se puede determinar que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítopo que el anticuerpo anti-HER3 a pesar de que una secuencia o estructura específica del epítopo no haya sido identificada. Una vez que se confirmó que el epítopo es el mismo, se espera

firmemente que el anticuerpo monoclonal tenga la misma capacidad de unión a antígeno o actividad biológica que el anticuerpo anti-HER3.

(3) Otros anticuerpos

El anticuerpo de la invención incluye no sólo el anticuerpo monoclonal descrito anteriormente contra HER3 sino también un anticuerpo recombinante obtenido mediante la modificación artificial con el fin de disminuir la antigenicidad heteróloga para humanos tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. Estos anticuerpos pueden producirse usando un método conocido.

Como el anticuerpo quimérico, puede ejemplificarse un anticuerpo en donde las regiones variables y constantes del anticuerpo se derivan de diferentes especies, por ejemplo, un anticuerpo quimérico en donde una región variable de anticuerpo derivado de ratón o rata está conectada a una región constante derivada de humano (véase Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)).

Como el anticuerpo humanizado, se puede ejemplificar un anticuerpo obtenido mediante la integración de solamente una región determinante de la complementariedad (CDR) en un anticuerpo derivado de ser humano (ver Nature (1986) 321, pp. 522-525), y un anticuerpo obtenido mediante el injerto de una parte de los residuos de aminoácido del

marco, así como la secuencia de CDR a un anticuerpo humano por un método de injerto de CDR (WO 90/07861).

El término "varios" tal como se usa aquí se refiere a 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, ó 1 ó 2.

De acuerdo con la presente invención, ha de entenderse, que la secuencia de aminoácidos de la proteína de unión de la invención no se limita a los veinte aminoácidos convencionales (Ver Immunology - A Syntesis (2ª Edition, E. S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), que se incorpora aquí como referencia). Por ejemplo, los aminoácidos pueden incluir estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos alfa-,alfa-disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales. Ejemplos de aminoácidos no convencionales, que también pueden ser componentes adecuados para la proteína de unión de la invención, incluyen: 4-hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, épsilon-N,N,N-trimetillisina, épsilon-N-acetillisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, sigma-N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares, por ejemplo, 4-hidroxiprolina.

Como la sustitución de aminoácidos en esta

descripción, se prefiere una sustitución de aminoácidos conservadora. Sustitución de aminoácidos conservadora se refiere a una sustitución que se presenta dentro de un grupo de aminoácidos relacionado con cadenas laterales de aminoácidos. Los grupos de aminoácidos preferidos son los siguientes: un grupo ácido (ácido aspártico y ácido glutámico); un grupo básico (lisina, arginina, e histidina); un grupo no polar (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano); y una familia polar sin carga (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina). Grupos de aminoácidos más preferidos son los siguientes: un grupo hidroxi alifático (serina y treonina); un grupo que contiene amida (asparagina y glutamina); un grupo alifático (alanina, valina, leucina, e isoleucina); y un grupo aromático (fenilalanina, triptófano y tirosina). Tal sustitución de aminoácidos se lleva a cabo preferiblemente dentro de un rango que no altere las propiedades de una sustancia que tiene la secuencia de aminoácidos inicial. Cuando las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de la presente invención tienen el glutamato como el aminoácido N-terminal, se pueden ciclar (en la forma de piroglutamato). En la presente invención, tal piroglutamato no se diferencia de glutamina normal sobre secuencias de aminoácidos. En las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de la presente invención, la cisteína puede estar en forma de

cisteinilo. En la presente invención, tal forma cisteinilo no se diferencia de cisteína normal sobre secuencias de aminoácidos.

Además, el anticuerpo de la invención incluye un anticuerpo humano que se une al HER3. Un anticuerpo humano contra HER3 se refiere a un anticuerpo humano que tiene solamente una secuencia génica de un anticuerpo derivado de un cromosoma humano. El anticuerpo anti HER3 humano se puede obtener por un método que use un ratón productor de anticuerpo humano que tenga un fragmento de cromosoma humano que comprenda genes de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano (véase Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, pp. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., Nucl. Acids Res. (1998) 26, pp. 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol 10, pp. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. y Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, pp. 722-727, etc.).

Tal ratón productor de anticuerpos humanos puede ser creado específicamente como sigue. Un animal modificado genéticamente en el cual los locus de genes de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena se han interrumpido, y en su lugar se han introducido locus de genes de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana a través de un vector de cromosoma artificial de levadura (YAC)

o similares se crea mediante la producción de un animal con gen suprimido y un animal transgénico y apareando estos animales.

Además, según una técnica de ADN recombinante, mediante el uso de ADNc que codifica para cada una de una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo humano, y preferiblemente un vector que comprende tales ADNc, las células eucariotas se transforman, y una célula transformante que produce un humano recombinante anticuerpo monoclonal se cultiva, con lo cual el anticuerpo también se puede obtener a partir del sobrenadante de cultivo.

Aquí, como el anfitrión, por ejemplo, células eucarióticas, preferiblemente células de mamífero tales como células CHO, linfocitos, o células de mieloma pueden ser usadas.

Con respecto a la preparación de un anticuerpo humano, las descripciones detalladas se dan en la Publicación Internacional No. WO 2007/077028. Los contenidos de la Publicación Internacional No. WO 2007/077028 se incorporan aquí por referencia.

Además, también se conoce un método para obtener un anticuerpo humano derivado de presentación de fagos seleccionado de una biblioteca de anticuerpos humanos (véase Wormstone, I. M. et al., Investigative Ophtalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), pp. 2301-2308; Carmen, S. et al.,

Briefings in Functional Genomics and Protemics (2002), 1 (2), pp. 189-203; Siriwardena, D. et al., Ophthalmology (2002) 109 (3), pp. 427-431, etc.).

Por ejemplo, se puede usar un método de presentación de fagos en el que una región variable de un anticuerpo humano se expresa en la superficie de un fago como un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), y un fago que se une a un antígeno (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), pp. 1105-1116).

Mediante el análisis del gen del fago seleccionado con base en la unión a un antígeno, se puede determinar una secuencia de ADN que codifique para la región variable de un anticuerpo humano que se una a un antígeno.

Si la secuencia de ADN de scFv que se une a un antígeno se determina, un anticuerpo humano se puede obtener mediante la preparación de un vector de expresión que comprenda la secuencia e introduciendo el vector en un anfitrión apropiado para expresarla (WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388; Annu. Rev. Immunol. (1994) 12, pp. 433-455; Nature Biotechnology (2005) 23 (9), pp. 1105-1116).

Un aspecto de la presente invención se refiere a una proteína aislada que se une a HER3. En una modalidad de la presente invención, una proteína de unión a HER3 aislada de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de la

región variable de la cadena pesada que comprende: (a) CDRH1 comprendida en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 36, 40, 42, 46, 50, 54, 60, 62, 66, 70, 74, 78, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 122, 126, 130, 134, 138, 142, 146, 150, 154, 158, 162, 166, 170, 174, 178, 182, 186, 190, 194, 198, 202, 206, 210, 214, 218, 222, 226 o 230, (b) CDRH2 comprendida en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 36, 40, 42, 46, 50, 54, 60, 62, 66, 70, 74, 78, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 122, 126, 130, 134, 138, 142, 146, 150, 154, 158, 162, 166, 170, 174, 178, 182, 186, 190, 194, 198, 202, 206, 210, 214, 218, 222, 226 o 230, y (c) CDRH3 comprendida en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 36, 40, 42, 46, 50, 54, 60, 62, 66, 70, 74, 78, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 122, 126, 130, 134, 138, 142, 146, 150, 154, 158, 162, 166, 170, 174, 178, 182, 186, 190, 194, 198, 202, 206, 210, 214, 218, 222, 226 o 230, y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que comprende: (d) CDRL1 comprendida en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 38, 44, 48, 52, 56, 58, 64, 68, 72, 76, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 114, 118, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188,

192, 196, 200, 204, 208, 212, 216, 220, 224, 228 o 232, (e) CDRL2 comprendida en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 38, 44, 48, 52, 56, 58, 64, 68, 72, 76, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 114, 118, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 216, 220, 224, 228 o 232, y (f) CDRL3 comprendida en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 38, 44, 48, 52, 56, 58, 64, 68, 72, 76, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 114, 118, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 216, 220, 224, 228 o 232.

La proteína de unión a HER3 aislada de la presente invención comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende (a) CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por uno seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 236, 251, 252, y 256; (b) CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por uno seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 258, 278, 280, y 282; y (c) CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por uno seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 283, 285, 309, 313, y 315, y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera que comprende (d) CDRL1 que compende la secuencia de

aminoácidos representada por uno seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 320, 334, 337, y 340; (e) CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por uno seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 343, 356, 351, y 344; y (f) CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por uno seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 360, 381, 385, y 387.

En otra modalidad de la presente invención, una proteína de unión aislada de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nos: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 36, 40, 42, 46, 50, 54, 60, 62, 66, 70, 74, 78, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 122, 126, 130, 134, 138, 142, 146, 150, 154, 158, 162, 166, 170, 174, 178, 182, 186, 190, 194, 198, 202, 206, 210, 214, 218, 222, 226 y 230, y/o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 38, 44, 48, 52, 56, 58, 64, 68, 72, 76, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 114, 118, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 216, 220, 224, 228 y 232.

En aún otra modalidad de la presente invención, una proteína de unión aislada de la invención comprende una

secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representada por SEQ ID NOs: 2 y 4, 6 y 8, 10 y 12, 14 y 16, 18 y 20, 22 y 24, 26 y 28, 30 y 32, 36 y 38, 42 y 44, 46 y 48, 50 y 52, 54 y 56, 60 y 58, 62 y 64, 66 y 68, 70 y 72, 74 y 76, 78 y 82, 80 y 82, 84 y 86, 88 y 90, 92 y 94, 96 y 98, 100 y 102, 104 y 106, 108 y 110, 112 y 114, 116 y 118, 122 y 124, 126 y 128, 130 y 132, 134 y 136, 138 y 140, 142 y 144, 146 y 148, 150 y 152, 154 y 156, 158 y 160, 162 y 164, 166 y 168, 170 y 172, 174 y 176, 178 y 180, 182 y 184, 186 y 188, 190 y 192, 194 y 196, 198 y 200, 202 y 204, 206 y 208, 210 y 212, 214 y 216, 218 y 220, 222 y 224, 226 y 228 ó 230 y 232, o, una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada representada por SEQ ID NO: 34, 40, 60, 62 o 120 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representada por SEQ ID NO: 58 ó 64, respectivamente.

La proteína de unión a HER3 aislada de la presente invención comprende más preferiblemente una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada representada por SEQ ID NO: 42, 54, 70, 92 ó 96 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representada por SEQ ID NO: 44, 56, 72, 94 ó 98.

Un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una

secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 2 y 4 se conoce como "U1-39", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 6 y 8 se conoce como "U1-40", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 10 y 12 se refiere como "U1-38", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 14 y 16 se conoce como "U1-41", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 18 y 20 se refiere como "U1-42", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 22 y 24 se conoce como "U1-43", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena

ligera representadas por SEQ ID NOs: 26 y 28 se conoce como "U1-44", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 30 y 32 se conoce como "U1-45", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 36 y 38 se conoce como "U1-47", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 42 y 44 se conoce como "U1-49", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 46 y 48 se conoce como "U1-50", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 50 y 52 se conoce como "U1-51", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 54 y 56 se denomina "U1-

53", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 60 y 58 se conoce como "U1-55", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ NOs: 62 y 64 se conoce como "U1-57", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 66 y 68 se conoce como "U1-58", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 70 y 72 se conoce como "U1-59", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 74 y 76 se conoce como "U1-52", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 78 y 82 se conoce como "U1-61", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de

la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 80 y 82 se conoce como "U1-61.1", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ NOs: 84 y 86 se conoce como "U1-62", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 88 y 90 se denomina como "U1-2", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ NOs: 92 y 94 se conoce como "U1-7", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 96 y 98 se conoce como "U1-9", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 100 y 102 se conoce como "U1-10", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de

aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 104 y 106 se conoce como "U1-12", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 108 y 110 se conoce como "U1-13", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ NOs: 112 y 114 se conoce como "U1-14", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 116 y 118 se conoce como "U1-15", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 122 y 124 se conoce como "U1-20", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 126 y 128 se conoce como "U1-21", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera

representadas por SEQ ID NOs: 130 y 132 se conoce como "U1-22", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ NOs: 134 y 136 se conoce como "U1-23", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 138 y 140 se conoce como "U1-24", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 142 y 144 se conoce como "U1-25", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 146 y 148 se conoce como "U1-26", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ NOs: 150 y 152 se conoce como "U1-27", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 154 y 156 se conoce como "U1-

28", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 158 y 160 se conoce como "U1-31", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 162 y 164 se conoce como "U1-32", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 166 y 168 se conoce como "U1-35", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ NOs: 170 y 172 se conoce como "U1-36", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 174 y 176 se conoce como "U1-37", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ NOs: 178 y 180 se conoce como "U1-34", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de

la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ NOs: 182 y 184 se conoce como "U1-1", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 186 y 188 se conoce como "U1-3", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 190 y 192 se conoce como "U1-4", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 194 y 196 se conoce como "U1-5", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 198 y 200 se conoce como "U1-6", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 202 y 204 se conoce como "U1-8", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de

aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ NOs: 206 y 208 se conoce como "U1-11", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 210 y 212 se conoce como "U1-16", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 214 y 216 se conoce como "U1-17", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 218 y 220 se conoce como "U1-18", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 222 y 224 se conoce como "U1-33", un anticuerpo que comprende una pesada cadena de secuencia de aminoácidos de la región variable y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 226 y 228 se conoce como "U1-29", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena

ligera representadas por SEQ ID NOs: 230 y 232 se conoce como "U1-30", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada representadas por SEQ ID NO: 34 se conoce como "U1-46", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada representadas por SEQ ID NO: 40 se conoce como "U1-48", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 60 y 58 se conoce como "U1-55.1", un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada representada por SEQ ID NO: 120 se conoce como "U1-19", y un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la región variable y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 62 y 64 se conoce como "U1-57.1". Estos anticuerpos se describen en detalle en los Ejemplos.

La proteína de unión a HER3 aislada de la presente invención comprende incluso más preferiblemente una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 42 y 44, respectivamente, una secuencia de aminoácidos de la región

variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 54 y 56, respectivamente, una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 70 y 72, respectivamente, una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 92 y 94, respectivamente, o una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representadas por SEQ ID NOs: 96 y 98, respectivamente, y aún más preferiblemente, la proteína de unión a HER3 es U1-49, U1-53, U1-59, U1-7 o U1-9, que son un anticuerpo anti-HER3.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

Anticuerpo U1-39

1 ADN de la Cadena Pesada:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGGTTCACCGTCAGTAGCAACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGGCTGGATTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGGTGGTAGCACATACTACGCA
GACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTT
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGCAGTGG
CTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

2 Proteína de Cadena Pesada:

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLDWVSVIYSGGSTYYA
DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGQWLDVWGQGTTVTVSS

3 ADN de la Cadena Ligera:

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAGGTCAAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACTATTTGGATTGG
TACCTGCAGAGGCCAGGGCAGTCTCCACAACTCCTGTTCTATTTGGGTTTTCATCGGGCC
TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCAGGCAAGCTCTACAAACTCCG
CTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

4 Proteína de Cadena Ligera:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQRPGQSPQLLFYLGFHRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCRQALQTPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-40

5 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGTACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTCCAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAT
AGGGAACTGGAACTTTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACG
GTCACCGTCTCCTC

6 Proteína de Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYSSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRELELYYYYYGMDVWGQGTT
VTVS

7 ADN de la Cadena Ligera:

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGTATAGTAATGGATACAACTATTTGGATTGG
TACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC
TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGATTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCG
CTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

8 Proteína de Cadena Ligera:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQALQTPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-38

9 ADN de la Cadena Pesada:

CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCTG
ACCTGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTAGTGGAGTGGGTGTGGGCTGGATCCGT
CAGCCCCCAGGAAAGGCCCTGGACTGGCTTGCACTCATTTATTGGAATGATGATAAGCGC

TACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTG
GTCCTTACAATGACCAACATGGATCTTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGTACACAGA
GACGAAGTTCGAGGGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

Proteína de Cadena Pesada:
QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALDWLALIYWNDDKR
YSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTMTNMDLVDTATYYCVHRDEVRGFDYWGQGTLVTVSS

ADN de la Cadena Ligera:
GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATACAGTGATGGATACACCTACTTGCATTGG
TTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTTATTTATAAGGTTTCTAACTGGGAC
TCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATC
AGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGGTGCACACTGGCCG
ATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

Proteína de Cadena Ligera:
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGYTYLHWFQQRPGQSPRRLIYKVSNWD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGAHWPITFGQGTRLEIK

Anticuerpo U1-41

ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGGTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGAT
CGGGAACTTGAGGGTTACTCCAACTACTACGGTGTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACG
GTCACCGTCTCCTC

Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARDRELEGYSNYYGVDVWGQGTT
VTVS

ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGCCATTAGCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGAATAATAGTCTCCCGATCACCTTCGGCCAA
GGGACACGACTGGAGATTAAA

Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNNSLPITFGQGTRLEIK

Anticuerpo U1-42

ADN de la Cadena Pesada:
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATC
TCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATG
CCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATAC
AGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTAC
CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACATGAA
AACTACGGTGACTACAACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

Proteína de Cadena Pesada:
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRY
SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHENYGDYNYWGQGTLVTVSS

ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTCGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTCGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCTTCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCACTTTACTGCTGTCAACAGAGTAACGGTTCCCCGCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

20 Proteína de Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFALYCCQQSNGSPLTFGGGTKVEIK

5

Anticuerpo U1-43

21 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAT
AGAGAGAGAGAGTGGGATGATTACGGTGACCCCCAAGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTC

10 22 Proteína de Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDREREWDDYGDPQGMDVWGQG
TTVTVS

23 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTACATTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCATGCTGCATCCAGTTTACAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTAACCCGCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCCAA

15 24 Proteína de Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLHWYQQKPGKAPKLLIHAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSNPLTFGGGTKVEIQ

Anticuerpo U1-44

25 ADN de la Cadena Pesada:

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATC
TCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATG
CCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTGGCCTGGTGACTCTGATACCATATAC
AGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTAC
CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACATGAA
20 AACTACGGTGACTACAACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

26 Proteína de Cadena Pesada:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIWPGDSDTIY
SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHENYGDYNYWGQGTLVTVSS

27 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTCGAAGTTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCG
GGGAATGCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCACTTTACTACTGTCAACAGAGTATCAGTTCCCCGCTCACTTTCGGCGGA
25 GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

28 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRSYLNWYQQKPGNAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFALYYCQQSISSPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo (U1-45)
29 ADN de Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCAGTTATGATATCAACTGGGTGCGACAGGCC
ACTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATGAACCCTAACAGTGGTGACACTGGCTAT
GCACAGGTGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCTGGAACACCTCCATAAGCACAGCCTAC
ATGGAACTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGATTTGGG
GATCTCCCGTATGACTACAGTTACTACGAATGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTG
GTCACCGTCTCCTC
30 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGDTGY
AQVFQGRVTMTWNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFGDLPYDYSYYEWFDPWGQGTL
VTVS
31 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGCCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAGACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCAGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA
32 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQRPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo (U1-46
33 ADN de Cadena Pesada:
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTC
ACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAACTGGATCAGG
CAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTAT
AATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAAC
CAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCA
AGAGATCTCTACGATTTTTGGAGTGGTTATCCCTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGC
CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTC
34 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWY
NDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDLYDFWSGYPYYYGMDVWG
QGTTVTVS

Anticuerpo U1-47
35 ADN de Cadena Pesada:
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTC
ACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAACTGGATCAGG
CAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTAT
AATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAAC
CAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCA
AGAGATTACTATGGTTCGGGGAGTTTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAA
GGGACCACGGTCACCGTCTCCTC
36 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWY

NDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDYYGSGSFYYYYGMDVWGQ
GTTVTVS

37 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGGTCCTGATCTATGCTGCATCCAATTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA

38 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKVLIYAASNLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-48

39 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCC
GCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCATATCTATACCAGTGGGAGCACCAACTACAAC
CCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAAGCGATT
TTTGGAGTGGGCCCCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTC
ACCGTCTCCTC

40 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPAGKGLEWIGHIYTSGSTNYN
PSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREAIFGVGPYYYYGMDVWGQGTTV
TVS

Anticuerpo U1-49

41 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAATATTGGTGGCACAAACTGT
GCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGA
CGGTATAGCAGCAGCTGGTCCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACC
ACGGTCACCGTCTCCTC

42 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNIGGTNC
AQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGGRYSSSWSYYYYGMDVWGQGT
TVTVS

43 ADN de la Cadena Ligera:
GATATTCTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCACCCCTGGACAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCTTAGTGATGGAGGGACCTATTTGTATTGG
TACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCACAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTTC
TCTGGAGTGCCAGATAGGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATC
AGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTATGCAGCTTCCG
ATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAAATTAAA

44 Proteína de Cadena Ligera:
DILMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLLSDGGTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQSMQLPITFGQGTRLEIK

Anticuerpo U1-50

45 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCGTCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGG
CAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGCACCAAC
TACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGG
GGGGACAGTAACTACGAGGATTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTC

46 Proteína de Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGGYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGDSNYEDYYYYYGMDVWGQG
TTVTVS

47 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCATCTATTTACATTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCTTGATCTCTGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCA
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGAAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACACTTCCCCGATCACCTTCGGCCAA
GGGACACGACTGGAGATTAAA

48 Proteína de Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISIYLHWYQQKPGKAPKLLISAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTIRSLQPEDFATYYCQQSYTSPITFGQGTRLEIK

49 Anticuerpo U1-51

ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCC
CCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAAC
CCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGCACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTCGAGT
TACTATGATAGTAGTGGTTATTACTTATACTACTACGCTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTC

50 Proteína de Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYN
PSLKSRVTISVDTSKHQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDSSYYDSSGYYLYYYAMDVWGQG
TTVTVS

51 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACC
ATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTCCTGGGCATCTACCCGG
GAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
ATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATACTACT
CCTCTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA

52 Proteína de Cadena Ligera:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLISWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYTTPLTFGPGTKVDIK

Anticuerpo U1-53

53 ADN de la Cadena Pesada:

GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTATCTATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTAGTAGTAGTACCATATACTAC
GCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGG

GGTGACTTCGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA

54 Proteína de Cadena Pesada:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYY
ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMVTVSS

55 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTACCAACTATTTGAATTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGCATCCAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATATTGCAACATATAACTGTCAACAGTGTGAAAATTTCCCGATCACCTTCGGCCAA
GGGACACGACTGGAGATTAAA

56 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPS
RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLEIK

Anticuerpo U1-55

57 ADN de la Cadena Ligera:
GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGTATAGTAATGGATACAAGTATTTGGATTGG
TACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC
TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTATTGCATGCAGGCTCTACAAACTCCG
ATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

58 Proteína de Cadena Ligera:
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYKYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGQGTRLEIK

Anticuerpo (U1-55.1)

59 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCGTCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAACTGGATCCGG
CAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCAATTACAGTGGGAGCACCAAC
TACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAT
CGAGAACTGGAACTTTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACG
GTCACCGTCTCCTC

60 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGGYYWNWIRQPPGKGLEWIGYINYSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRELELYYYYYGMDVWGQGTT
VTVS

Anticuerpo (U1-57)

61 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCTGAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCGTCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAACTGGATCCGG
CAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCAATTACAGTGGGAGCACCAAC
TACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAT
CGAGAACTGGAACTTTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACG
GTCACCGTCTCCTC

62 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGGYYWNWIRQPPGKGLEWIGYINYSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRELELYYYYYGMDVWGQGTT

Anticuerpo U1-57.1

63 ADN de la Cadena Ligera:

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGTATAGTAATGGATACAAGTATTTGGATTGG
TACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCATGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC
TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTATTGCATGCAGGCTCTACAAACTCCG
ATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

64 Proteína de Cadena Ligera:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYKYLDWYLQKPGQSPQLMIYLGSNRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGQGTRLEIK

Anticuerpo U1-58

65 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTAT
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGCAGCT
CGCCTTGACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC
TCA

66 Proteína de Cadena Pesada:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAARLDYYYGMDVWGQGTTVTVS
S

67 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCTCC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAACAGCTATTTAAATTGGTTTCAGCAGAAGCCA
GGGAAAGCCCCTCAGCTCCTGATCTTTGGTGCATCCGGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTTCCCCGCTCACCTTCGGCCAA
GGGACACGACTGGAGATTAAA

68 Proteína de Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCRASQSINSYLNWFQQKPGKAPQLLIFGASGLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQSYSSPLTFGQGTRLEIK

Anticuerpo U1-59

69 ADN de la Cadena Pesada:

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCC
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAAGCACCAACTACAAC
CCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAAACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAAGTGG
ACCTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCTGGTCACTGTCTCCTCA

70 Proteína de Cadena Pesada:

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYN
PSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSS

71 ADN de la Cadena Ligera:

GACATCGAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACC
ATCAACTGCAGGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAGCAATAGGAACTACTTAGCT
TGGTACCAGCAGAACCCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCTTCTACCCGG

GAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
ATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACT
CCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

72 Proteína de Cadena Ligera:
DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-52

73 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATGGGGAACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTGAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGAGGG
GGAACTGGAACCAATTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACG
GTCACCGTCTCCTC

74 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWMGNIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSENQFSLKLNSVTAADTAVYYCARGGTGTNYYYYYGMDVWGQGTT
VTVS

75 ADN de la Cadena Ligera:
GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCTGGGCCACTGGCATCCCA
AACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

76 Proteína de Cadena Ligera:
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSWATGIP
NRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-61

77 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGTCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGATGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGAAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAT
TCCGAGTCCGAGTATAGCAGCTCGTCGAACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACC
ACGGTCACCGTCTCCTC

78 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGVSISSGGYYWSWIRQHPGMGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISEDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDSESEYSSSSNYGMDVWGQGT
TVTVS

Anticuerpo U1-61.1

79 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGTCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGATGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGAAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAT
TCCGAGTCCGAGTATAGCAGCTCGTCGAACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACC

ACGGTCACCGTCTCCTC

80 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGVSISSGGYYWSWIRQHPGMGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISEDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDSESEYSSSSNYGMDVWGQGT
TVTVS

81 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAATCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGACCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAGGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGTGGCAGTGTATCTGGGACAGATTTCACCCTCACCGTCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTAACCCGCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

82 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQTISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQGGVPS
RFSGSVSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQSYSNPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-62 (2.9.1)

83 ADN de la Cadena Pesada:
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATC
TCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGTTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATG
CCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATAC
AGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATGTCAGCCGACAAGTCCATCAGTACCGCCTAC
CTGCAGCTGAGCAGCCATGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACAGAT
GGCTGGAAACTACGTACATCACGGGTGATCGAGACGTCCTGGGGCCAAGGGACCACGGTC
ACCGTCTCCTC

84 Proteína de Cadena Pesada:
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRY
SPSFQGQVTMSADKSISTAYLQLSSHEGLGHRHVLLCETDGWKLRTSRVIETSWGQGTTV
TVS

85 ADN de la Cadena Ligera:
GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTATCAGCATCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGCAGTTTTGGC
CAGGGGACCAAACTGGAGATCAAA

86 Proteína de Cadena Ligera:
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVISIYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPCSFGQGTKLEIK

Anticuerpo U1-2

87 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCG
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

88 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTV
SS

89 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGATACCT
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAACAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATGGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

90 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQIPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTINSLQPEDFATYYCLQHNGYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-7

91 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGATACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCG
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

92 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTV
SS

93 ADN de la Cadena Ligera:
GACTTCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGCGCAAGTCAGGACATTCGAAATGATTTAGGCTGGTATCGGCAGAAACCT
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

94 Proteína de Cadena Ligera:
DFQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDLGWYRQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-9

95 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGATACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAATAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCG
GATTACGATTTTTGGAATGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

96 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISIDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWNGYFDYWGQGTLVTV
SS

97 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCGGCAGAAACCT
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT

GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA

98 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDLGWYRQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-10

99 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTACACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGACTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCA
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

100 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPTQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTV
SS

101 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAATTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA

102 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNNYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-12

103 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGTTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCC
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

104 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTV
SS

105 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAATTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA

106 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNNYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1- 13

107 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAG
GACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

108 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDDGMDVWGQGTTVTVSS

109 ADN de la Cadena Ligera:
GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC
ATTTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACTATTTGGAATGG
TACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCCCCACAGTTCATGATTTATTTGGGGTCTAATCGGGCC
TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCG
ATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

110 Proteína de Cadena Ligera:
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLEWYLQKPGQSPQFMIYLGSNRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGQGTRLEIK

Anticuerpo U1-14

111 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGTACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCG
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

112 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQYPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTV
SS

113 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATACTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

114 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNTYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-15

115 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCGTCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGG
CAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGCACCAAC
TACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTC

TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAT
GGGGACGTGGATACAGCTATGGTCGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTC
ACCGTCTCCTCA

116 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGGYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGDVDTAMVDAFDIWGQGTMV
TVSS

117 ADN de la Cadena Ligera:
GAAATTGTATTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTTTAAGCGGCAACTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAG
CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCATCATCTGTGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCACAAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGATAGGTCACCGCTCACTTTCGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

118 Proteína de Cadena Ligera:
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLSGNYLAWYQQKPGQAPRLIICGASSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYDRSPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-19

119 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGA
GATTACGATTTTTGGAGTGGAGAGTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

120 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGDYDFWSGEFDYWGQGTLVTV
SS

Anticuerpo U1-20

121 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATGACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGGTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAT
CAGGGGCAGGACGGATACAGCTATGGTTACGGCTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGC
CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTC

122 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYDSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDQGQDGYSYGYGYYYGMDVWG
QGTTVTVS

123 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTACGTTGCATCCAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAGTGTGATAATCTCCCTCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

124 Proteína de Cadena Ligera:

124 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYVASNLETGVPS
RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQCDNLPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-21

125 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGATACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCG
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTC

126 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTV
S

127 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCGGCAGAAACCT
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

128 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDLGWYRQKPGKAPKRLIYAASRLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-22

129 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCC
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

130 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTV
SS

131 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

132 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQNGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-23

Anticuerpo U1-23

133 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCG
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAATCCTGGTCACCGTC
TCCTC

134 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGILVTV
S

135 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATTTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

136 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-24

137 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGTTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCC
GATTACGATTTTTGGAATGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

138 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWNGYFDYWGQGTLVTV
SS

139 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAATTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA

140 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNNYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-25

141 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC

TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCC
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

142 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTV
SS

143 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAATGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

144 Proteína de Cadena Ligera:
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQNGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-26

145 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGTACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGGGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGCC
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTC

146 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQYPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLGSVTAADTAVYFCARADYDFWSGYFDFWGQGTLVTV
S

147 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATGGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

148 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNGYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-27

149 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGTACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGGGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGCC
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTC

150 Proteína de Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQYPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLGSVTAADTAVYFCARADYDFWSGYFDFWGQGTLVTV
S

151 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATGGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

152 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNGYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-28

153 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCG
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

154 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDSWGQGTLVTV
SS

155 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGATACCT
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATGGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA

156 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQIPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNGYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-31

157 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAACTATGGTATCAGCTGGGTGCGGCAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACGATGGTTACAGAAACTAT
GCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGACCACTGCCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGTT
CAAGACTACGGTGACTACGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

158 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYDGYRNY
AQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDVQDYGDYDYFDYWGQGTLVTV
SS

159 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC

ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGTTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAACCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGATTCAGGGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTCCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCCATCACCTTCGGCCAA
GGGACACGACTGGAGATTAAA

160 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPS
RFRGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPITFGQGTRLEIK

Anticuerpo U1-32

161 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTTACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGACCACCTAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
GCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCC
GATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

162 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPLQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGTTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFALKLNSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTV
SS

163 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAGGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTCAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCTCTCTCACAATCTCCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

164 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAGQGIRNDLGWYQQKPGKAPQRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFSLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-35

165 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATATATTAGTAGTAGTGGTAATAACATATACCAC
GCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGAGA
TATAGTGGCTACGACGACCCTGATGGTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACC
GTCTCTTCA

166 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGNNIYH
ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYSGYDDPDGFDIWGQGTMVT
VSS

167 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTTAAGTTGGTTTCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCACGATGCATCCAATTTGGAAACAGGGGTCCCTTCA
AGGTTCAGTGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAGTATGATAATCCCCCGTGCAGTTTTGGCCAG
GGGACCAAGCTGGAGATCAAA

168 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLSWFQQKPGKAPKLLIHDASNLETGVPS
RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNPPCSFGQGTKLEIK

Anticuerpo U1-36

169 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTTATTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGACCACCTAC
TACAATCCGTCCTTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTC
TCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCC
GATTACGATTTTTGGAGTGGTCACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCA

170 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGYYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGTTY
YNPSFKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGHFDYWGQGTLVTV
SS

171 ADN de la Cadena Ligera:
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA

172 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-37

173 ADN de la Cadena Pesada:
CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACGATGGTCACACAAACTAT
GCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAACACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGAGACCCC
CATGACTACAGTAACTACGAGGCTTTTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTC

174 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYDGHTNY
AQKLQGRVTMTTDTSTNTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDPHDYSNYEAFDFWGQGTLVTV
S

175 ADN de la Cadena Ligera:
atgaggtcccctgctcagctcctggggctcctgctactctggctccgaggtgccagatgtg
acatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccat
cacttgccgggcaagtcagagcattagcagttatttaaattggtatcagcagaaaccaggg
aaagcccctaacctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaagat
tcagtggcagtggatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtctgcaacctgaaga
ttttgcaacttactactgtcaacagagttacagtacccccatcaccttcggccaagggaca
cgactggagattaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatg
agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagaga
ggccaaagtacagtggaaggtggataacgcc

176 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPITFGQGTRLEIK

Anticuerpo U1-34

177 ADN de la Cadena Pesada:
accatggactggacctggagggtccttttcttggtggcagcagcaacaggtgcccactccca
ggttcagctggtgcagtctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcct
gcaaggcttctggttacacctttaccaactatggtatcagctgggtgcggcaggcccctgga
caagggcttgagtggatgggatggatcagcgcttacgatggttacagaaactatgcacagaa
gctccagggcagagtcaccatgaccacagacacatccacgaccactgcctacatggagctga
ggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagagatgttcaagactacggt
gactacgactactttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcttccac
caagggcccatccgtcttccccctggtgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccg
ccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccg

178 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYDGYRNYA
QKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDVQDYGDYDYFDYWGQGTLVTVSS

179 ADN de la Cadena Ligera:
cagctcctggggctcctgctactctggctccgaggtgccagatgtgacatccagatgaccc
agtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaag
tcagagcattagcagttatttaaattggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaacctc
ctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaagattcagtggcagtggat
ctgggacagatttcactctcaccatcagcagtctgcaacctgaagattttgcaacttacta
ctgtcaacagagttacagtacccccatcaccttcggccaagggacacgactggagattaaa
cgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctg
gaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtg
gaaggtggataacgcc

180 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPITFGQGTRLEIK

Anticuerpo U1-1

181 ADN de la Cadena Pesada:
catctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagc
tgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgt
ctctggtggctccatcaacagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccaggg
aagggcctggagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccc
tcaagagtcgagttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgag
ctctgtgactgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagcagattacgatttttgg
agtggttactttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccacca
agggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacaacggc
cctgg

182 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSINSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTVSS

103 ADN de la Cadena Ligera:
atgagggtccctgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtga
catccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatca
cttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccagggaaa
gcccctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcag
cggcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagatttttg
caacttattactgtctacagcataatagttacccgtggacgttcggccaagggaccaaggtg
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt
gaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag
tacagtggaaggtggataacgc

184 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-3

185 ADN de la Cadena Pesada:
tggttcttccttctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcagga
gtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtg
gctccatcagcagtggtggttactactggagctggatccgccagcacccagggaagggcctg
gagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccctcaagagtcg
agttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactg
ccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagatggctatgatagtagtggttattaccac
ggctactttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaaggg
cc

186 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGYDSSGYYHGYFDYWGQGTLVT
VSS

187 ADN de la Cadena Ligera:
H3_130_1N1K
caggtcttcatttctctgttgctctggatctctggtgcctacggggacatcgtgatgaccc
agtctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcaagtccag
ccagagtgttttatacagctccaacaataagaactacttagcttggtaccagcagaaacca
ggacagcctcctaagctgctcatttactgggcatctacccgggaatccggggtccctgacc
gattcagtggcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcaggctga
agatgtggcagtttattactgtcagcaatattatagtactccgctcactttcggcggaggg
accaaggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctg
atgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccag
agaggccaaagtacagtggaaggtggataacgc

188 Proteína de Cadena Ligera:
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-4

H3_133_1N1G1

189 ADN de la Cadena Pesada:

ctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgca
ggagtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctg
gtggctccatcagtagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccagggaagggc
ctggagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccctcaagag
tcgagttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagttgagctctgtga
ctgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagccgattacgatttttggagtggttat
tttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatc
ggtcttcccccctggcaccctc

190 Proteína de Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTVSS

191 ADN de la Cadena Ligera:

H3_133_1N1K

gtgcccgctcagcgcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtgacatcc
agatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttg
ccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccagggaaagcc
cctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcagcg
gcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttgc
aacttattactgtctacagcataataattacccgtggacgttcggccaagggaccaaggtg
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagt
tgaaatctggaactg

192 Proteína de Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNNYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-5

193 ADN de la Cadena Pesada:

H3_138_1N1G1

tggttcttccttctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcagga
gtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtg
gctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccagggaagggcctg
gagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccctcaagagtcg
agttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactg
ccgcggacacggccgtgtatttctgtgcgagagccgattacgatttttggagtggttatttt
gactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcc

194 Proteína de Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYYN
PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTVSS

195 ADN de la Cadena Ligera:

H3_138_1N1K

atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtga
catccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatca
cttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccagggaaa

gcccctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcag
cggcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttg
caacttattactgtctacagcataatacttacccgtggacgttcggccaagggaccaaggtg
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt
gaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag
tacagtggaaggtggataacgc

196 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNTYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-6

197 ADN de la Cadena Pesada:
H3_162_1N1G1
tggttcttccttctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcagga
gtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtg
gctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccagggaagggcctg
gagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccctcaagagtcg
agttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactg
ccgcggacacggccgtgtatttctgtgcgagagccgattacgatttttggaatggttatttt
gactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggccc

198 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARADYDFWNGYFDYWGQGTLVTV
SS

199 ADN de la Cadena Ligera:
H3_162_1N1K
atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtga
catccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatca
cttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccagggaaa
gcccctaagcgcctgatctatgctgcttccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcag
cggcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttg
caacttattactgtctacagcataatacttacccgtggacgttcggccaagggaccaaggtg
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt
gaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag
tacagtggaaggtggataacgcc

200 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNTYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-8

201 ADN de la Cadena Pesada:
H3_174_1N1G1
ttggtggcagcagctacaggcacccacgcccaggtccagctggtacagtctggggctgaggt
gaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggtttccggatacaccctcactgaat
tatccatgtactgggtgcgacaggctcctggaaaagggcttgagtggatgggaggttttgat

cctgaagatggtgaaacaatctacgcacagaagttccagggcagagtcaccatgaccgagga
cacatctacagacacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgt
attactgtgcaactgggtggaactacgtctttgactactggggccagggaaccctggtcacc
gtctcctcagcctccaccaagggccc

202 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMYWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYA
QKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGWNYVFDYWGQGTLVTVSS

203 ADN de la Cadena Ligera:
H3_174_1N1K
ggatccagtggggatattgtgatgactcagtctccactctccctgcccgtcacccctggaga
gccggcctccatctcctgcaggtccagtcagagcctcctgcatagtaatggatacaactatt
tggattggtacctgcagaagccagggcagtctccacagctcctgatctatttggattctcat
cgggcctccggggtccctgacaggttcagtggcagtggatcaggcacagattttacactgaa
aatcagcagagtggaggctgaggatgttggggtttattactgcatgcaagctctacaaactc
cgctcactttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtc
ttcatcttcccgccat

204 Proteína de Cadena Ligera:
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLDSHRA
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-11
205 ADN de la Cadena Pesada:
H3_178_1N1G1
tggttcttccttctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcagga
gtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtg
gctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccagggaagggcctg
gagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccctcaagagtcg
agttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactg
ccgcggacacggccgtgtatttctgtgcgagagccgattacgatttttggagtggttatttt
gactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatcgag
tcttccccctgg

206 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTV
SS

207 ADN de la Cadena Ligera:
H3_178_1N1K
atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtg
acatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccat
cacttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccaggg
aaagcccctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggt
tcagcggcagtggatctgggacaaaattcactctcactatcagcagcctgcagcctgaaga
ttttgcaacttattactgtctacagcataatacttacccgtggacgttcggccaagggacc
aaggtggaaatcagacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatg
agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagaga
ggccaaagtacagtggaaggtggataacgcc

208 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTKFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNTYPWTFGQGTKVEIR

Anticuerpo U1-16

209 ADN de la Cadena Pesada:
H3_221_1N1G1
accatgaaacatctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtccc
aggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcac
ctgcactgtctctggtggctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccag
cacccagggaagggcctggagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactaca
acccgtccctcaagagtcgagttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccct
gaagctgagctctgtgactgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagcggattac
gatttttggagtggttatttgactactggggccagggaatcctggtcaccgtctcctcag
cctccaccaagggcccatcggtcttcccctggcaccctcctccaagaacacctctggggg
cacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcctgg
aactcaggcgccctg

210 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGILVTVSS

211 ADN de la Cadena Ligera:
H3_221_1N1K
atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgt
gacatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
atcacttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaacca
gggaaagcccctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatca
aggttcagcggcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcct
gaagattttgcaacttattactgtctacagcataatagttacccgtggacgttcggccaa
gggaccaaggtggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcca
tctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctat
cccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcc

212 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-17

213 ADN de la Cadena Pesada:
H3_224_1N1G1
tggttcttccttctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcagg
agtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctgg
tggctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccagggaagggc
ctggagtggattggatacatctattacagtgggagcacctactacaattcgtccctcaaga
gtcgagttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgt
gactgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagcggattacgatttttggagtggt
tattttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcc
catcg

214 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY
NSSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTVSS

215 ADN de la Cadena Ligera:
H3_224_1N1K
ggtgccaggtgtgacatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggag
acagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatca
gcagaaacctgggaaagcccctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggg
gtcccatcaaggttcagcggcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcc
tgcagcctgaagattttgcaacttattactgtctacagcacaatagttacccgtggacgtt
cggccaagggaccaaggtggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttc
ccgcca

216 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-18

217 ADN de la Cadena Pesada:
H3_227_1N1G1
aggttcttccttctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcagg
agtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctgg
tggctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccagggaagggc
ctggagtggattggatacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccctcaaga
gtcgagttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgt
gactgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagccgattacgatttttggagtggt
tattttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcc
catcggtcttcccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctggg
ctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccct

218 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTVSS

219 ADN de la Cadena Ligera:
H3_227_1N1K
atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtga
catccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatca
cttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccagggaaa
gcccctaagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcag
cggcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttg
caacttattactgtctacagcataatagttacccgtggacgttcggccaagggaccaaggtg
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt
gaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag
tacagtggaaggtggataacg

220 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-33

221 ADN de la Cadena Pesada:

H4_14_1N1G4

ctgtggttcttccttctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgc
aggagtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctc
tggtggctccatcagcagtggtgattactactggagctggatccgccagcacccagggaag
ggcctggagtggattgggtacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccctca
agagtcgagttaccatgtcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctc
tgtgactgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagccgattacgatttttggagt
ggtcactttgactgctggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcttccaccaagg
gccccatccgtcttccccc

222 Proteína de Cadena Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYY
NPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARADYDFWSGHFDCWGQGTLVTVSS

223 ADN de la Cadena Ligera:

H4_14_1N1K

atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtga
catccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatca
cttgccgggcaagtcagggcattagagatgatttaggctggtatcagcagaaaccagggaaa
gcccctaagcgcctgatctatgctgaatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcag
cggcagtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttg
caacttattactgtctacagcatcatagttacccgtggacgttcggccaagggaccaaggtg
gaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcc

224 Proteína de Cadena Ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRDDLGWYQQKPGKAPKRLIYAESSLQSGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHHSYPWTFGQGTKVEIK

Anticuerpo U1-29

225 ADN de la Cadena Pesada:

H4_107_1N1G4

tggctgagctgggttttcctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctgg
tggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtc
tggattcaccttcaatagctatgacatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctg
gagtgggtggcagttatatggtatgatggaagtaataaatactatgcagactccgtgaagg
gccgattcaccatctctagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcct
gagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagaccgcttgtgtactaatggtgta
tgctatgaagactacggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcag
cttccaccaagggcccatccgtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagag
cacagccgccctgggc

226 Proteína de Cadena Pesada:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYA
DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLCTNGVCYEDYGMDVWGQGTTV
TVSS

227 ADN de la Cadena Ligera:

H4_107_1N1K

atgagggtccctgctcagctcctggggctcctgctgctctggctctcaggtgccagatgtga
catccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatca

cttgccaggcgagtcaggacattagcaactatttaaattggtatcagcagaaaccagggaaa
gcccctaaggtcctgatctacgatgcatccaatttggaaacaggggtcccatcaaggttcag
tggaagtggatctgggacagattttactttcaccatcagcagcctgcagcctgaagatgttg
caacatattactgtcaacactatgatactctcccgctcactttcggcggagggaccaaggtg
gagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt
gaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag
tacagtgg

228 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYDASNLETGVPSR
FSGSGSGTDFTFTISSLQPEDVATYYCQHYDTLPLTFGGGTKVEIK

Anticuerpo U1-30

229 ADN de la Cadena Pesada:
H4_116_1_1N1G4
ggactgtgcaagaacatgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatg
ggtcctgtcccaggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagcctttacagaccc
tgtccctcacctgcactgtctctggtggctccatcagcagtggtgattactactggagctgg
atccgccagcacccagggaagggcctggagtggattgggtacatctattacagtgggaccac
ctactacaacccgtccctcaagagtcgagttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagt
tcgccctgaagctgaactctgtgactgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagcc
gattacgatttttggagtggttattttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctc
ctcagcttccaccaagggcccatccgtcttccccctgg

230 Proteína de Cadena Pesada:
QVQLQESGPGLVKPLQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGTTYY
NPSLKSRVTISVDTSKNQFALKLNSVTAADTAVYYCARADYDFWSGYFDYWGQGTLVTVSS

231 ADN de la Cadena Ligera:
H4_116_1_1N1K
atgagggtccctgctcagctcctggggctcctgctgctctggttcccaggtgccaggtgtg
acatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccat
cacttgccgggcaggtcagggcattagaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccaggg
aaagcccctcagcgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggt
tcagcggcagtggatctgggacagaattctctctcacaatctccagcctgcagcctgaaga
ttttgcaacttattactgtctacagcataatagttacccgtggacgttcggccaagggacc
aaggtggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatg
agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagaga
ggccaaagtacagtggaaggtggataacgcccttccaatcggg

232 Proteína de Cadena Ligera:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAGQGIRNDLGWYQQKPGKAPQRLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTEFSLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKVEIK

Listado de secuencias de CDR

Anticuerpos de cadena	Número de patente:	CDR1	CDR2	CDR3
Pesada	U1-1	GGSINSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
Pesada	U1-2	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLRS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNGYPWT
Pesada	U1-3	GGSISSGGYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	DGYDSSGYYHGYFDY
Ligera		KSSQSVLYSSNNKNYLA	WASTRES	QQYYSTPLT
Pesada	U1-4	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNNYPWT
Pesada	U1-5	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNTYPWT
Pesada	U1-6	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWNGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNTYPWT
Pesada	U1-7	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQDIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
Pesada	U1-8	GYTLTELSMY	GFDPEDGETIYAQKFQG	GWNYVFDY
Ligera		RSSQSLLHSNGYNYLD	LDSHRAS	MQALQTPLT
Pesada	U1-9	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWNGYFDY
Ligera		RASQDIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
Pesada	U1-10	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNNYPWT
Pesada	U1-11	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNTYPWT
Pesada	U1-12	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNNYPWT
Pesada	U1-13	GGSISSGGYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	EDDGMDV
Ligera		RSSQSLLHSNGYNYLE	LGSNRAS	MQALQTPIT
Pesada	U1-14	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNTYPWT

Pesada	U1-15	GGSVSSGGYYWS	YIYYSGSTNYNPSLKS	DGDVDTAMVDAFDI
Ligera		RASQSLSGNYLA	GASSRAT	QQYDRSPLT
Pesada	U1-16	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
Pesada	U1-17	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNSSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
Pesada	U1-18	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
Pesada	U1-19	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	GDYDFWSGEFDY
Ligera		sequence not available		
Pesada	U1-20	GGSISSGGYYWS	YIYDSGSTYYNPSLKS	DQGQDGYSYGYGYYYGMDV
Ligera		QASQDISNYLN	VASNLET	QQCDNLPLT
Pesada	U1-21	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQDIRNDLG	AASRLQS	LQHNSYPWT
Pesada	U1-22	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQN	LQHNSYPWT
Pesada	U1-23	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
Pesada	U1-24	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWNGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNNYPWT
Pesada	U1-25	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQN	LQHNSYPWT
Pesada	U1-26	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDF
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNGYPWT
Pesada	U1-27	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDF
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNGYPWT
Pesada	U1-28	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDS
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNGYPWT
Pesada	U1-29	GFTFNSYDMH	VIWYDGSNKYYADSVKG	DRLCTNGVCYEDYGMDV
Ligera		QASQDISNYLN	DASNLET	QHYDTLPLT
Pesada	U1-30	GGSISSGDYYWS	YIYYSGTTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RAGQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT

Pesada	U1-31	GYTFTNYGIS	WISAYDGYRNYAQKLQG	DVQDYGDYDYFDY
Ligera		RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPIT
Pesada	U1-32	GGSISSGDYYWS	YIYYSGTTYYNPSLKS	ADYDFWSGYFDY
Ligera		RAGQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
Pesada	U1-33	GGSISSGDYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	ADYDFWSGHFDC
Ligera		RASQGIRDDLG	AESSLQS	LQHHSYPWT
Pesada	U1-34	GYTFTNYGIS	WISAYDGYRNYAQKLQG	DVQDYGDYDYFDY
Ligera		RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPIT
Pesada	U1-35	GFTFSDYYMS	YISSSGNNIYHADSVKG	ERYSGYDDPDGFDI
Ligera		QASQDISNYLS	DASNLET	QQYDNPPCS
Pesada	U1-36	GGSISSGYYYWS	YIYYSGTTYYNPSFKS	ADYDFWSGHFDY
Ligera		RASQGIRNDLG	AASSLQS	LQHNSYPWT
Pesada	U1-37	GYTFTSYGIS	WISAYDGHTNYAQKLQG	DPHDYSNYEAFDF
Ligera		RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPIT
Pesada	U1-38	GFSLSTSGVGVG	LIYWNDDKRYSPSLKS	RDEVRGFDY
Ligera		RSSQSLVYSDGYTYLH	KVSNWDS	MQGAHWPIT
Pesada	U1-39	GFTVSSNYMS	VIYSGGSTYYADSVKG	GQWLDV
Ligera		RSSQSLLHSNGYNYLD	LGFHRAS	RQALQTPLT
Pesada	U1-40	GGSISSGGYYWS	YIYSSGSTYYNPSLKS	DRELELYYYYYGMDV
Ligera		RSSQSLLYSNGYNYLD	LGSNRAS	MQALQTPLT
Pesada	U1-41	GGSISSGGYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	DRELEGYSNYYGVDV
Ligera		RASQAISNYLN	AASSLQS	QQNNSLPIT
Pesada	U1-42	GYSFTSYWIG	IIYPGDSDTRYSPSFQG	HENYGDYNY
Ligera		RASQSIRSYLN	AASSLQS	QQSNGSPLT
Pesada	U1-43	GGSISSGGYYWS	YIYYSGSTYYNPSLRS	DRERENDDYGDPQGMDV

Ligera		RASQSISSYLH	AASSLQS	QQSYSNPLT
Pesada	U1-44	GYSFTSYWIG	IIWPGDSDTIYSPSFQG	HENYGDYNY
Ligera		RASQSIRSYLN	AASSLQS	QQSISSPLT
Pesada	U1-45	GYTFTSYDIN	WMNPNSGDTGYAQVFQG	FGDLPYDYSYYEWFDP
Ligera		RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPLT
Pesada	U1-46	GDSVSSNSAAWN	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	DLYDFWSGYPYYYGMDV
Ligera		secuencia no disponible		
Pesada	U1-47	GDSVSSNSAAWN	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	DYYGSGSFYYYYGMDV
Ligera		RASQSISSYLN	AASNLQS	QQSYSTPRT
Pesada	U1-48	GGSISSYYWS	HIYTSGSTNYNPSLKS	EAIFGVGPYYYYGMDV
Ligera		secuencia no disponible		
Pesada	U1-49	GYTFTGYYMH	WINPNIGGTNCAQKFQG	GGRYSSSWSYYYYGMDV
Ligera		KSSQSLLLSDGGTYLY	EVSNRFS	MQSMQLPIT
Pesada	U1-50	GGSVSSGGYYWS	YIYYSGSTNYNPSLKS	GGDSNYEDYYYYYGMDV
Ligera		RASQSISIYLH	AASSLQS	QQSYTSPIT
Pesada	U1-51	GGSISSYYWS	YIYYSGSTNYNPSLKS	DSSYYDSSGYYLYYYAMDV
Ligera		KSSQSVLYSSNNKNYLA	WASTRES	QQYYTTPLT
Pesada	U1-52	GGSISSGGYYWS	NIYYSGSTYYNPSLKS	GGTGTNYYYYYGMDV
Ligera		RASQSVSSSYLA	GASSWAT	QQYGSSPLT
Pesada	U1-53	GFTFSIYSMN	YISSSSSTIYYADSVKG	DRGDFDAFDI
Ligera		QASQDITNYLN	DASNLET	QQCENFPIT
Pesada	U1-55.1	GGSVSSGGYYWN	YINYSGSTNYNPSLKS	DRELELYYYYYGMDV
Ligera	U1-55	Idénticas a las de U1-55		
Pesada		Idénticas a las de U1-55.1		
Ligera	U1-57.1	RSSQSLLYSNGYKYLD	LGSNRAS	MQALQTPIT
Pesada		Idénticas a las de U1-57		

Ligera		RSSQSLLYSNGYKYLD	LGSNRAS	MQALQTPIT
Pesada	U1-57	GGSVSSGGYYWN	YINYSGSTNYNPSLKS	DRELELYYYYYGMDV
Ligera		Idénticas a las de U1-57.1		
Pesada	U1-58	GFTFSSYGMH	VIWYDGSNKYYADSVKG	AARLDYYYGMDV
Ligera		RASQSINSYLN	GASGLQS	QQSYSSPLT
Pesada	U1-59	GGSFSGYYWS	EINHSGSTNYNPSLKS	DKWTWYFDL
Ligera		RSSQSVLYSSSNRNYLA	WASTRES	QQYYSTPRT
Pesada	U1-61.1	GVSISSGGYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	DSESEYSSSSNYGMDV
Ligera		RASQTISSYLN	AASSLQG	QQSYSNPLT
Pesada	U1-61	GVSISSGGYYWS	YIYYSGSTYYNPSLKS	DSESEYSSSSNYGMDV
Ligera		Idénticas a las de U1-61.1		
Pesada	U1-62	GYSFTSYWIG	IIYPGDSDTRYSPSFQG	QMAGNYYYGMDV
Ligera		RASQSVISIYLA	GASSRAT	QQYGSSPCS

Cuando un anticuerpo monoclonal recién producido se une a un péptido parcial o una estructura terciaria parcial a la que se une el anticuerpo U1-49, U1-53, U1-59, U1-7 o U1-9, se puede determinar que el anticuerpo se une al mismo epítopo que el anticuerpo U1-49, U1-53, U1-59, U1-7 o U1-9. Además, mediante la confirmación de que el anticuerpo compite con el anticuerpo U1-49, U1-53, U1-59, U1-7 o U1-9 por la unión a HER3 (es decir, el anticuerpo inhibe la unión entre el anticuerpo U1-49, U1-53, U1-59, U1-7 o U1-9 y HER3), se puede

determinar que el anticuerpo se une al mismo epítopo que el anticuerpo U1-49, U1-53, U1-59, U1-7 o U1-9 incluso cuando no se defina la secuencia específica o la estructura de un epítopo. Una vez que se confirmó que el epítopo es el mismo, se espera firmemente que el anticuerpo tenga una actividad biológica equivalente a la del anticuerpo U1-49, U1-53, U1-59, U1-7 o U1-9.

Según la presente invención, la proteína de unión de la invención interactúa con al menos un epítopo en la parte extracelular de HER3. Los epítopos se encuentran preferiblemente en el dominio L1 (aa 19-184), que es el dominio amino terminal, en el dominio S1 (aa 185-327) y S2 (aa 500-632), que son los dos dominios ricos en cisteína, en el dominio L2 (328-499), que está flanqueado por los dos dominios ricos en cisteína o en una combinación de dominios HER3. Los epítopos también pueden estar ubicados en combinaciones de dominios tales como pero no limitadas a un epítopo comprendido por partes de L1 y S1. Por otra parte, la proteína de unión de la invención se caracteriza además porque su unión a HER3 reduce la transducción de señales mediada por HER3. De acuerdo con la presente invención, una reducción de la transducción de señales mediada por HER3 puede, por ejemplo, ser causada por una regulación a la baja de HER3 que resulta en una desaparición al menos parcial de moléculas HER3 de la superficie celular o por una

estabilización de HER3 en la superficie celular en un forma sustancialmente inactiva, es decir una forma que exhibe una transducción de señales menor en comparación con la forma no estabilizada. Como alternativa, una reducción de la transducción de señales mediada por HER3 también puede ser causada al influir, por ejemplo, disminuir o inhibir, la unión de un ligando o a otro miembro de la familia HER a HER3, de GRB2 a HER-2 o de GRB2 a SHC, mediante la inhibición de la fosforilación de la tirosina receptora, fosforilación de AKT, fosforilación de tirosina PYK2 o fosforilación de ERK2, o disminuyendo la invasividad tumoral. Como alternativa, una reducción de la transducción de señales mediada por HER3 también puede ser causada al influir, por ejemplo, disminuir o inhibir, la formación de dímeros que contengan HER3 con otros miembros de su familia. Un ejemplo entre otros puede ser la disminución o inhibición de la formación de complejos de proteínas HER3-EGFR.

Además, de acuerdo con la presente invención, variaciones menores en las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOs: 1-232 se contemplan como englobadas por la presente invención, siempre que incluso las variaciones en la secuencia de aminoácidos todavía mantengan al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, 90%, 95%, y lo más preferiblemente 99% de las secuencias mostradas en SEQ ID NOs: 1-232. Las variaciones pueden ocurrir dentro de las

regiones estructurales (es decir, fuera de las CDRs), dentro de las CDRs, o dentro de las regiones estructurales y las CDRs. Variaciones preferidas en las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOs: 1-232, es decir, supresiones, inserciones y/o sustituciones de al menos un aminoácido, se producen cerca de los límites de dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse por comparación de los datos de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o privadas. Métodos de comparación computarizados se pueden usar para identificar motivos de secuencia o dominios de conformación de proteína predichos que se produzcan en otras proteínas de unión de estructura y/o función conocida. Se conocen los métodos de identificación de secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Véase, por ejemplo Bowie et al., Science 253, 164 (1991); Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden y J. Tooze, eds, Garland Publishing, Nueva York, N. Y. (1991)); y Tornton et al., Nature 354, 105 (1991), que se incorporan aquí por referencia. Por lo tanto, los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que pueden usarse para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con la

invención. Entre los anticuerpos obtenidos mediante la combinación de cadenas pesadas y ligeras que tienen variaciones en tales secuencias de aminoácidos, se puede seleccionar un anticuerpo equivalente al anticuerpo original (anticuerpo progenitor) o más excelente que un anticuerpo progenitor. Como se mencionó anteriormente, la proteína de unión a HER3, el anticuerpo anti-HER3, y similares de la presente invención mantienen la actividad de unión a HER3 incluso si presentan variaciones en sus secuencias de aminoácidos.

En la presente invención, el término "homología" tiene el mismo significado que la "identidad. La homología entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando los parámetros predeterminados del algoritmo BLAST versión 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaeffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). El algoritmo Blast se puede usar también a través de Internet mediante el acceso al sitio www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.

El anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano obtenido por el método anteriormente mencionado pueden ser sometidos a un método conocido para la evaluación de la propiedad de unión a un antígeno para la

selección de anticuerpos preferibles.

En el anticuerpo anti-HER3 de la presente invención, también se incluyen MEHD-7945A (o duligotuzumab), RG-7116, MM-111, MM-121 (o seribantumab, MM-141, LJM-716, huHER3-8, zicuerpo anti-EGFR/ErbB3 tri-específico, GSK-2.849.330, REGN-1400, RTC-3379, AV-203, surrocuerpo monoespecífico (ErbB3), lumretuzumab, MP-EV-20, ZW-9, Dimercept™, surrocuerpo anti-Erb3 (SL-175 o SL-176), SYM-013, variantes, fragmentos activos, productos modificados de los mismos, y similares.

Como un ejemplo de otro índice para uso en la comparación de las propiedades de los anticuerpos, la estabilidad de los anticuerpos puede ser ejemplificada. La calorimetría de barrido diferencial (DSC) es un dispositivo capaz de medir con rapidez y precisión una temperatura del punto medio de desnaturalización térmica (Tm) para ser usada como un índice favorable de la estabilidad conformacional relativa de las proteínas. Mediante la medición de los valores de Tm usando DSC y comparando los valores, una diferencia en la estabilidad térmica se puede comparar. Se sabe que la estabilidad de almacenamiento de los anticuerpos muestra cierta correlación con la estabilidad térmica de los anticuerpos (Lori Burton, et. al., Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, pp. 265-273), y un anticuerpo preferido se puede seleccionar mediante el uso de estabilidad

térmica como un índice. Ejemplos de otros índices para la selección de anticuerpos incluyen las siguientes características: el rendimiento en una célula hospedera apropiada es alto; y la agregabilidad en una solución acuosa es baja. Por ejemplo, un anticuerpo que muestra el rendimiento más alto no siempre muestra la más alta estabilidad térmica, y por lo tanto, es necesario seleccionar un anticuerpo más adecuado para la administración a seres humanos haciendo una evaluación global basada en los índices descritos anteriormente.

El anticuerpo de la presente invención abarca un producto modificado del anticuerpo. La variante modificada se refiere a una variante obtenida sometiendo el anticuerpo de la invención a modificación química o biológica. Ejemplos de la variante modificada químicamente incluyen variantes modificadas químicamente por unión de un resto químico a un esqueleto de aminoácidos, variantes modificadas químicamente con una cadena de carbohidratos N-ligada u O-ligada, etc. Ejemplos de la variante biológicamente modificada incluyen variantes obtenidas por modificación después de traducción (tales como glicosilación N-ligado u O-ligada, procesamiento de extremo N-terminal o C, desamidación, isomerización de ácido aspártico u oxidación de metionina), y variantes en las que un residuo de metionina ha sido añadido a la N-terminal al ser expresado en una célula hospedera procariota. Además,

un anticuerpo marcado a fin de permitir la detección o aislamiento del anticuerpo o un antígeno de la invención, por ejemplo, un anticuerpo marcado con enzima, un anticuerpo marcado con fluorescencia, y un anticuerpo de afinidad marcado también se incluyen en el significado de la variante modificada. Tal variante modificada del anticuerpo de la invención es útil para mejorar la estabilidad y retención en sangre del anticuerpo, reduciendo la antigenicidad del mismo, detectar o aislar el anticuerpo o el antígeno, y así sucesivamente.

Además, al regular de la modificación de un glicano que está unido al anticuerpo de la invención (glicosilación, defucosilation, etc.), es posible mejorar una actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpos. Como la técnica para la regulación de la modificación de un glicano de anticuerpos, se conocen las Publicaciones Internacionales WO 1999/54342, WO 2000/61739, WO 2002/31140, etc. Sin embargo, la técnica no se limita a ello. En el anticuerpo de la invención, también se incluye un anticuerpo en donde se regula la modificación de un glicano.

En el caso en donde un anticuerpo se produce mediante el aislamiento de un gen de anticuerpo primero y luego introduciendo el gen en un anfitrión apropiado, una combinación de un anfitrión apropiado y un vector de expresión apropiado puede ser usada. Ejemplos específicos

del gen del anticuerpo incluyen una combinación de un gen que codifica para una secuencia de la cadena pesada de un anticuerpo y un gen que codifica para una secuencia de la cadena ligera del mismo se describe en esta especificación. Cuando se transforma una célula hospedera, es posible insertar la secuencia del gen de la cadena pesada y la secuencia del gen de la cadena ligera en el mismo vector de expresión, y también en diferentes vectores de expresión por separado.

En el caso en que se usan células eucariotas como anfitrión, células animales, células de plantas, y microorganismos eucarióticos se pueden usar. Como las células animales, células de mamífero, por ejemplo, se pueden ejemplificar células COS de simio (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos murinos NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658) y cepas deficientes en dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. y Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1980) 77, pp. 4126-4220) de células de ovario de hámster chino (células CHO; ATCC: CCL-61).

En el caso en que se usan células procariotas, por ejemplo, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* se pueden ejemplificar.

Mediante la introducción de un gen del anticuerpo deseado en estas células a través de transformación, y cultivando las células así transformadas *in vitro*, se puede

obtener el anticuerpo. En el método de cultivo descrito anteriormente, el rendimiento puede variar a veces dependiendo de la secuencia del anticuerpo, y por lo tanto, es posible seleccionar un anticuerpo que se produzca fácilmente como un producto farmacéutico mediante el uso del rendimiento como un índice entre los anticuerpos que tengan una actividad de unión equivalente. Por lo tanto, en el anticuerpo de la invención, se incluye un anticuerpo obtenido por un método de producción de un anticuerpo, caracterizado porque incluye una etapa de cultivar la célula hospedera transformada y una etapa de recogida de un anticuerpo deseado o un fragmento funcional del anticuerpo a partir de un producto cultivado obtenido en la etapa de cultivo también.

Se sabe que un residuo de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en una célula de mamífero cultivada se podría suprimir/eliminar (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), y también es conocido que los residuos de dos aminoácidos (glicina y lisina) en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en una célula de mamífero cultivada podrían suprimirse/eliminarse y un residuo de prolina recién situado en el extremo carboxilo podría ser amidado (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Sin embargo, tal supresión/eliminación y modificación de la secuencia de la cadena pesada no afectan a la afinidad de unión al

antígeno y la función efectora (la activación de complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, etc.) del anticuerpo. Por lo tanto, en el anticuerpo de la invención, también se incluyen un anticuerpo y un fragmento funcional del anticuerpo sometido a tal modificación, y una variante de supresión en la que uno o dos aminoácidos se han eliminado en el extremo carboxilo de la cadena pesada, una variante obtenida por amidación de la variante de supresión (por ejemplo, una cadena pesada en la que el residuo de prolina carboxilo terminal se ha amidado) también se incluyen, y similares. El tipo de variante de supresión que tiene una supresión en el extremo carboxilo de la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la invención no se limita a las variantes anteriores siempre que la afinidad de unión al antígeno y la función efectora se conserven. Las dos cadenas pesadas que constituyen el anticuerpo de acuerdo con la invención pueden ser de un tipo seleccionado del grupo que consista de una cadena pesada de longitud completa y la variante de supresión descrita anteriormente, o pueden ser de dos tipos en combinación seleccionados de los mismos. La relación de la cantidad de cada variante de supresión puede verse afectada por el tipo de células de mamífero cultivadas que produzcan el anticuerpo de acuerdo con la invención y las condiciones de cultivo, sin embargo, se puede ejemplificar un caso en donde un residuo de aminoácido en el extremo

carboxilo se ha suprimido en ambas de las dos cadenas pesadas contenidas como componentes principales en el anticuerpo de acuerdo con la invención. El alcance de todo el anticuerpo (en la presente invención, también referido simplemente como un "anticuerpo") de la presente invención también incluye variantes de supresión del mismo, mezclas que contienen uno o dos o más variantes de supresión del mismo, etc. El "anticuerpo" de la presente invención incluye un anticuerpo que comprende una cadena pesada o ligera en la que el glutamato N-terminal se encuentra en la forma de piroglutamato por ciclación y/o una cadena pesada o ligera en donde una parte de los residuos de cisteína están en forma de cisteinilo.

En una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo anti-HER3 de la invención es del tipo IgA, IgD, IgE_1,IgG o IgM, preferiblemente del tipo IgG o o IgM, incluyendo, pero no limitado a, el tipo IgGI, IgG2, IgG3, IgG4, IGMI e IgM2. En modalidades más preferidas, el anticuerpo es del tipo IgGI, IgG2 o IgG4.

Como la actividad biológica del anticuerpo, generalmente, se pueden ejemplificar una actividad de unión al antígeno, la actividad de la internalización de un antígeno en células que expresan el antígeno mediante la unión con el antígeno, una actividad de neutralizar la actividad de un antígeno, una actividad de mejora de la

actividad de un antígeno, una actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), y una fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP). La función del anticuerpo de acuerdo con la invención es una actividad de unión a HER3, preferiblemente, la actividad de internalización de HER3 en las células que expresan HER3 mediante la unión con HER3. Además, el anticuerpo de la invención puede tener una actividad ADCC, una actividad CDC y/o una actividad ADCP además de la acitividad de internalización celular.

En ciertos aspectos, por ejemplo, en relación con la generación de anticuerpos como candidatos terapéuticos contra HER3, puede ser deseable que el anticuerpo anti-HER3 de la invención sea capaz de fijar el complemento y participar en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Hay un número de isotipos de anticuerpos que son capaces de lo mismo incluyendo, sin limitaciones, los siguientes: IgM murina, IgG2a murina, IgG2b murina, IgG3 murina, IgM humana, IgGI humana, IgG3 humana, e IgA humana. Se apreciará que los anticuerpos que se generan no necesitan inicialmente poseer un isotipo tal, pero, en lugar del anticuerpo tal como se genera puede poseer cualquier isotipo y el anticuerpo puede ser de isotipo cambiado añadiendo los genes de la región V clonados molecularmente o ADNc para

clonar molecularmente genes de región constante o ADNc en vectores de expresión apropiados usando técnicas de biología molecular convencionales que son bien conocidas en la técnica y luego expresando los anticuerpos en células hospederas usando técnicas conocidas en la técnica. El anticuerpo de isotipo cambiado también puede poseer una región Fc que haya sido diseñada molecularmente para poseer CDC superior sobre variantes de origen natural (Idusogie et al., J. Immunol., 166, 2571-2575) y expresarse de forma recombinante en células hospederas usando técnicas conocidas en el arte. Tales técnicas incluyen el uso de técnicas recombinantes directas (véase por ejemplo la patente de E.U.A. No. 4,816,397), técnicas de fusión célula-célula (véase por ejemplo las patentes de E.U.A. Nos. 5,916,771 y 6,207,418), entre otras. En la técnica de fusión célula-célula, se prepara un mieloma u otra línea celular tal como CHO que posee una cadena pesada con cualquier isotipo deseado y otro mieloma u otra línea celular tal como CHO es preparada que posee la cadena ligera. Dichas células pueden, a partir de entonces, fusionarse y una línea celular que exprese un anticuerpo intacto se puede aislar. A modo de ejemplo, un anticuerpo IgG4 anti-HER3 humano, que posea la unión deseada al antígeno HER3, podría ser fácilmente cambiado en isotipo para generar un isotipo IgM humana, IgGI humano o IgG3 humano, mientras que todavía posee la misma región variable (que define la especificidad

del anticuerpo y parte de su afinidad). Tal molécula puede entonces ser capaz de fijar el complemento y participar en CDC.

Además, también puede ser deseable que el anticuerpo anti-HER3 de la invención sea capaz de unirse a los receptores Fc sobre las células efectoras, tales como los monocitos y las células asesinas naturales (NK), y participar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Hay un número de isotipos de anticuerpos que son capaces de lo mismo, incluyendo, sin limitaciones, los siguientes: IgG2a murina, IgG2b murina, IgG3 murina, IgGI humana e IgG3 humana. Se apreciará que los anticuerpos que se generan no necesitan inicialmente poseer un isotipo tal, pero, en lugar del anticuerpo tal como se genera puede poseer cualquier isotipo y el anticuerpo puede ser de isotipo cambiado añadiendo los genes de la región V clonados molecularmente o ADNc para clonar molecularmente genes de región constante o ADNc en vectores de expresión apropiados usando técnicas de biología molecular convencionales que son bien conocidas en la técnica y luego expresando los anticuerpos en células hospederas usando técnicas conocidas en la técnica. El anticuerpo de isotipo cambiado también puede poseer una región Fc que haya sido diseñada molecularmente para poseer ADCC superior sobre variantes de origen natural (Shields et al., J. Biol. Chem., 276, 6591-

6604) y expresarse de forma recombinante en células hospederas usando técnicas conocidas en el arte. Tales técnicas incluyen el uso de técnicas recombinantes directas (véase por ejemplo la patente de E.U.A. No. 4,816,397), técnicas de fusión célula-célula (véase por ejemplo las patentes de E.U.A. Nos. 5,916,771 y 6,207,418), entre otros. En la técnica de fusión célula-célula, se prepara un mieloma u otra línea celular tal como CHO que posee una cadena pesada con cualquier isotipo deseado y otro mieloma u otra línea celular tal como CHO es preparada que posee la cadena ligera. Dichas células pueden, a partir de entonces, fusionarse y una línea celular que exprese un anticuerpo intacto se puede aislar. A modo de ejemplo, un anticuerpo IgG4 anti-HER3 humano, que posee la unión deseada al antígeno HER3, podría ser fácilmente cambiado en isotipo para generar una isotipo IgGI humano o IgG3 humano, mientras que todavía posea la misma región variable (que defina la especificidad del anticuerpo y parte de su afinidad). Tal molécula puede entonces ser capaz de unirse a FcyR sobre las células efectoras y participar en la ADCC.

El anticuerpo obtenido puede ser purificado para ser homogéneo. La separación y purificación del anticuerpo se pueden realizar empleando un método de separación y purificación de proteínas convencional. Por ejemplo, el anticuerpo puede separarse y purificarse mediante la

selección y la combinación de cromatografía en columna, filtración en filtro, ultrafiltración, precipitación con sales, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida preparativa, electroforesis de enfoque isoeléctrico, y similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al., eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero el método no se limita a ellos.

Ejemplos de tal cromatografía incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, y cromatografía de adsorción.

Tal cromatografía puede llevarse a cabo empleando cromatografía líquida tal como HPLC o FPLC.

Como columna para ser usada en cromatografía de afinidad, una columna de proteína A y una columna de Proteína G se pueden ejemplificar. Por ejemplo, como una columna usando una columna de Proteína A, Hyper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia Corp.) y similares puede ser ejemplificada.

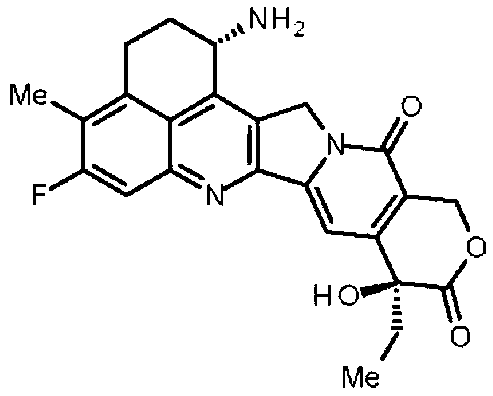
Además, mediante el uso de un portador que tenga un antígeno inmovilizado sobre el mismo, el anticuerpo puede también ser purificado usando la propiedad de unión del

anticuerpo al antígeno.

Compuesto antitumoral

Se explica el compuesto antitumoral para conjugarse con el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención. El compuesto antitumoral usado en la presente invención no está limitado particularmente si es un compuesto que tiene un efecto antitumoral y un sustituyente o una estructura parcial que permite la conexión a una estructura enlazadora. Cuando una parte o la totalidad del enlazador el compuesto antitumoral se escinde en las células tumorales, la porción de compuesto antitumoral se libera para exhibir el efecto antitumoral. A medida que el enlazador se escinde en una posición de conexión con un fármaco, el compuesto antitumoral se libera en su estructura no modificada para exhibir su efecto antitumoral intrínseco.

Como un compuesto antitumoral usado en la presente invención, se puede usar preferentemente exatecano, un derivado de camptotecina ((1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-diona mostrado en la siguiente fórmula).



A pesar de tener un excelente efecto antitumoral, exatecano no ha sido comercializado como un fármaco antitumoral. El compuesto puede obtenerse fácilmente por un método conocido y el grupo amino en la posición 1 se puede usar preferiblemente como una posición de conexión a la estructura enlazadora. Además, exatecano también puede ser liberado en las células tumorales, mientras parte del enlazador esté todavía unida al mismo. Sin embargo, es un excelente compuesto que presenta un excelente efecto antitumoral incluso en tal estructura.

Debido a que exatecano tiene una estructura de camptotecina, se sabe que el equilibrio se desplaza a una estructura con un anillo de lactona cerrado (anillo cerrado) en un medio acuoso ácido (por ejemplo, pH 3 o menos), pero cambia a una estructura con un anillo de lactona abieroa (anillo abierto) en un medio acuoso básico (por ejemplo, pH 10 o así). Un conjugado de fármaco que se introduzca con un residuo de exatecano correspondiente a la estructura de anillo cerrado y la estructura de anillo abierto también se

espera que tenga el mismo efecto antitumoral y es innecesario decir que cualquiera de ellos está dentro del alcance de la presente invención.

Ejemplos de otros compuestos antitumorales incluyen doxorrubicina, daunorrubicina, mitomicina C, bleomicina, ciclocitidina, vincristina, vinblastina, metotrexato, agente antitumoral a base de platino (cisplatino o sus derivados), taxol o derivados de los mismos, y otra camptotecina o sus derivados (agente antitumoral descrito en la patente japonesa abierta a inspección pública No. 6-87746).

Con respecto al conjugado anticuerpo-fármaco, el número de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo es un factor clave que tiene una influencia sobre la eficacia y la seguridad. La producción del conjugado anticuerpo-fármaco se realiza mediante la definición de las condiciones de reacción, incluyendo las cantidades de uso de materias primas y reactivos para la reacción de manera que tenga un número constante de moléculas de fármacos conjugados, se obtiene generalmente una mezcla que contiene diferentes números de moléculas de fármacos conjugados a diferencia de la reacción química de un compuesto de bajo peso molecular. El número de fármacos conjugados en una molécula de anticuerpo se expresa o especificado por el valor medio, es decir, el número medio de moléculas de fármacos conjugados. A menos que se describa específicamente de otra

manera como un principio, el número de moléculas de fármacos conjugados significa un valor medio, excepto en un caso en donde se representa un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene un número específico de moléculas de fármacos conjugados que se incluye en una mezcla de conjugado anticuerpo-fármaco que tiene diferente número de moléculas de fármaco conjugado.

El número de moléculas de exatecano conjugadas con una molécula de anticuerpo es controlable, y como un número promedio de moléculas de fármacos conjugadas por anticuerpo, aproximadamente 1 a 10 exatecanos se puede enlazar. Preferiblemente, es de 2 a 8, y más preferiblemente de 3 a 8. Mientras tanto, una persona experta en la técnica puede diseñar una reacción para la conjugación de un número requerido de moléculas de fármaco a una molécula de anticuerpo con base en la descripción de los ejemplos de la presente solicitud y se puede obtener un conjugado de anticuerpo-fármaco con un número controlado de moléculas de exatecano conjugadas.

El conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención es poco probable que tenga una aparición de agregación, insolubilidad, fragmentación, o similar, incluso cuando se aumente el número de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo.

Estructura enlazadora

Con respecto al conjugado anticuerpo anti-HER3-

fármaco de la presente invención, se explica la estructura enlazadora para conjugar un compuesto antitumoral al anticuerpo anti-HER3. El enlazador tiene la siguiente estructura:

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ o $-L^1-L^2-L^P-$,

el anticuerpo se conecta a la terminal de L^1 (terminal opuesta a la que L^2 está conectado), y el compuesto antitumoral se conecta al grupo carbonilo de la porción -LA-$(CH_2)n^2-C(=O)-$ o la C-terminal de L^P.

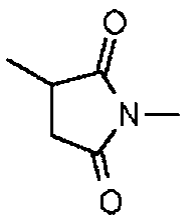
n^1 representa un número entero de 0 a 6, preferiblemente, un número entero de 1 a 5, y más preferiblemente de 1 a 3.

1. L^1

L^1 está representado por una estructura que se muestra a continuación:

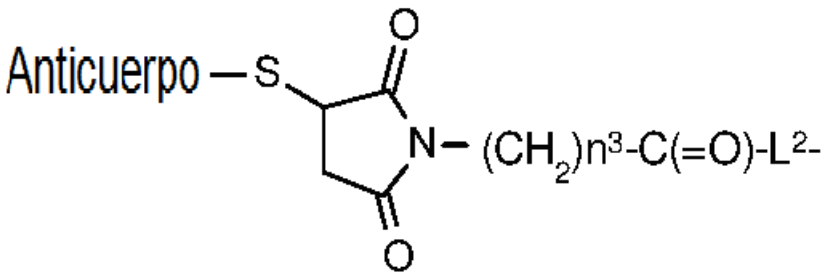
$-$(Succinimid-3-il-N)$-(CH_2)n3-C(=O)-$

En lo anterior, n^3 es un número entero de 2 a 8, y "-(Succinimid-3-il-N)-" tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



La posición 3 de la estructura parcial de arriba es la posición de conexión con el anticuerpo anti-HER3. La

conexión con el anticuerpo en la posición 3 se caracteriza por la formación de un enlace tioéter. El átomo de nitrógeno en la posición 1 de la porción de estructura está conectado al átomo de carbono de metileno que está presente dentro del enlazador que incluye la estructura. Específicamente, -(Succinimid-3-il-N)-$(CH_2)n^3$-C(=O)-L^2- es una estructura representada por la siguiente fórmula (en la presente memoria, "anticuerpo-S-" se deriva de un anticuerpo).



En la fórmula, n^3 es un número entero de 2 a 8, y preferiblemente 2 a 5.

Ejemplos específicos de L^1 incluyen los siguientes.

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-

2. L^2

L^2 tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

-NH-$(CH_2CH_2$-O$)n^4$-CH_2CH_2-C(=O)-

L^2 puede no estar presente, y en tal caso, L^2 es un

enlace sencillo. En la estructura de fármaco-enlazador de la presente invención, en particular, L^P puede ser directamente conectado a un fármaco, y en tal caso, L^2 es particularmente preferiblemente un enlace sencillo. n^4 es un número entero de 1 a 6, y preferiblemente 2 a 4. L^2 está conectado a L^1 en su grupo amino terminal y está conectado a L^P en el grupo carbonilo de la terminal opuesta.

Ejemplos específicos de L^2 incluyen los siguientes.

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-,

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-,

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-,

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-,

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-,

-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-

3. L^P

L^P es un residuo péptido que consiste en 2 a 7 aminoácidos. Específicamente, se compone de una porción de oligopéptido en la que 2 a 7 aminoácidos están unidos por un enlace peptídico. L^P está conectado a L^2 en la N-terminal y que está conectado al grupo amino de la porción -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)- del enlazador en el C-terminal.

El aminoácido que constituye L^P no está particularmente limitado, y Ejemplos del mismo incluyen un L-

o un D-aminoácido, preferiblemente un L-aminoácido. Además, puede ser un aminoácido que tenga una estructura tal como beta-alanina, ácido épsilon-aminocaproico o ácido gamma-aminobutírico, además de un alfa-aminoácido, además, puede ser un tipo de aminoácido no natural tal como aminoácido N-metilado.

La secuencia del aminoácido de L^P no está particularmente limitada, pero ejemplos del aminoácido constituyente incluyen fenilalanina (Phe; F), tirosina (Tyr; Y), leucina (Leu; L), glicina (Gly; G), alanina (Ala; A), valina (Val; V), lisina (Lys; K), citrulina (Cit), serina (Ser; S), ácido glutámico (Glu; E) y ácido aspártico (Asp; D). Entre ellos, ejemplos preferidos incluyen fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico. Dependiendo del tipo del aminoácido, el patrón de liberación del fármaco puede ser controlado. El número del aminoácido puede estar entre 2-7.

Ejemplos específicos de L^P incluyen los siguientes.

-GGF-,

-DGGF-,

-(D)D-GGF-,

-EGGF-,

-GGFG-,

-SGGF-,

-KGGF-,

-DGGFG-,

-GGFGG-,

-DDGGFG-,

-KDGGFG-,

-GGFGGGF-

El "(D-)D" descrito anteriormente significa ácido D-aspártico. Ejemplos del L^P particularmente preferido del conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención incluyen residuo peptídico -GGFG- y -DGGFG-. Además, en la estructura de fármaco-enlazador de la presente invención, L^P puede estar conectado directamente al fármaco, y para tal caso, ejemplos preferidos de L^P incluyen un residuo pentapéptido de -DGGFG-.

4. L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-

El L^a en L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)- es una estructura de -O- o un enlace sencillo. n^2 es un número entero de 0 a 5, preferiblemente, 0 a 3, y más preferiblemente 0 ó 1.

Ejemplos de L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)- incluyen los siguientes.

-O-CH_2-C(=O)-,

-O-CH_2CH_2-C(=O)-,

-O-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-O-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-O-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-CH_2-C(=O)-,

$-CH_2CH_2-C(=O)-$,

$-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,

$-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,

$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$.

Entre ellos, son preferibles los que tienen

$-O-CH_2-C(=O)-$,

$-O-CH_2CH_2-C(=O)-$

o aquellos en los que L^a es un enlace sencillo y n^2 es 0.

Ejemplos específicos de la estructura enlazadora representada por $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ incluyen los siguientes.

$-NH-CH_2-C(=O)-$,

$-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$,

$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$,

$-NH-CH_2CH_2-O-C(=O)-$,

$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$,

$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$

Entre ellos, los siguientes ejemplos son más preferibles.

$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$,

$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$,

$-NH-CH_2CH_2-O-C(=O)-$

En cuanto al enlazador -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-, la longitud de cadena de 4 a 7 átomos es preferible, y más preferiblemente, son los que tienen la longitud de cadena de 5 ó 6 átomos.

Con respecto al conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención, cuando es transferido al interior de las células tumorales, se cree que la porción enlazadora se escinde y el derivado de fármaco que tiene una estructura representada por NH_2-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-(NH-DX) se libera para expresar una acción antitumoral. Ejemplos del derivado antitumoral que exhibe un efecto antitumoral mediante la liberación a partir del conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención incluyen un derivado antitumoral que tiene una porción de estructura en la que la terminal de la estructura representada por -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)- del enlazador es un grupo amino, y los particularmente preferidos incluyen los siguientes.

NH_2-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

NH_2-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

NH_2-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

NH_2-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX).

Mientras tanto, en el caso de NH_2-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX), se confirmó que, como la estructura aminal en la molécula es inestable, de nuevo se somete a una auto-degradación para liberar el siguiente HO-CH_2-C(=O)-(NH-DX).

Aquellos compuestos también se pueden usar preferiblemente como un intermedio de producción del conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención.

Además, en la estructura de fármaco-enlazador de la presente invención, se presenta un caso en que L^P se puede conectar directamente al fármaco. En tal caso, cuando la C-terminal de L^P es la glicina, el fármaco antitumoral a ser liberado es el propio exatecano o un compuesto que tiene glicina unida al grupo amino de exatecano.

Para el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención en el que se usa exatecano como un fármaco, es preferible la porción de estructura de fármaco-enlazador que tiene la estructura siguiente

$-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-(NH-DX)$ o

$-L^1-L^2-L^P-(NH-DX)$

a la que se conecta el anticuerpo. El número conjugado de esta porción de estructura de fármaco-enlazador puede ser de 1 a 10 como el número promedio por conjugado de anticuerpo, preferiblemente, 2 a 8, y más preferiblemente 3 a 8.

$-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$,

$-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$,

$-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-(NH-

DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX).

Entre ellos, los más preferidos son los siguientes.

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX).

Los aún más preferidos son los siguientes.

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX).

Los particularmente preferidos son los siguientes.

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX).

Con respecto a la estructura enlazadora para conjugar el anticuerpo anti-HER3 y un fármaco en el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente solicitud, el enlazador preferido puede ser construido mediante la conexión de estructuras preferidas que se muestran para cada parte del enlazador se ha explicado anteriormente. En cuanto a la estructura enlazadora, aquellas que tengan la siguiente estructura se pueden usar preferentemente. Mientras tanto, la terminal izquierda de la estructura es una posición de conexión al anticuerpo y la terminal derecha es una posición de conexión al fármaco.

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-

C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-.

Entre ellos, las más preferidos son los siguientes.

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-.

Aún más preferidos son los siguientes.

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-

CH_2-O-CH_2-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-.

Particularmente preferidos son los siguientes.

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-,

-(Succinimid-3-il-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-.

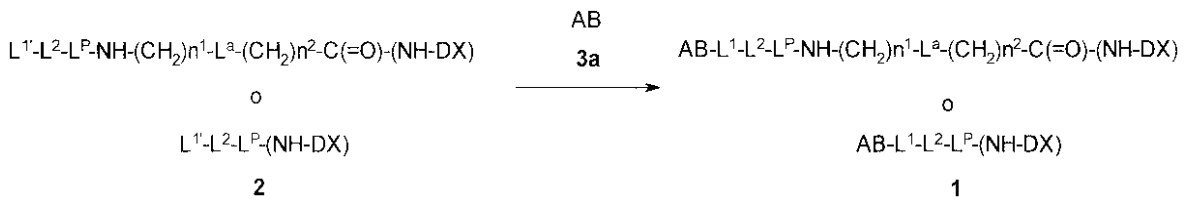
Método de producción

A continuación se dan las explicaciones para el método representativo para la producción del conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención o un intermediario de producción del mismo. Mientras tanto, los compuestos se describen a continuación con el número que aparece en cada fórmula de reacción. Específicamente, se conocen también como un "compuesto de la fórmula (1)", un "compuesto (1)", o similares. Los compuestos con números distintos de los se describen también de manera similar.

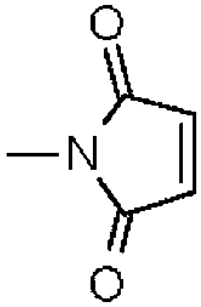
1. Método de producción 1

El conjugado anticuerpo-fármaco representado por la

fórmula (1) en el que el anticuerpo se conjuga a la estructura de fármaco-enlazador a través de tioéter puede ser producido por el siguiente método, por ejemplo.

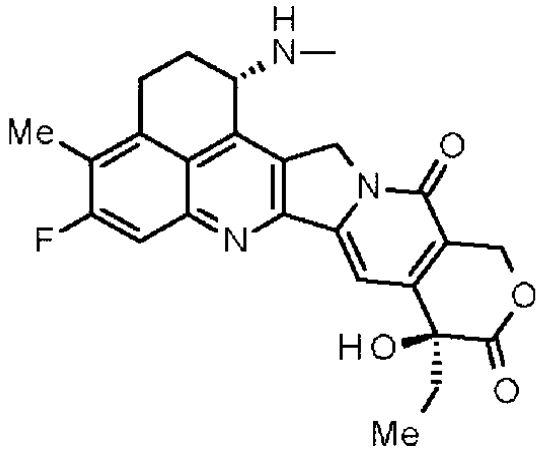


en la fórmula, AB representa un anticuerpo con un grupo sulfhidrilo y $L^{1'}$ corresponde a L^1 que tiene una estructura en la que la terminal del enlazador se convierte en un grupo maleimidilo (fórmula que se muestra a continuación).



en la fórmula, el átomo de nitrógeno es la posición de conexión.

Específicamente, representa un enlazador que tiene una estructura que, dentro de la estructura de L^1 representado como -(Succinimid-3-il-N)-$(CH_2)n^2$-C(=O)-, esa porción -(Succinimid-3-il-N)- se convierte en un grupo maleimidilo. Además, el grupo -(NH-DX) representa una estructura representada por la siguiente fórmula:



y representa un grupo que se deriva mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno del grupo amino en la posición 1 de exatecano.]

Además, el compuesto de la fórmula (1) en el esquema de reacción anterior se puede interpretar como una estructura en la que una porción de estructura de fármaco a la terminal del enlazador sea conectada a un anticuerpo. Sin embargo, es sólo la descripción dada en aras de la conveniencia, y en realidad hay muchos casos en los que una pluralidad de esas porciones de estructura están conectadas a una molécula de anticuerpo. Lo mismo se aplica a la explicación del método de producción descrito a continuación.

Específicamente, el conjugado anticuerpo-fármaco (1) se puede producir haciendo reaccionar el compuesto (2), que es obtenible mediante el método descrito a continuación, con el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo.

El anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo se puede obtener por un método bien conocido en la técnica

(Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996)). Ejemplos incluyen: el reactivo de Traut se hace reaccionar con el grupo amino del anticuerpo; S-acetiltioalcanoatos de N-succinimidil se hacen reaccionar con el grupo amino del anticuerpo, seguido por reacción con hidroxilamina; después de reaccionar con 3-propionato de N-succinimidil (piridilditio), se hace reaccionar con un agente reductor; el anticuerpo se hace reaccionar con un agente reductor tal como ditiotreitol, 2-mercaptoetanol, y tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) para reducir el enlace disulfuro en una parte de bisagra en el anticuerpo para formar un grupo sulfhidrilo, pero no está limitado a lo mismo.

Específicamente, usando 0.3 a 3 equivalentes molares de TCEP como un agente reductor por enlaces disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo y haciendo reaccionar con el anticuerpo en una solución amortiguadora que contenga un agente quelante, se puede obtener el anticuerpo en el que los enlaces disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo son parcial o completamente reducidos. Ejemplos del agente quelante incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). Se puede usar a una concentración de 1 mM a 20 mM. Ejemplos de la solución amortiguadora que se puede usar incluyen una solución de fosfato de sodio, borato de sodio o acetato de sodio.

Específicamente, al hacer reaccionar el anticuerpo con TCEP a 4ºC a 37ºC durante 1 a 4 horas, se puede obtener el anticuerpo (3a) que tenga grupos sulfhidrilo parcial o totalmente reducidos.

Mientras tanto, mediante la realización de una reacción de adición de un grupo sulfhidrilo a una porción de fármaco-enlazador, la porción de fármaco-enlazador puede ser conjugada por un enlace tioéter.

Usando 2 a 20 equivalentes molares del compuesto (2) por el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo, se puede producir el conjugado anticuerpo-fármaco (1) en el que 2 a 8 moléculas de fármaco se conjugan por anticuerpo. Específicamente, es suficiente que la solución que contenga el compuesto (2) disuelto en la misma se añada a una solución amortiguadora que contenga el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo para la reacción. Aquí, ejemplos de la solución amortiguadora que se puede usar incluyen solución de acetato de sodio, fosfato de sodio y borato de sodio. El pH para la reacción es de 5 a 9, y más preferiblemente la reacción se lleva a cabo cerca de pH 7. Ejemplos del solvente para disolver el compuesto (2) incluyen un solvente orgánico tal como sulfóxido de dimetilo (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA), y N-metil-2-pirrolidona (NMP).

La reacción puede llevarse a cabo mediante la

adición de la solución de solvente orgánico que contiene el compuesto (2) disuelto en la mismo a 1 a 20% v/v a una solución amortiguadora que contiene el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo. La temperatura de reacción es de 0 a 37ºC, más preferiblemente 10 a 25°C, y el tiempo de reacción es de 0.5 a 2 horas. La reacción se puede terminar mediante la desactivación de la reactividad del compuesto (2) que no haya reaccionado con un reactivo que contenga tiol. Ejemplos del reactivo que contiene tiol incluyen cisteína y N-acetil-L-cisteína (NAC). Más específicamente, mediante la adición de 1 a 2 equivalentes molares de NAC al compuesto (2) que se use y, por incubación a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos, la reacción se puede terminar.

El conjugado anticuerpo-fármaco (1) producido puede ser sometido a, después de la concentración, intercambio de amortiguador, purificación y medición de la concentración de anticuerpos y el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo de acuerdo con procedimientos comunes descritos a continuación, para hacer una identificación del conjugado anticuerpo-fármaco (1).

Procedimiento común A: Concentración de solución acuosa de anticuerpo o conjugado anticuerpo-fármaco

A un recipiente Amicon Ultra (50,000 MWCO, Millipore Corporation), se le añadió una solución de anticuerpo o conjugado anticuerpo-fármaco y la solución del

anticuerpo o conjugado anticuerpo-fármaco se concentró por centrifugación (centrifugar durante 5 a 20 minutos a 2000 G a 3800 G) usando una centrífuga (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.)

Procedimiento común B: Medición de la concentración de anticuerpos

Usando un detector UV (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.), la medición de la concentración de anticuerpos se realizó de acuerdo con el método definido por el fabricante. Aquí, el coeficiente de absorción a 280 nm se puede estimar a partir de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo mediante un método de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423), y se usó un coeficiente de absorción a 280 nm diferente para cada anticuerpo (1.3 $mLmg^{-1}cm^{-1}$ a 1.8 $mLmg^{-1}cm^{-1}$). En el caso de U1-59, se usó un coeficiente de absorción a 280 nm de 1.768 $mLmg^{-1}cm^{-1}$ como un valor estimado de acuerdo con su secuencia de aminoácidos.

Procedimiento común C: intercambio de amortiguador para anticuerpo

Una columna NAP-25 (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) usando soporte Sephadex G-25 se equilibró con amortiguador de fosfato (10 mM, pH 6.0; se denomina PBS6.0/EDTA en la descripción) que contenía cloruro de sodio (137 mM) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 5 mM) de acuerdo con el método definido por el fabricante.

Solución acuosa del anticuerpo se aplicó en una cantidad de 2.5 mL a la columna NAP-25 sola, y luego se recogió la fracción (3.5 mL) eluida con 3.5 mL de PBS6.0/EDTA. La fracción resultante se concentró por el Procedimiento A común después de la medición de la concentración del anticuerpo usando el Procedimiento común B, la concentración de anticuerpo se ajustó a 10 mg/mL usando PBS6.0/EDTA.

Procedimiento común D: Purificación de conjugado anticuerpo-fármaco

Una columna NAP-25 se equilibró con amortiguador de acetato que contenía sorbitol (5%) (10 mM, pH 5.5; se denomina ABS en la descripción). Solución de reacción acuosa del conjugado anticuerpo-fármaco (aproximadamente 2.5 mL) se aplicó a la columna NAP-25, y después se eluyó con el amortiguador en una cantidad tal como se define por el fabricante para recoger la fracción de anticuerpos. Mediante la realización de un proceso de purificación de filtración en gel, en la que la fracción recogida se aplicó de nuevo a la columna NAP-25 y se eluyó con amortiguador, se repitió de 2 a 3 veces en total, se obtuvo el conjugado anticuerpo-fármaco excluyendo enlazador de fármaco no conjugado y un compuesto de bajo peso molecular clorhidrato de (tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), N-acetil-L-cisteína (NAC), y sulfóxido de dimetilo).

Procedimiento común E: Medición de la concentración

de anticuerpo en el conjugado anticuerpo-fármaco y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo (1)

La concentración de fármaco conjugado en el conjugado anticuerpo-fármaco se puede calcular midiendo la absorbancia UV de una solución acuosa del conjugado anticuerpo-fármaco en dos longitudes de onda de 280 nm y 370 nm, seguido por realizar el cálculo que se muestra a continuación.

Debido a que la absorbancia total de en cualquier longitud de onda es igual a la suma de la absorbancia de cada especie química que absorbe la luz que está presentes en un sistema [aditividad de absorbancia], cuando los coeficientes de absorción molar del anticuerpo y el fármaco siguen siendo los mismos antes y después de la conjugación entre el anticuerpo y el fármaco, la concentración de anticuerpo y la concentración de fármaco en el conjugado anticuerpo-fármaco se expresan con las siguientes ecuaciones.

$$A_{280} = A_{D,\,280} + A_{A,\,280} = E_{D,\,280}C_D + E_{A,\,280}C_A \quad \text{Ecuación (1)}$$

$$A_{370} = A_{D,\,370} + A_{A,\,370} = E_{D,\,370}C_D + E_{A,\,370}C_A \quad \text{Ecuación (2)}$$

En lo anterior, A_{280} representa la absorbancia de una solución acuosa del conjugado anticuerpo-fármaco a 280 nm, A_{370} representa la absorbancia de una solución acuosa del conjugado anticuerpo-fármaco a 370 nm, $A_{A,\,280}$ representa la absorbancia de un anticuerpo a 280 nm, $A_{A,\,370}$ representa la

absorbancia de un anticuerpo a 370 nm, $A_{D,\ 280}$ representa la absorbancia de un precursor conjugado a 280 nm, $A_{D,\ 370}$ representa la absorbancia de un precursor conjugado a 370 nm, $E_{A,\ 280}$ representa el coeficiente de absorción molar de un anticuerpo a 280 nm, $E_{A,\ 370}$ representa el coeficiente de absorción molar de un anticuerpo a 370 nm, $E_{D,\ 280}$ representa el coeficiente de absorción molar de un precursor conjugado a 280 nm, $E_{D,\ 370}$ representa el coeficiente de absorción molar de un precursor conjugado a 370 nm, C_A representa la concentración de anticuerpo en un conjugado anticuerpo-fármaco, y C_D representa la concentración del fármaco en un conjugado anticuerpo-fármaco.

En cuanto a la $E_{A,\ 280}$, $E_{A,\ 370}$, $E_{D,\ 280}$ y $E_{D,\ 370}$ en lo anterior, se usan valores preparados previamente (valor estimado basado en el cálculo o el valor de medición obtenido por medición UV del compuesto). Por ejemplo, $E_{A,\ 280}$ puede estimarse a partir de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo mediante un método de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). $E_{A,\ 370}$ es en general cero. En el caso de U1-59, $E_{A,\ 280}$ de 259400 se usó como un valor estimado de acuerdo con su secuencia de aminoácidos. $E_{D,\ 280}$ y $E_{D,\ 370}$ se pueden obtener sobre la base de la ley de Lambert-Beer (Absorbancia = concentración molar $\times$ coeficiente de absorción molar $\times$ longitud de la trayectoria celular) mediante la medición de la absorbancia de una solución en la

que el precursor conjugado a ser usado se disuelve en una cierta concentración molar. Mediante la medición de A_{280} y A_{370} de una solución acuosa del conjugado anticuerpo-fármaco y la solución de las ecuaciones simultáneas (1) y (2) usando los valores, C_A y C_D se pueden obtener. Además, al dividir C_D entre C_A, el número de unión a fármaco promedio por anticuerpo puede ser obtenido.

En la presente invención, el método para determinar el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por anticuerpo como se describe anteriormente se conoce como un "método UV".

Procedimiento común F: Medición de número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo en conjugado anticuerpo-fármaco - (2)

El número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo en el conjugado anticuerpo-fármaco se puede determinar también por análisis de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) usando el siguiente método, además del Procedimiento común E mencionado.

F-1. Preparación de una muestra para el análisis de HPLC (Reducción de conjugado anticuerpo-fármaco)

Una solución de conjugado anticuerpo-fármaco (aproximadamente 1 mg/mL, 60 u ("u" representa "micro")L) se mezcla con una solución acuosa de ditiotreitol (DTT) (100 mM,

15 uL). Por incubación de la mezcla a 37ºC durante 30 minutos, se escinde el enlace disulfuro entre las cadenas L y H del conjugado anticuerpo-fármaco. La muestra resultante se usa en el análisis de HPLC.

F-2. Análisis de HPLC

El análisis de HPLC se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones de medición.

Sistema de HPLC: sistema de HPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies)

Detector: Espectrómetro de absorción ultravioleta (longitud de onda de medición: 280 nm)

Columna: PLRP-S (2.1×50 mm, 8 um, 1000 angstroms; Agilent Technologies, P/N PL1912-1802)

Temperatura de la columna: 80ºC

Fase móvil A: solución de ácido trifluoroacético acuoso (TFA) al 0.04%

Fase móvil B: solución de acetonitrilo que contiene TFA al 0.04%

Programa de gradientes: 29%-36% (0 min.-12.5 min.), 36%-42% (12.5-15 min.), 42%-29% (15 min.-15.1 min.), 29%-29 % (15.1 min.-25 min.)

Inyección de la muestra: 15 uL

F-3. Análisis de los datos

F-3-1 En comparación con las cadenas L (L_0) y H (H_0) del anticuerpo no conjugado, las cadenas L conjugada a

fármaco (cadena L unida a una molécula de fármaco: L^1) y H (cadena H unida a una molécula de fármaco: H_1, cadena H unida a dos moléculas de fármaco: H_2, cadena H unida a tres moléculas de fármaco: H_3) exhiben mayor hidrofobicidad en proporción al número de moléculas de fármaco conjugadas y por lo tanto tienen un tiempo de retención mayor. Por lo tanto, estas cadenas se eluyen en el orden de L_0 y L_1 o H_0, H_1, H_2, y H_3. Picos de detección se pueden asignar a cualquiera de L_0, L_1, H_0, H_1, H_2 y H_3 por la comparación de los tiempos de retención con L_0 y H_0.

F-3-2 Ya que el enlazador de fármaco tiene absorción UV, valores de área de pico se corrigen en respuesta al número de moléculas de enlace de fármacos conjugados de acuerdo con la siguiente expresión usando los coeficientes de absorción molar de la cadena L o H y el enlazador de fármaco.

$$\text{Valor corregido del área pico de la cadena L } (Li) = \text{Área pico} \times \frac{\text{Coeficiente de absorción molar de la cadena L}}{\text{Coeficiente de absorción molar de la cadena L} + \text{El número de moléculas de fármaco conjugadas} \times \text{Coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco}}$$

$$\text{Valor corregido del área pico de la cadena H } (Hi) = \text{Área pico} \times \frac{\text{Coeficiente de absorción molar de la cadena H}}{\text{Coeficiente de absorción molar de la cadena H} + \text{El número de moléculas de fármaco conjugadas} \times \text{Coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco}}$$

Aquí, un valor estimado de la secuencia de aminoácidos de la cadena L o H de cada anticuerpo usando un método de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423) se puede usar como el coeficiente de absorción molar (280 nm) de la cadena L o H de cada anticuerpo. En el caso de U1-59, un coeficiente de absorción molar de 34690 y un coeficiente de absorción molar de 95000 se usaron como valores estimados para las cadenas L y H, respectivamente, de acuerdo con su secuencia de aminoácidos. El coeficiente de absorción molar (280 nm) realmente medido de un compuesto en el que el grupo maleimida se ha convertido en succinimida tioéter por reacción de cada enlazador de fármaco con mercaptoetanol o N-acetilcisteína se usó como el coeficiente de absorción molar (280 nm) del enlazador de fármaco.

F-3-3 La relación de área de pico (%) de cada cadena se calcula para el total de los valores corregidos de áreas pico.

$$\text{Relación de área pico de la cadena L} = \frac{A_{Li}}{A_{L0}+A_{L1}} \times 100$$

$$\text{Relación de área pico de la cadena H} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0}+A_{H1}+A_{H2}+A_{H3}} \times 100$$

Valores corregidos de las respectivas áreas pico A_{Li}, A_{Hi}:L_i, H_i

F-3-4 El número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticuerpo en el conjugado

anticuerpo-fármaco se calcula según la siguiente expresión.

Número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (relación de área pico L_0 x 0 + relación de área de pico L_0 x 1 + relación de área pico H_0 x 0 + relación de área pico H_1 x 1 + relación de área pico H_2 x 2 + relación de área pico H_3 x 3) / 100 x 2

En lo que sigue, se describen compuestos intermedios de producción usados en el Método de producción 1. El compuesto representado por la fórmula (2) en el método de producción 1 es un compuesto representado por la siguiente fórmula:

(maleimid-N-il)-$(CH_2)n^3$-C(=O)-L^2-L^P-NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-C(=O)-(NH-DX) o

(maleimid-N-il)-$(CH_2)n^3$-C(=O)-L^2-L^P-(NH-DX).

En la fórmula,

n^3 representa un número entero de 2 a 8,

L^2 representa -NH-$(CH_2CH_2$-O$)n^4$-CH_2CH_2-C(=O)- o un enlace sencillo,

en donde n^4 representa un número entero de 1 a 6,

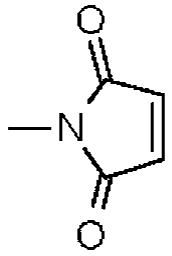
L^P representa un residuo péptido que consiste en 2 a 7 aminoácidos seleccionados a partir de fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico,

n^1 representa un número entero de 0 a 6,

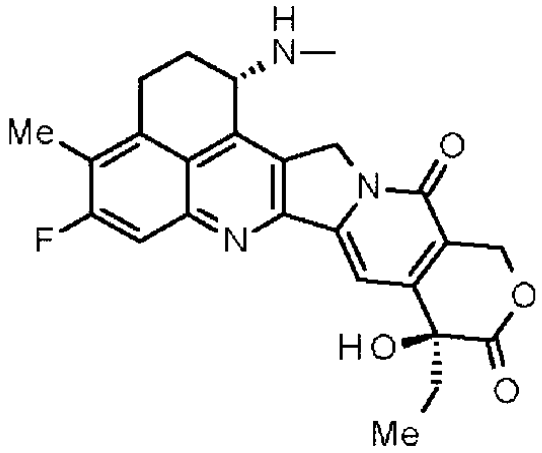
n^2 representa un número entero de 0 a 5,

L^a representa -O- o un enlace sencillo,

(maleimid-N-il)- es un grupo maleimidilo (grupo 2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-ilo) representado por la siguiente fórmula:



en donde el átomo de nitrógeno es la posición conectora, y -(NH-DX) es un grupo representado por la siguiente fórmula:



en donde el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 es la posición de conexión.

En cuanto al residuo de péptido L^P, los que consisten en un aminoácido seleccionado de fenilalanina, glicina, valina, lisina, citrulina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico se prefieren como un intermediario de producción. Entre el residuo de péptido L^P, los que consisten en 4 ó 5 aminoácidos se prefieren como un

intermediario de producción. Más específicamente, aquellos en los que L^P es un residuo tetrapéptido de -GGFG- o un pentapéptido de -DGGFG- se prefieren como un intermediario de producción, más preferiblemente, -GGFG-.

Además, en cuanto al -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$-, los que tienen -NH-CH_2CH_2-, -NH-$CH_2CH_2CH_2$-, -NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-, -NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-, -NH- CH_2-O-CH_2-, o -NH-CH_2CH_2-O-CH_2- se prefieren como un intermediario de producción. Un compuesto de -NH-$CH_2CH_2CH_2$-, -NH-CH_2-O-CH_2-, o -NH-CH_2CH_2-O-CH_2 es más preferido.

En cuanto a n^3, aquellos en los que es un número entero de 2 a 8 se prefierne como un intermediario de producción.

En cuanto a L^2, aquellos en los que es un enlace sencillo o -NH-$(CH_2CH_2$-O$)n^4$-CH_2CH_2-C(=O)- y n^4 es un número entero de 2 a 4, se prefieren como un intermediario de producción.

Además, aquellos en los que n^3 es un número entero de 2 a 5, L^2 es un enlace sencillo, y -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$- es -NH-CH_2CH_2-, -NH-$CH_2CH_2CH_2$-, - NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-, -NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-, -NH-CH_2-O-CH_2-, o -NH-CH_2CH_2-O-CH_2- se prefiere como un intermediario de producción. Además, más preferido entre ellos son aquellos en los que -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$- es -NH-CH_2CH_2-, -NH-$CH_2CH_2CH_2$-, -NH-CH_2-O-CH_2-, o - NH-CH_2CH_2-O-CH_2-. Además, se prefieren aquellos en los que n^3 es

un número entero de 2 ó 5.

Además, aquellos en los que n^3 es un número entero de 2 a 5, L^2 es -NH-$(CH_2CH_2-O)n^4$-CH_2CH_2-C(=O)-, n^4 es un número entero de 2 a 4, y -NH-$(CH_2)n^1$-L^a-$(CH_2)n^2$ es -NH-CH_2CH_2, -NH-$CH_2CH_2CH_2$-, -NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-, -NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-, -NH-CH_2-O-CH_2, o -NH-CH_2CH_2-O-CH_2- se prefiere como un intermediario de producción. Más preferidos entre ellos son aquellos en los que n^4 es un número entero de 2 ó 4. Además, se prefieren aquellos en los que -NH-$(CH_2)n^1$-L^a- es -NH-$CH_2CH_2CH_2$-, -NH-CH_2-O-CH_2-, o -NH-CH_2CH_2-O-CH_2-.

Ejemplos preferidos de los intermediarios que son útiles para la producción del compuesto de la presente invención incluyen los ejemplificados a continuación:

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-

$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX), o

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX).

Mediante la reacción del compuesto fármaco-enlazador seleccionado del grupo de compuestos intermedios antes mencionado con un anticuerpo anti-Her3 o un derivado reactivo del mismo, un enlace tioéter se puede formar en una porción de enlace de disulfuro presente en una parte de bisagra del anticuerpo anti-Her3, y como resultado, el conjugado anticuerpo anti-Her3-fármaco de la presente invención puede ser producido. En este caso, es preferible usar un derivado reactivo de un anticuerpo anti-Her3. Un derivado reactivo obtenido mediante la reducción de un anticuerpo anti-Her3 es particularmente preferido.

Los siguientes son un compuesto que se prefiere más como un intermediario de producción.

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-DGGFG-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX).

Además, entre el grupo de compuestos intermediarios antes mencionado, los compuestos

intermediarios representados por la siguiente fórmula son un compuesto más preferido:

(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX), o

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-DGGFG-(NH-DX).

Particularmente preferidos son los compuestos que están representados por la siguiente fórmula:

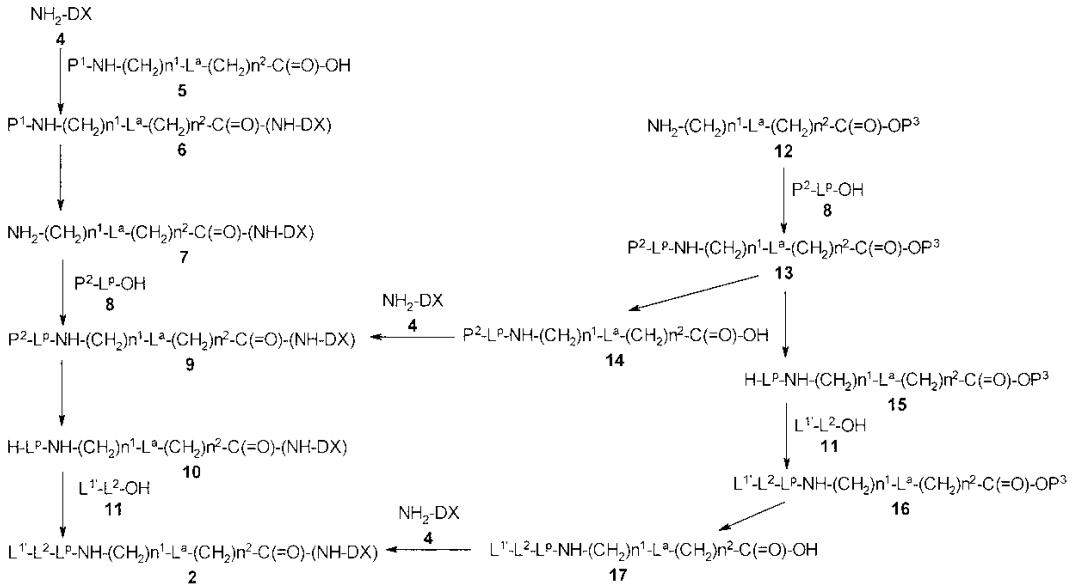
(maleimid-N-il)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-$CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX), o

(maleimid-N-il)-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX).

2. Método de producción 2

El compuesto representado por la fórmula (2) o una sal farmacológicamente aceptable del mismo que se usa como un intermediario en el método de producción anterior puede ser producido por el siguiente método, por ejemplo.



en la fórmula, $L^{1'}$ corresponde a L^1 que tienen una estructura en la que la terminal se convierte en un grupo maleimidilo y P^1, P^2 y P^3 representan un grupo protector.

El compuesto (6) se puede producir por derivatización del ácido carboxílico (5) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y, en presencia de base, haciéndolo reaccionar con NH_2-DX [indicando exatecano; nombre químico: (1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-10,13(9H,15H)-diona] (4) o una sal farmacológicamente aceptable del mismo.

Los reactivos y condiciones de reacción que se usan comúnmente para la síntesis de péptidos se pueden emplear para la reacción. Hay varios tipos de éster activo, por ejemplo, puede ser producido al hacer reaccionar fenoles

tales como p-nitrofenol, N-hidroxi benzotriazol, N-hidroxisuccinimida, o similares, con el ácido carboxílico (5) usando un agente de condensación tal como N,N'-diciclohexilcarbodiimida o clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; además, el éster activo también se puede producir por una reacción del ácido carboxílico (5) con trifluoroacetato de pentafluorofenilo o similares; una reacción del ácido carboxílico (5) con 1-hexafluorofosfito de benzotriazolil oxitripirrolidinofosfonio; una reacción del ácido carboxílico (5) con cianofosfonato de dietilo (método de Shioiri); una reacción del ácido carboxílico (5) con trifenilfosfina y disulfuro de 2,2'-dipiridilo (método de Mukaiyama); una reacción del ácido carboxílico (5) con un derivado de triazina, tal como cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM); o similar. Además, la reacción también se puede realizar mediante, por ejemplo, un método de haluro de ácido por el cual el ácido carboxílico (5) se trate con haluro de ácido tal como cloruro de tionilo y cloruro de oxalilo en presencia de una base.

Haciendo reaccionar el éster activo, anhídrido de ácido mixto, o haluro de ácido del ácido carboxílico (5) obtenido como anteriormente con el compuesto (4) en presencia de una base adecuada en un solvente inerte a una temperatura de reacción de -78ºC a 150ºC, el compuesto (6) se puede

producir. Mientras tanto, "solvente inerte" indica un solvente que no inhibe una reacción deseada para la que se use el solvente.

Ejemplos específicos de la base usada para cada etapa descrita anteriormente incluyen un carbonato, un alcóxido, un hidróxido o un hidruro de un metal alcalino o un metal alcalinotérreo, tal como carbonato de sodio, carbonato de potasio, etóxido de sodio, butóxido de potasio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidruro de sodio, o hidruro de potasio; base organometálica representada por un alquil litio tal como n-butil litio, o dialquilamino litio tal como diisopropilamida de litio; base organometálica tal como bissililamina incluyendo bis(trimetilsilil)amida de litio; y base orgánica tal como piridina, 2,6-lutidina, colidina, 4-dimetilaminopiridina, trietilamina, N-metilmorfolina, diisopropiletilamina, y diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU).

Ejemplos del solvente inerte que se usa para la reacción de la presente invención incluyen un solvente hidrocarbonado halogenado tal como diclorometano, cloroformo y tetracloruro de carbono; un solvente de éter tal como tetrahidrofurano, 1,2-dimetoxietano y dioxano; un solvente de hidrocarburo aromático tal como benceno y tolueno; y un solvente de amida tal como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, y N-metilpirrolidin-2-ona. Además de ellos, un solvente de sulfóxido tal como sulfóxido de

dimetilo y sulfolano; un solvente de cetona tal como acetona y metil etil cetona; y un solvente alcohólico tal como metanol y etanol se puede usar en algunos casos. Alternativamente, estos solventes se pueden usar como un solvente mixto.

En cuanto al grupo protector P^1 para el grupo amino terminal del compuesto (6), se puede usar un grupo protector para un grupo amino que se use generalmente para la síntesis de péptidos, por ejemplo, grupo terc-butiloxi carbonilo, grupo 9-fluorenilmetiloxi carbonilo y grupo benciloxi carbonilo. Ejemplos del otro grupo protector para un grupo amino incluyen un grupo alcanoilo tal como grupo acetilo; un grupo alcoxicarbonilo tal como un grupo metoxicarbonilo y grupo etoxicarbonilo; un grupo carbonilo arilmetoxi tal como un grupo parametoxibenciloxi carbonilo, y grupo para (u orto) nitrobenciloxi carbonilo; un grupo arilmetilo tal como un grupo bencilo y grupo trifenil metilo; un grupo aroilo tal como un grupo benzoilo; y un grupo arilsulfonilo tal como un grupo 2,4-dinitrobencen sulfonilo y grupo ortonitrobencen sulfonilo. El grupo protector P^1 se puede seleccionar dependiendo de, por ejemplo, las propiedades de un compuesto que tenga un grupo amino a ser protegido.

Desprotegiendo el grupo protector P^1 para el grupo amino terminal del compuesto (6) obtenido, se puede producir el compuesto (7). En esta desprotección, los reactivos y

condiciones se pueden seleccionar dependiendo del grupo protector.

El compuesto (9) se puede producir por derivatización del ácido carboxílico péptido (8) que tenga la N-terminal protegida con P^2 en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (7) obtenido. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente inerte usados para una formación de enlaces peptídicos entre el ácido carboxílico péptido (8) y el compuesto (7) pueden ser adecuadamente seleccionadas de las descritos para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P^2 puede ser adecuadamente seleccionado de los descritos para el grupo protector del compuesto (6), y la selección puede hacerse sobre la base de, por ejemplo, las propiedades del compuesto que tenga un grupo amino a ser protegido. Tal como se usa en general para la síntesis de péptidos, repitiendo secuencialmente la reacción y la desprotección del aminoácido o péptido que constituya el ácido carboxílico péptido (8) para la elongación, el compuesto (9) también se puede producir.

Desprotegiendo P^2 como el grupo protector para el grupo amino del compuesto (9) obtenido, se puede producir el compuesto (10). En esta desprotección, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar dependiendo del grupo protector.

Es posible producir el compuesto (2) por derivatización del ácido carboxílico (11) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (10) obtenido. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente inerte usado para la formación de un enlace peptídico entre el ácido carboxílico (11) y el compuesto (10) pueden seleccionarse adecuadamente de las descritas para la síntesis del compuesto (6).

El compuesto (9) también se puede producir por el siguiente método, por ejemplo.

El compuesto (13) se puede producir por derivatización del ácido carboxílico péptido (8) que tenga la N-terminal protegida con P^2 en éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto de amina (12) que tenga el grupo carboxi protegido con P^3 en presencia de una base. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente inerte usado para la formación de un enlace peptídico entre el ácido carboxílico péptido (8) y el compuesto (12) pueden ser adecuadamente seleccionadas de las descritas para la síntesis del compuesto (6).

El grupo protector P^2 para el grupo amino del compuesto (13) no está limitado particularmente si es un grupo protector que se usa comúnmente. Específicamente,

ejemplos del grupo protector para un grupo hidroxilo incluyen un grupo alcoximetilo tal como un grupo metoximetilo; un grupo arilmetilo tal como un grupo bencilo, un grupo 4-metoxibencilo, y un grupo trifenilmetilo; un grupo alcanoilo tal como grupo acetilo; un grupo aroilo tal como un grupo benzoilo; y un grupo sililo tal como un grupo terc-butil difenilsililo. El grupo carboxi puede ser protegido por un éster con un grupo alquilo tal como grupo metilo, grupo etilo, y grupo terc-butilo, un grupo alilo, o un grupo arilmetilo tal como un grupo bencilo. En cuanto al grupo amino, se pueden mencionar un grupo alquiloxi carbonilo tal como un grupo terc-butiloxi carbonilo, grupo metoxicarbonilo, y grupo etoxicarbonilo; un grupo arilmetoxi carbonilo tal como grupo aliloxicarbonilo, grupo 9-fluorenilmetiloxi carbonilo, grupo benciloxi carbonilo, grupo parametoxibenciloxi carbonilo, y grupo para (u orto) nitrobenciloxi carbonilo; un grupo alcanoilo tal como grupo acetilo; un grupo arilmetilo tal como un grupo bencilo y grupo trifenil metilo; un grupo aroilo tal como un grupo benzoilo; y un grupo arilsulfonilo tal como un grupo 2,4-dinitrobencen sulfonilo o grupo ortonitrobencen sulfonilo.

En cuanto al grupo protector P^3 para un grupo carboxi, se puede usar un grupo protector usado comúnmente como un grupo protector para un grupo carboxi en la química de síntesis orgánica, en particular, la síntesis de péptidos.

Un grupo carboxilo puede protegerse como un éster con un grupo alquilo tal como un grupo metilo, un grupo etilo, o un grupo terc-butilo, un grupo alilo, y un grupo arilmetilo tal como un grupo bencilo.

En tal caso, es preferible que el grupo protector para un grupo amino y el grupo protector para un grupo carboxi puede ser eliminado por un método diferente o condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P^2 es un grupo terc-butiloxi carbonilo y P^3 es un grupo bencilo. Los grupos protectores se pueden seleccionar de los anteriormente citados dependiendo de, por ejemplo, las propiedades de un compuesto que tenga un grupo amino y un grupo carboxi a proteger. Para la eliminación de los grupos protectores, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar en función del grupo protector.

Por desprotección del grupo protector P^3 para el grupo carboxi del compuesto (13) obtenido, el compuesto (14) se puede producir. En esta desprotección, los reactivos y las condiciones se seleccionan en función del grupo protector.

El compuesto (9) se puede producir por derivatización del compuesto (14) obtenido en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciendo reaccionar con el compuesto (4) en

presencia de una base. Para la reacción, los reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos también se pueden usar, y las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente inerte usados para la reacción se pueden seleccionar adecuadamente a partir de las descritas para la síntesis del compuesto (6).

El compuesto (2) también se puede producir por el siguiente método, por ejemplo.

Por desprotección del grupo protector P^2 para el grupo amino del compuesto (13), el compuesto (15) se puede producir. En esta desprotección, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar dependiendo del grupo protector.

El compuesto (16) se puede producir por derivatización del derivado de ácido carboxílico (11) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (15) obtenido en presencia de una base. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente inerte usado para la formación de un enlace amida entre el ácido carboxílico péptido (11) y el compuesto (15) pueden ser adecuadamente seleccionados de las descritas para la síntesis del compuesto (6).

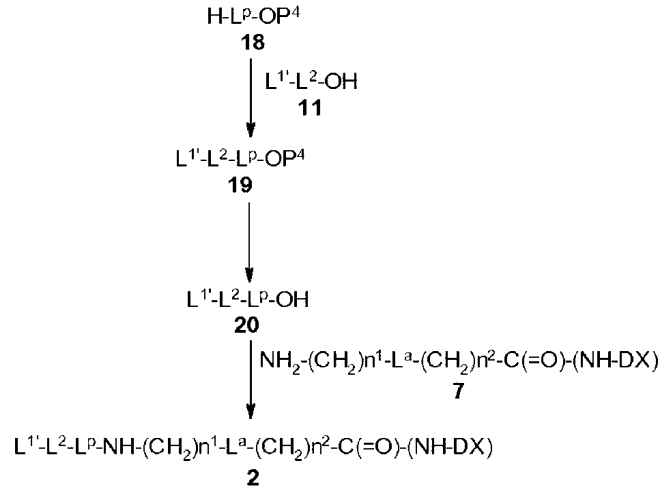
Por desprotección del grupo protector para el grupo carboxi del compuesto (16) obtenido, el compuesto (17) se

puede producir. En esta desprotección, se puede llevar a cabo de forma similar a la desprotección de grupo carboxilo para producir el compuesto (14).

El compuesto (2) puede ser producido por derivatización del compuesto (17) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) en presencia de una base. Para la reacción, los reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos también se pueden usar, y las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente inerte usado para la reacción se pueden seleccionar adecuadamente a partir de las descritas para la síntesis del compuesto (6).

3. Método de producción 3

El compuesto representado por la fórmula (2) usado como un intermediario también se puede producir por el siguiente método.



en la fórmula, $L^{1'}$ corresponde a L^1 que tienen un estructura en la que la terminal se convierte en un grupo maleimidilo y P^4 representa un grupo protector.

El compuesto (19) se puede producir por derivatización del compuesto (11) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el ácido carboxílico péptido (18) que tenga la C-terminal protegida con P^4 en presencia de una base. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente inerte usado para la formación de un enlace peptídico entre el ácido péptido carboxílico (18) y el compuesto (11) pueden ser adecuadamente seleccionadas de las descritas para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P^4 para el grupo carboxi del compuesto (18) puede seleccionarse adecuadamente a partir de los grupos protectores mencionados anteriormente.

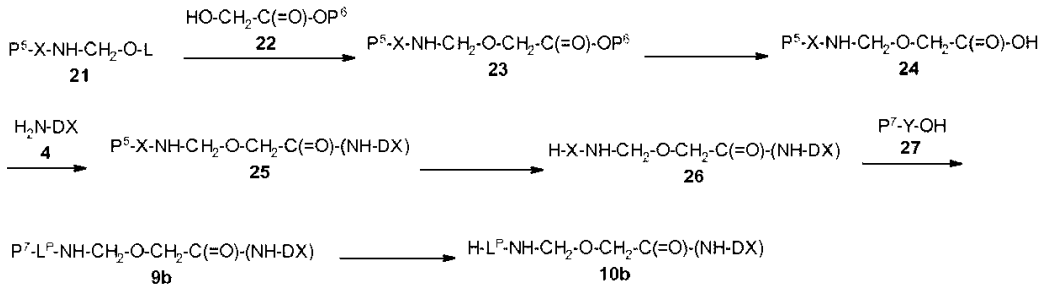
Por desprotección del grupo protector para el grupo carboxi del compuesto (19) obtenido, el compuesto (20) se puede producir. Esta desprotección se puede llevar a cabo de forma similar a la desprotección del grupo carboxilo para producir el compuesto (14).

El compuesto (2) puede ser producido por derivatización del compuesto (20) obtenido en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (7). Para la reacción, los reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente

para la síntesis de péptidos también se pueden usar, y las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente inerte usado para la reacción se pueden seleccionar adecuadamente a partir de las descritas para la síntesis del compuesto (6).

4. Método de producción 4

En lo que sigue, dentro del intermediario de producción (10) descrito en el método de producción 2, se describe en detalle el método para producir el compuesto (10b) que tiene $n^1 = 1$ y $L^a = 0$. El compuesto representado por la fórmula (10b), una sal o un solvato del mismo puede ser producido de acuerdo con el siguiente método, por ejemplo.



en la fórmula, L^P es como se ha definido anteriormente, L representa un grupo acilo que incluye un grupo alcanoilo tal como un grupo acetilo o un grupo aroilo tal como grupo benzoilo, o representa un átomo de hidrógeno o similares, X e Y representan un oligopéptido que consiste en 1 a 3 aminoácidos, P^5 y P^7 representan un grupo protector para un grupo amino, y P^6 representa un grupo protector para un

grupo carboxi.

Un compuesto representado por la fórmula (21) se puede producir mediante el uso o la aplicación del método descrito en la Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2002-60351 o la literatura (J. Org. Chem., Vol. 51, página 3196, 1986), y si es necesario, mediante la eliminación de los grupos protectores o la modificación de los grupos funcionales. Alternativamente, también puede obtenerse mediante el tratamiento de un aminoácido con un grupo amino terminal protegido o amida de ácido de oligopéptido con el grupo amino protegido con el aldehído o cetona.

Haciendo reaccionar el compuesto (21) con el compuesto (22) que tiene un grupo hidroxilo en condiciones de temperatura que van desde bajo enfriamiento a temperatura ambiente en un solvente inerte en presencia de un ácido o una base, el compuesto (23) se puede producir.

Aquí, ejemplos del ácido que se puede usar pueden incluir ácido inorgánico tal como ácido fluorhídrico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y ácido bórico; un ácido orgánico tal como ácido acético, ácido cítrico, ácido paratoluensulfónico y ácido metanosulfónico; y un ácido de Lewis tal como tetrafluoroborato, cloruro de zinc, cloruro de estaño, cloruro de aluminio y cloruro de hierro. Entre ellos, los

ácidos sulfónicos son preferibles, y ácido paratoluensulfónico es particularmente preferible. En cuanto a la base, cualquiera de las bases antes mencionadas puede ser adecuadamente seleccionada y usada. Ejemplos preferidos de las mismas incluyen un alcóxido de metal alcalino tal como terc-butóxido de potasio, un hidróxido de metal alcalino o metal alcalinotérreo tal como hidróxido de sodio e hidróxido de potasio; hidruro de metal alcalino tal como hidruro de sodio e hidruro de potasio; base organometálica representada por dialquilamino litio tal como diisopropilamida de litio; y base organometálica de bissililamina tal como bis(trimetilsilil)amida de litio.

Ejemplos del solvente que se usa para la reacción incluyen un solvente de éter tal como tetrahidrofurano y 1,4-dioxano; y un solvente de hidrocarburo aromático tal como benceno y tolueno. Estos solventes se pueden preparar como una mezcla con agua.

Además, el grupo protector para un grupo amino tal como se representa como P^5 no está limitado particularmente si es un grupo comúnmente usado para la protección de un grupo amino. Ejemplos representativos pueden incluir los grupos protectores para un grupo amino que se describe en el Método de Producción 2. Sin embargo, el grupo protector para un grupo amino como el representado como P^5 puede ser escindido en el curso de la reacción. En tal caso, un grupo

protector puede ser reintroducido mediante la realización de una reacción adecuadamente con un reactivo adecuado para proteger un grupo amino según sea necesario.

El compuesto (24) puede ser derivado mediante la eliminación del grupo protector P^6 del compuesto (23). En este documento, aunque se describen ejemplos representativos del grupo protector para un grupo carboxi tal como se representa como P^6 en el Método de producción 2, se puede seleccionar apropiadamente a partir de estos ejemplos. En el compuesto (23), es deseable que el grupo protector P^5 para un grupo amino y el grupo protector P^6 para un grupo carboxi sean los grupos protectores que se puedan eliminar mediante un método diferente o condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo puede incluir una combinación en la que P^5 sea un grupo 9-fluorenilmetiloxi carbonilo y P^6 sea un grupo bencilo. Los grupos protectores se pueden seleccionar dependiendo de, por ejemplo, las propiedades de un compuesto que tenga un grupo amino y un grupo carboxi a proteger. Para la eliminación de los grupos protectores, los reactivos y condiciones se seleccionan dependiendo del grupo protector.

El compuesto (26) se puede producir por derivatización del compuesto (24) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) o una sal farmacológicamente aceptable del mismo en presencia de una

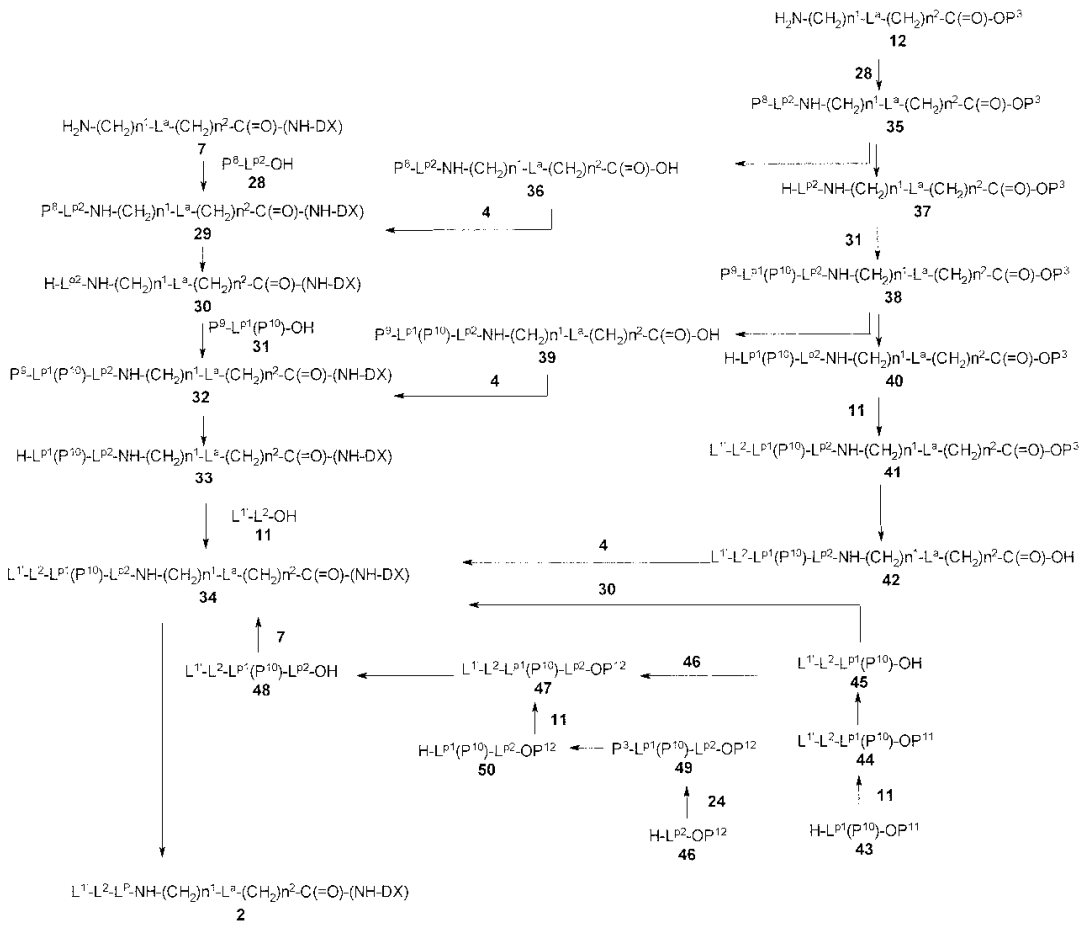
base para producir el compuesto (25) seguido de la eliminación del grupo protector P^5 del compuesto (25) obtenido. Para la reacción entre el compuesto (4) y el ácido carboxílico (24) y la reacción para eliminar el grupo protector P^6, los mismos reactivos y condiciones de reacción que los descritos para el Método de producción 2 pueden ser usados.

El compuesto (10b) se puede producir haciendo reaccionar el compuesto (26) con un aminoácido con el grupo amino terminal protegido o el oligopéptido (27) con el grupo amino protegido para producir el compuesto (9b) y la eliminación del grupo protector P^7 del compuesto (9b) obtenido. El grupo protector para un grupo amino tal como se representa como P^7 no está limitado particularmente si se usa generalmente para la protección de un grupo amino. Ejemplos representativos de los mismos incluyen los grupos protectores para un grupo amino que se describe en el Método de producción 2. Para eliminar el grupo protector, los reactivos y las condiciones se seleccionan en función del grupo protector. Para la reacción entre el compuesto (26) y el compuesto (27), se pueden emplear los reactivos y condiciones de reacción que se usen comúnmente para la síntesis de péptidos. El compuesto (10b) producido por el método antes mencionado se puede derivatizar en el compuesto (1) de la presente invención de acuerdo con el método

descrito anteriormente.

5. Método de producción 5

El compuesto representado por la fórmula (2) como un intermediario también se puede producir por el método que se muestra a continuación.



en la fórmula, $L^{1'}$ corresponde a L^1 que tiene una estructura en la que la terminal se convierte en un grupo maleimidilo, L^P representa una estructura que consiste en -L^{p1}-L^{p2}-, y P^3, P^8, P^9, P^{10}, P^{11} y P^{12} representan un grupo protector.

Debido a que L^P se forma conectando L^{p1} a L^{p2}, el

aminoácido hidrófilo en la N-terminal de L^P se deriva de L^{p1}, y por lo tanto, los que tienen un aminoácido hidrófilo en la N-terminal se emplean adecuadamente como L^{p1}. Mientras tanto, varios aminoácidos hidrófilos pueden estar presentes en el mismo. Además, cuando L^{p2} se emplea con aminoácido hidrófilo, L^p que tiene varios aminoácidos hidrófilos en la N-terminal de L^P o en la N-terminal y en otras posiciones se puede producir dependiendo de la localización del aminoácido hidrófilo.

El compuesto (29) se puede producir por derivatización del péptido o aminoácido (28) que tenga la N-terminal protegida con P^2 en éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (7) obtenido. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace amida entre el péptido o aminoácido (28) y el compuesto (7) pueden ser adecuadamente seleccionadas de las descritas para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P^8 para un grupo amino puede seleccionarse adecuadamente de los descritos para el grupo protector del compuesto (6), y la selección puede hacerse con base en las propiedades del compuesto o similares. Tal como se usa en general para la síntesis de péptidos, repitiendo secuencialmente la reacción y la desprotección del aminoácido o péptido que constituye el péptido o aminoácido (28) para la elongación, el compuesto

(29) se puede producir también.

Por desprotección de P^8 como grupo protector del grupo amino del compuesto (29) obtenido, el compuesto (23) se puede producir. En esta desprotección, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar dependiendo del grupo protector.

El compuesto (32) se puede producir por derivatización del aminoácido o péptido (31) que tenga la N-terminal protegida con P^8 y el grupo carboxi, grupo hidroxi o grupo amino protegido en la cadena lateral protegida en éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (30) obtenido. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente inerte usado para la formación de un enlace peptídico entre el aminoácido o péptido (31) y el compuesto (30) pueden seleccionarse adecuadamente de las descritas para la síntesis del compuesto (6). En cuanto a los grupos protectores P^8 y P^9, los grupos protectores pueden ser adecuadamente seleccionados a partir de aquellos descritos como grupo protector para un grupo amino, grupo carboxi o grupo hidroxi del compuesto (6). Sin embargo, en tal caso, es necesario que el grupo protector P^9 para un grupo amino y el grupo protector P^{10} para un grupo funcional en la cadena lateral pueda ser eliminado por un método diferente o condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en caso de que

P^9 sea un grupo 9-fluorenilmetiloxi carbonilo y P^{10} sea un grupo terc-butilo o similares como un grupo protector para un grupo carboxi, un grupo metoximetilo o similar como un grupo protector para un grupo hidroxi, o un grupo terc-butiloxicarbonilo o similar como un grupo protector para un grupo amino. El grupo protector P^{10} para un grupo funcional en una cadena lateral es preferiblemente un grupo protector que se puede desproteger mediante un tratamiento en condiciones ácidas. Sin embargo, no se limita a esto, y puede ser seleccionado entre los anteriormente citados dependiendo de, por ejemplo, las propiedades del grupo amino, grupo carboxi, o grupo hidroxi de un compuesto a ser protegido. Para la eliminación de los grupos protectores, los reactivos y condiciones se seleccionan dependiendo del grupo protector. Tal como se usa en general para la síntesis de péptidos, repitiendo secuencialmente la reacción y la desprotección del aminoácido que constituye o péptido para la elongación, el compuesto (32) se puede producir también.

Por desprotección de P^9 como grupo protector del grupo amino terminal del compuesto (32) obtenido, el compuesto (33) se puede producir. En esta desprotección, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar dependiendo del grupo protector.

Es posible producir el compuesto (34) por derivatización del derivado de ácido carboxílico (11) en un

éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (33) obtenido. En este documento, el derivado de ácido carboxílico (11) es un compuesto con una estructura en la que la terminal enlazadora de $L^{1'}$ tiene un grupo maleimidilo.

Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace peptídico entre el derivado de ácido carboxílico (11) y el compuesto (33) pueden ser adecuadamente seleccionadas de las descritas para la síntesis del compuesto (6).

Desprotegiendo el grupo protector P^{10} para el grupo carboxilo, grupo hidroxi, o un grupo amino en la cadena lateral de aminoácidos de la parte peptídica del compuesto (34) obtenido, el compuesto (2) puede ser producido. Los reactivos y condiciones se pueden seleccionar en función del grupo protector.

El compuesto (29) también se puede producir por el siguiente método, por ejemplo.

El compuesto (35) se puede producir por derivatización del péptido o aminoácido (28) que tenga la N-terminal protegida con P^8 en éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto de amina (12) que tenga el grupo carboxi terminal protegido con P^3 en presencia de una base. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la

formación de un enlace peptídico entre el péptido o aminoácido (28) y el compuesto (12) pueden ser adecuadamente seleccionadas de las descritas para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P^8 para un grupo amino del compuesto (35) puede ser adecuadamente seleccionado y usado de los descritos como un grupo protector para el compuesto (6). En cuanto al grupo protector P^3 para un grupo carboxi, se puede usar un grupo protector usado comúnmente como un grupo protector para un grupo carboxi en la química de síntesis orgánica, en particular, la síntesis de péptidos. Ejemplos específicos incluyen éster de alquilo tal como grupo metilo, grupo etilo, y terc-butilo, éster de alilo, y éster de bencilo, y puede ser adecuadamente seleccionados y usados de los grupos protectores que se describen para el compuesto (6). En tal caso, es necesario que el grupo protector P^8 para un grupo amino y el grupo protector P^3 para un grupo carboxi pueda ser eliminado por un método diferente o condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P^8 es un grupo terc-butiloxi carbonilo y P^3 es un grupo bencilo. Los grupos protectores se pueden seleccionar de los anteriormente citados dependiendo de, por ejemplo, las propiedades de un compuesto que tenga un grupo amino y un grupo carboxi a proteger. Para la eliminación de los grupos protectores, los reactivos y condiciones se seleccionan dependiendo del grupo

protector.

Desprotegiendo el grupo protector P^3 para el grupo carboxi del compuesto (35) obtenido, el compuesto (36) se puede producir. En esta desprotección, los reactivos y las condiciones se seleccionan en función del grupo protector.

El compuesto (29) se puede producir por derivatización del compuesto (36) obtenido en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) en presencia de una base. Para la reacción, los reactivos y condiciones de reacción que se usen generalmente para la síntesis de péptidos se pueden usar también, y las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usado para la reacción se pueden seleccionar adecuadamente a partir de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

El compuesto (32) también se puede producir por el siguiente método, por ejemplo.

Desprotegiendo el grupo protector P^8 para el grupo amino del compuesto (35), el compuesto (37) se puede producir. En esta desprotección, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar dependiendo del grupo protector.

El compuesto (38) se puede producir por derivatización del aminoácido o péptido (31) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (37)

obtenido en presencia de una base. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace amida entre el aminoácido o péptido (31) y el compuesto (37) pueden ser adecuadamente seleccionados de los descritos para la síntesis del compuesto (6). En tal caso, es necesario que el grupo protector P^9 y P^{10} para el aminoácido o péptido (31) y el grupo protector P^3 para el compuesto (37) se pueden eliminar mediante un método diferente o condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P^9 es un grupo 9-fluorenilmetiloxi carbonilo, P^{10} es un grupo terc-butiloxi carbonilo, grupo terc-butilo, o un grupo metoximetilo, y P^3 es un grupo bencilo. Además, el grupo protector P^{10} para un grupo funcional en una cadena lateral es preferiblemente un grupo protector que se puede desproteger mediante un tratamiento en condiciones ácidas como se describe anteriormente. Sin embargo, no se limita a esto, y puede ser seleccionado entre los anteriormente citados dependiendo de, por ejemplo, las propiedades del grupo amino, grupo carboxi, o un grupo hidroxi de un compuesto a ser protegido. Para la eliminación de los grupos protectores, los reactivos y condiciones se seleccionan dependiendo del grupo protector.

Desprotegiendo el grupo protector P^3 para el grupo carboxi del compuesto (38) obtenido, el compuesto (39) se

puede producir. En esta desprotección, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar dependiendo del grupo protector.

El compuesto (32) se puede producir por derivatización del compuesto (39) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) en presencia de una base. Para la reacción, los reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos se pueden usar también, y las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usado para la reacción se pueden seleccionar adecuadamente a partir de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

El compuesto (34) también se puede producir por el siguiente método, por ejemplo.

Desprotegiendo el grupo protector P^9 para el grupo amino del compuesto (38), el compuesto (40) se puede producir. En esta desprotección, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar dependiendo del grupo protector.

El compuesto (41) se puede producir por derivatización del derivado de ácido carboxílico (11) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (40) obtenido en presencia de una base. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la

formación de un enlace amida entre el derivado de ácido carboxílico (11) y el compuesto (40) pueden ser adecuadamente seleccionados de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

Desprotegiendo el grupo protector P^3 para el grupo carboxi del compuesto (41) obtenido, el compuesto (42) se puede producir. En esta desprotección, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar dependiendo del grupo protector.

El compuesto (34) se puede producir por derivatización del compuesto (42) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) en presencia de una base. Para la reacción, los reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos se pueden usar también, y las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usado para la reacción se pueden seleccionar adecuadamente a partir de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

El compuesto (34) también se puede producir por el siguiente método, por ejemplo.

El compuesto (44) se puede producir por derivatización del derivado de ácido carboxílico (11) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similar, y haciéndolo reaccionar con el aminoácido o péptido

(43) que tenga el grupo carboxi protegido con P^{11} y el grupo carboxi, un grupo hidroxi, o un grupo amino en la cadena lateral protegidos con P^{10} en presencia de una base. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace amida entre el derivado de ácido carboxílico (11) y el compuesto (43) pueden ser adecuadamente seleccionados de los descritos para la síntesis del compuesto (6). En cuanto a los grupos protectores P^{10} y P^{11} del compuesto (44), los grupos protectores pueden ser adecuadamente seleccionados a partir de aquellos descritos como grupo protector para un grupo carboxi, un grupo hidroxi, o grupo amino del compuesto (6). Mientras tanto, en tal caso, es necesario que el grupo protector P^{11} para un grupo carboxi y el grupo protector P^{10} para un grupo funcional en la cadena lateral puedan ser eliminados por un método diferente o condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P^{11} es un grupo bencilo y P^{10} es un grupo terc-butilo o similares como un grupo protector para un grupo carboxi, un grupo metoximetilo o similar como un grupo protector para un grupo hidroxi, o un grupo terc-butiloxicarbonilo o similar como un grupo protector para un grupo amino. El grupo protector P^{10} para un grupo funcional en una cadena lateral es preferiblemente un grupo protector que se puede desproteger mediante un tratamiento en condiciones ácidas. Sin embargo,

no se limita a esto, y puede ser seleccionado entre los anteriormente citados dependiendo de, por ejemplo, las propiedades del grupo amino, grupo carboxi, o un grupo hidroxi de un compuesto a ser protegido. Para eliminar el grupo protector, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar en función del grupo protector.

Desprotegiendo el grupo protector P^{11} para el grupo carboxi del compuesto (44) obtenido, el compuesto (45) se puede producir. En esta desprotección, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar dependiendo del grupo protector.

El compuesto (34) se puede producir por derivatización del compuesto (45) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (30) en presencia de una base. Para la reacción, los reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos se pueden usar también, y las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usado para la reacción se pueden seleccionar adecuadamente a partir de las descritas para la síntesis del compuesto (6).

El compuesto (47) se puede producir por derivatización del compuesto (45) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido o similar, y haciéndolo reaccionar con el aminoácido o péptido (46) que

tiene el grupo carboxi protegido con P^{12} en presencia de una base. Para la reacción, los reactivos y condiciones de reacción comúnmente usados para la síntesis de péptidos se pueden usar y las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente se pueden seleccionar adecuadamente a partir de los descritos para la síntesis del compuesto (6). En cuanto a los grupos protectores P^{10} y P^{12} del compuesto (47), los grupos protectores pueden ser adecuadamente seleccionados y usados de los descritos como un grupo protector para un grupo carboxi, un grupo hidroxi, o grupo amino del compuesto (6). Mientras tanto, en tal caso, es necesario que el grupo protector P^{12} para un grupo carboxi y el grupo protector P^{10} para un grupo funcional en la cadena lateral puedan ser eliminados por un método diferente o condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P^{12} es un grupo bencilo y P^{10} es un grupo terc-butilo o similares como un grupo protector para un grupo carboxi, un grupo metoximetilo o similar como un grupo protector para un grupo hidroxi, o un grupo terc-butiloxicarbonilo o similar como un grupo protector para un grupo amino. El grupo protector P^{10} para un grupo funcional en una cadena lateral es preferiblemente un grupo protector que se puede desproteger mediante un tratamiento en condiciones ácidas. Sin embargo, no se limita a esto, y puede ser seleccionado entre los anteriormente citados

dependiendo de, por ejemplo, las propiedades del grupo amino, grupo carboxi, o un grupo hidroxi de un compuesto a ser protegido. Para eliminar el grupo protector, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar en función del grupo protector. Además, el compuesto (47) también se puede producir mediante la repetición de forma secuencial de la reacción y la desprotección del aminoácido o péptido constituyente para la elongación.

Desprotegiendo el grupo protector P^{12} para el grupo carboxi del compuesto (47) obtenido, el compuesto (48) se puede producir. Los reactivos y condiciones se pueden seleccionar en función del grupo protector.

El compuesto (34) se puede producir por derivatización del compuesto (48) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (7) en presencia de una base. Para la reacción, los reactivos y condiciones de reacción que se usan generalmente para la síntesis de péptidos se pueden usar también, y las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usado para la reacción se pueden seleccionar adecuadamente a partir de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

El compuesto (47) también se puede producir por el siguiente método, por ejemplo.

El péptido (49) puede ser producido por

derivatización del aminoácido o péptido (46) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similar, y haciéndolo reaccionar con el aminoácido o péptido (31) que tenga la N-terminal protegida con P^9 y el grupo carboxi, un grupo hidroxi, o un grupo amino en la cadena lateral protegida con P^{10} en presencia de una base. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace peptídico entre el aminoácido o péptido (46) y el aminoácido o péptido (31) pueden ser adecuadamente seleccionados de los descritos para la síntesis del compuesto (6). Mientras tanto, en este caso, es necesario que el grupo protector P^{12} para un grupo carboxi del aminoácido o péptido (46) y el grupo protector P^9 y P^{10} para el aminoácido o péptido (31) se puedan quitar de la misma manera que la descrita más arriba, pero por un método diferente o condiciones diferentes. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P^9 es un grupo 9-fluorenilmetiloxi carbonilo, P^{10} es un grupo terc-butilo o similares como un grupo protector para un grupo carboxi, un grupo metoximetilo o similar como un grupo protector para un grupo hidroxi, o un grupo terc-butiloxicarbonilo como un grupo protector o similar, para un grupo amino, y P^{12} es un grupo bencilo. El grupo protector P^{10} para un grupo funcional en una cadena lateral es preferiblemente un grupo protector que se puede desproteger

mediante un tratamiento en condiciones ácidas. Sin embargo, no se limita a esto, y puede ser seleccionado entre los anteriormente citados dependiendo de, por ejemplo, las propiedades del grupo amino, grupo carboxi, o un grupo hidroxi de un compuesto a ser protegido. Para eliminar el grupo protector, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar en función del grupo protector.

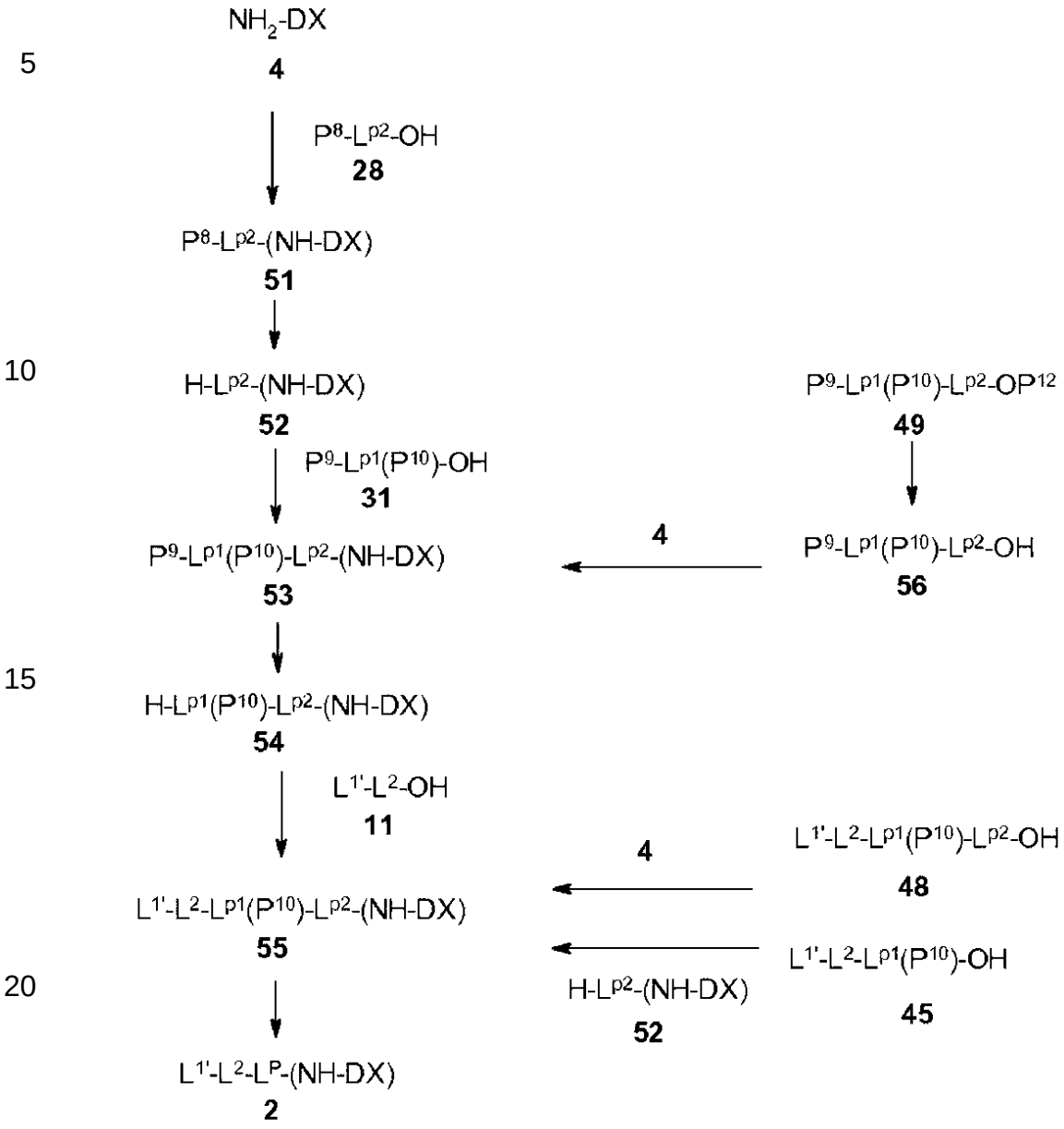
Por desprotección del grupo protector P^9 para la N-terminal del péptido (49) obtenido, el compuesto (50) se puede producir. Los reactivos y condiciones se pueden seleccionar en función del grupo protector.

El compuesto (47) se puede producir por derivatización del derivado de ácido carboxílico (11) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similar, y haciéndolo reaccionar con el péptido (50) obtenido en presencia de una base. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace amida entre el derivado de ácido carboxílico (11) y el péptido (50) pueden ser adecuadamente seleccionados de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

6. Método de producción 6

Dentro del intermediario de producción (2), aquellos en los que el enlazador tenga una estructura representada por $-L^1-L^2-L^P-$, y el L^P sea el residuo péptido que contenga un aminoácido hidrófilo en la N-terminal y el

aminoácido hidrófilo situado en el extremo N terminal sea distinto de glicina, pueden ser también producidos por el método siguiente.



en la fórmula, $L^{1'}$ corresponde a L^1 que tiene una estructura en la que la terminal se modifica a grupo maleimidilo, L^P representa una estructura que consiste en -

L^{p1}-L^{p2}-, y P^8, P^9, P^{10} y P^{12} representan un grupo protector.

Debido a que L^P se forma conectando L^{p1} a L^{p2}, el aminoácido hidrófilo en la N-terminal de L^P se deriva de L^{p1}, y por lo tanto, aquellos que tienen un aminoácido hidrófilo en la N-terminal se emplean adecuadamente como L^{p1}. Mientras tanto, varios aminoácidos hidrófilos pueden presentarse en la misma. Además, cuando se emplea L^{p2} con aminoácido hidrófilo, L^p que tiene los varios aminoácidos hidrófilos en la N-terminal de L^P o en la N-terminal y en otras posiciones se puede producir dependiendo de su ubicación de aminoácido hidrófilo.

El compuesto (51) se puede producir por derivatización del péptido o aminoácido (28) que se describe en el Método de producción 5, que tiene la N-terminal protegida con P^8, en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares, y haciendo reaccionar con el compuesto (4) y una sal del mismo. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace peptídico entre el péptido o aminoácido (28) y el compuesto (4) puede ser adecuadamente seleccionados de los descritos para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P^8 puede ser adecuadamente seleccionado y usado de los descritos como grupo protector para el compuesto (6), y puede seleccionarse dependiendo de, por ejemplo, una propiedad del compuesto que tenga un grupo amino a ser

protegido. Además, ya que se usa generalmente para la síntesis de péptidos, repitiendo secuencialmente la reacción y la desprotección del aminoácido o péptido que constituye el péptido o aminoácido (28) para la elongación, el compuesto (51) puede ser también producido.

Desprotegiendo el grupo protector P^8 para el grupo amino del compuesto (51) obtenido, el compuesto (52) se puede producir. En esta desprotección, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar dependiendo del grupo protector.

El compuesto (53) se puede producir por derivatización del aminoácido o péptido (31) que tenga la N-terminal protegida con P^9 y el grupo carboxi, un grupo hidroxi, o un grupo amino en la cadena lateral protegida con P^{10} como se describe en el Método de producción 4 en éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (52) obtenido. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace peptídico entre el aminoácido o péptido (31) y el compuesto (52) pueden ser adecuadamente seleccionadas de las descritas para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P^9 y P^{10} son los mismos que los descritos en el Método de producción 5. Además, ya que se usa generalmente para la síntesis de péptidos, repitiendo secuencialmente la reacción y la desprotección del aminoácido o péptido constituyente para la elongación, el compuesto (53)

también se pueden producir.

Por desprotección de P^9 como el grupo protector del grupo amino del compuesto (53) obtenido, el compuesto (54) se puede producir. En esta desprotección, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar dependiendo del grupo protector.

Es posible producir el compuesto (55) por derivatización del derivado de ácido carboxílico (11) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (54) obtenido. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace peptídico entre el derivado de ácido carboxílico (11) y el compuesto (54) pueden ser adecuadamente seleccionados de las descritas para la síntesis del compuesto (6).

Desprotegiendo el grupo protector P^{10} para el grupo carboxi, un grupo hidroxi, o grupo amino del compuesto (55) obtenido, el compuesto (2) puede ser producido. En esta desprotección, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar dependiendo del grupo protector.

El compuesto (53) también se puede producir por el siguiente método, por ejemplo.

Desprotegiendo el grupo protector P^{12} para el grupo carboxi del compuesto (49) descrito en el Método de producción 5, el péptido (56) puede ser producido. En esta

desprotección, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar dependiendo del grupo protector.

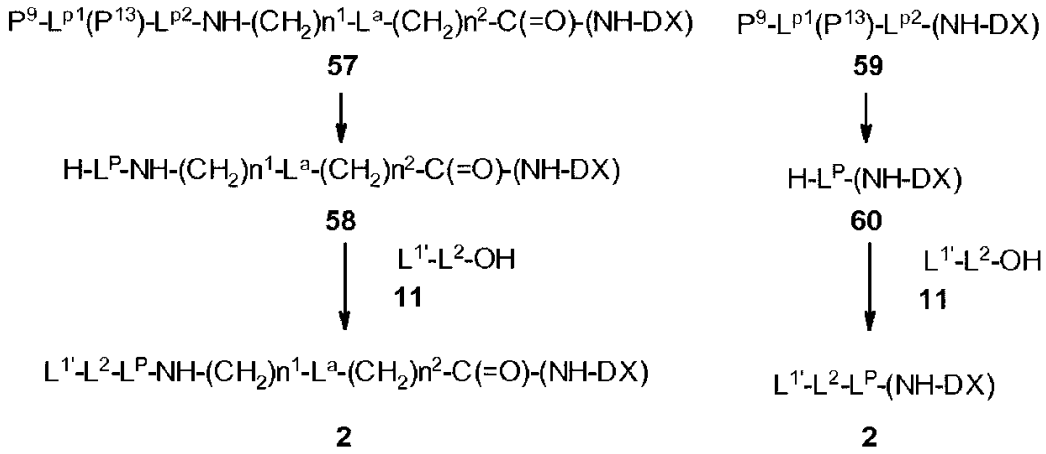
El compuesto (53) se puede producir por derivatización del péptido (56) obtenido en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) o una sal del mismo. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace peptídico entre el compuesto (56) y el compuesto (4) pueden ser adecuadamente seleccionados de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

El compuesto (55) también se puede producir por el siguiente método, por ejemplo.

El compuesto (55) se puede producir por derivatización del compuesto (48) descrito en el Método de producción 5 en éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similar, y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) en presencia de una base, o derivatizando el aminoácido o péptido (45) descrito en el Método de producción 5 en éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similar, y haciéndolo reaccionar con el compuesto (52) en presencia de una base. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de cada enlace peptídico pueden ser adecuadamente seleccionados de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

7. Método de producción 7

Dentro del intermediario de producción representado por la fórmula (2), los que tienen la estructura enlazadora de $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-NH-(CH_2)n^2-C(=O)-$, y dicho L^P es el residuo péptido que tiene un aminoácido hidrófilo en la N-terminal, y el aminoácido hidrófilo situado en la N-terminal es distinto de glicina pueden también ser producidos por el siguiente método.



en la fórmula, $L^{1'}$ corresponde a L^1 que tiene una estructura en la que la terminal se modifica a grupo maleimidilo, L^P representa una estructura que consiste en $-L^{p1}-L^{p2}-$, y P^9 y P^{13} representa un grupo protector.

El intermediario de producción representado por la fórmula (2) incluye los dos modos siguientes, es decir, una estructura en la que el enlazador está representado por $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-NH-(CH_2)n^2-C(=O)-$ y una estructura en la que el enlazador está representado por $-L^1-L^2-L^P-$.

El compuesto (2) con una estructura en la que el

enlazador está representado por $-L^1-L^2-L^P-NH-(CH_2)n^1-L^a-NH-(CH_2)n^2-C(=O)-$ se puede producir como sigue.

El compuesto (57) se puede sintetizar de la misma manera que el compuesto (32) descrito en el Método de producción 5. Sin embargo, a diferencia del compuesto (32), no es necesario que el grupo protector P^9 para el grupo amino y el grupo protector P^{13} para el grupo funcional en la cadena lateral puedan ser eliminados por un método diferente o condiciones diferentes. El grupo funcional en la cadena lateral es un grupo carboxi o un grupo hidroxi y el grupo protector P^9 para el grupo amino y el grupo protector P^{13} para el grupo carboxi o hidroxi en la cadena lateral se pueden desproteger simultáneamente. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P^9 es un grupo terc-butiloxi carbonilo y P^{13} es un grupo terc-butilo o un grupo tritilo, o P^3 es un grupo benciloxi carbonilo y P^{13} es un grupo bencilo. Los grupos protectores pueden ser adecuadamente seleccionados de entre los anteriormente citados con respecto a los grupos protectores para el compuesto (6) en función de, por ejemplo, las propiedades de un grupo amino, un grupo carboxi, o un grupo hidroxi del compuesto a proteger. Para la eliminación de los grupos protectores, reactivos y condiciones se seleccionan dependiendo del grupo protector. Al usar el aminoácido protegido o el péptido para satisfacer las propiedades

anteriores, el compuesto (57) se puede sintetizar de la misma manera que en el Método de producción 5.

Por desprotección secuencial o simultánea del grupo protector P^9 y P^{13} del compuesto (57), el compuesto (51) se puede producir. Los reactivos y condiciones se pueden seleccionar en función del grupo protector.

Un grupo funcional en la cadena lateral hidrófila de L^P en el compuesto (58) no es especialmente protegido, sin embargo, por reacción con el compuesto (11) derivatizado en éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares en presencia de una base, el compuesto (2) puede ser producido. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de cada enlace peptídico pueden ser adecuadamente seleccionados de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

El compuesto (2) con una estructura en la que el enlazador está representado por $-L^1-L^2-L^P-$ se puede producir como sigue.

El compuesto (59) también se puede sintetizar de la misma manera que el compuesto (53) descrito en el Método de producción 6. Sin embargo, a diferencia del compuesto (53), puede que no sea necesario que el grupo protector P^3 para el grupo amino y el grupo protector P^8 para el grupo funcional en la cadena lateral puedan ser eliminados por un método diferente o condiciones diferentes. El grupo funcional en la

cadena lateral es un grupo carboxi o un grupo hidroxi y el grupo protector P^9 para el grupo amino y el grupo protector P^{13} para el grupo carboxi o hidroxi en la cadena lateral se pueden desproteger simultáneamente. Por ejemplo, un ejemplo representativo incluye una combinación en la que P^9 es un grupo terc-butiloxi carbonilo y P^{13} es un grupo terc-butilo o un grupo tritilo, o P^3 es un grupo benciloxi carbonilo y P^{13} es un grupo bencilo. Los grupos protectores pueden ser adecuadamente seleccionados de entre los anteriormente citados con respecto a los grupos protectores para el compuesto (6) en función de, por ejemplo, las propiedades de un grupo amino, un grupo carboxi, o un grupo hidroxi del compuesto a proteger. Para la eliminación de los grupos protectores, los reactivos y condiciones se seleccionan dependiendo del grupo protector. Al usar el aminoácido o péptido protegido que satisfagan las propiedades anteriores, el compuesto (59) se puede sintetizar de la misma manera que en el Método de producción 6.

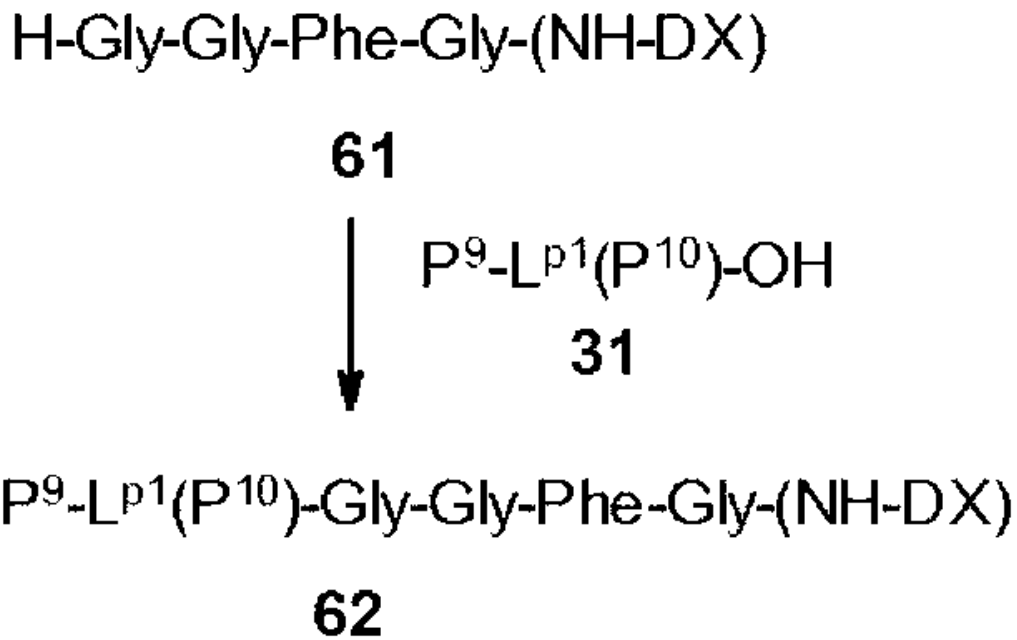
Por desprotección secuencial o simultánea del grupo protector P^9 y P^{13} del compuesto (59), el compuesto (53) se puede producir. Los reactivos y condiciones se pueden seleccionar en función del grupo protector.

Un grupo funcional en la cadena lateral hidrófila de L^P en el compuesto (60) no está particularmente protegido. Sin embargo, mediante la reacción con el compuesto (11)

derivado en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares en presencia de una base, el compuesto (2) puede ser producido. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de cada enlace peptídico pueden ser adecuadamente seleccionados de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

8. Método de producción 8

El compuesto (43) que se muestra en el Método de producción 5 en el que el enlazador -L^P- tiene una estructura de -L^{p1}-Gly-Gly-Phe-Gly también se puede producir por el siguiente método.



en la fórmula, P^9 y P^{10} representan un grupo protector.

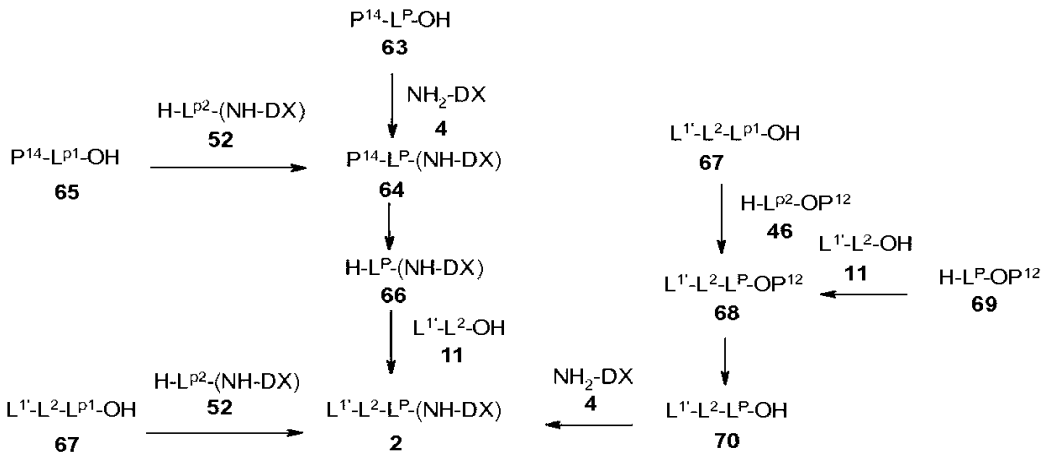
El compuesto (62) se puede producir por derivatización del aminoácido o péptido (31) descrito en el

Método de producción 5 en éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]glicinamida (es decir, la forma libre del compuesto farmacéutico se describe en la Publicación Internacional Nº WO 1997/46260) (61) o una sal del mismo en presencia de una base. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace peptídico entre el aminoácido o péptido (31) y el compuesto (61) pueden ser adecuadamente seleccionadas de las descritas para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P^3 para la N-terminal y el grupo protector P^{10} para el grupo funcional en la cadena lateral son los mismos que los descritos en el Método de producción 5. Mientras tanto, el grupo protector P^{10} para el grupo funcional en la cadena lateral puede no estar presente, y al llevar a cabo la reacción usando el aminoácido o péptido (31) con la N-terminal protegida solamente, se puede obtener el compuesto (62).

9. Método de producción 9

Entre los compuestos representados por la fórmula (2), un compuesto, en el que el enlazador tiene una estructura representada por $-L^1-L^2-L^P-$, y el L^P es el oligopéptido en el que la C-terminal se compone de 2 ó 3 o

más glicinas y está conectado a un fármaco, y la N-terminal del residuo de péptido es glicina en caso de que un aminoácido hidrófilo esté presente en la N-terminal, también puede ser producido de acuerdo con el siguiente método.



en la fórmula, $L^{1'}$ corresponde a L^1 que tiene una estructura en la que la terminal se convierte en grupo maleimidilo, L^P representa una estructura que consiste en L^{p1}-L^{p2}, y P^{12} y P^{14} representa un grupo protector.

Debido a que L^P se forma conectando L^{p1} a L^{p2}, el número de glicinas para constituir la C-terminal de L^P contenido en el mismo puede ser diseñado en consideración del número de glicinas en la C-terminal en L^P y el número de uso repetido del mismo durante la reacción.

El péptido (63) es un oligopéptido en el que la C-terminal se compone de 2 ó 3 o más glicinas, y la N-terminal es glicina en caso de que la N terminal del residuo de péptido sea un aminoácido hidrófilo, y además, esa N-terminal

se protege con P^{14}. Tal como se emplea comúnmente para la síntesis de péptidos, el péptido (63) se puede sintetizar mediante la repetición de forma secuencial de la reacción de condensación del aminoácido o péptido constituyente y la desprotección.

El compuesto (64) se puede producir al derivatizar el péptido (63) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) o una sal del mismo. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace peptídico entre el péptido (63) y el compuesto (4) pueden seleccionarse adecuadamente a partir de las descritas para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P^{14} puede ser adecuadamente seleccionado y usado de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

El compuesto (64) puede ser también producido por derivatización del aminoácido o péptido (65) con la N-terminal protegida con P^{14} en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (52) descrito en el Método de Producción 6. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace peptídico entre los aminoácidos o péptido (65) y el compuesto (52) pueden ser adecuadamente seleccionadas de las descritas para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P^{14} puede ser

adecuadamente seleccionado y usado de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

Desprotegiendo el grupo protector P^{14} para el grupo amino del compuesto (64) obtenido, el compuesto (66) se puede producir. Los reactivos y condiciones se pueden seleccionar en función del grupo protector.

El compuesto (2) puede ser producido por derivatización del derivado de ácido carboxílico (11) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (66) obtenido. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace de amida entre el derivado de ácido carboxílico (11) y el compuesto (66) pueden ser adecuadamente seleccionados de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

El compuesto (2) también se puede producir por el método siguiente.

En el compuesto (67), del que la glicina en la N-terminal de L^{p1} está conectada a L^2, y puede ser producido de la misma manera que el compuesto (45) descrito en el Método de producción 5. El compuesto (68) puede ser producido al derivatizar el aminoácido o péptido (46) descrito en el Método de producción 5 en éster activo, anhídrido de ácido mixto, haluro de ácido, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (67). En este documento, el aminoácido o

péptido (46) es un oligopéptido que consiste en glicina o tiene la C-terminal que consta de 2 ó 3 o más glicinas, en donde la C-terminal está protegida con P^{12}. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace de amida entre el aminoácido o péptido (46) y el compuesto (67) pueden ser adecuadamente seleccionados de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

El compuesto (68) puede ser también producido por derivatización del compuesto (11) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similar, y haciéndolo reaccionar con el péptido (69) que tiene la C-terminal protegida con P^{12}. En este documento, el péptido (69) es un oligopéptido en el que la C-terminal se compone de 2 ó 3 o más glicinas y la N-terminal es glicina en caso de que la N terminal de ese residuo de péptido sea un aminoácido hidrófilo. Tal como se emplea comúnmente para la síntesis de péptidos, el péptido (69) se puede producir mediante la repetición de forma secuencial de la reacción de condensación del aminoácido o péptido constituyente y la desprotección. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace peptídico entre el péptido (69) y el compuesto (11) pueden ser adecuadamente seleccionados de los descritos para la síntesis del compuesto (6). El grupo protector P^{12} es preferiblemente un grupo protector que puede

desprotegerse bajo condiciones ácidas pero no se limita a esto, y puede ser adecuadamente seleccionado y usado de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

Desprotegiendo el grupo protector P^{12} para el grupo carboxi del compuesto (68) obtenido, el compuesto (70) se puede producir. En esta desprotección, los reactivos y condiciones se pueden seleccionar dependiendo del grupo protector.

El compuesto (2) puede ser producido por derivatización del compuesto (70) en un éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (4) o una sal del mismo. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace peptídico entre el compuesto (70) y el compuesto (4) pueden ser adecuadamente seleccionadas de las descritos para la síntesis del compuesto (6).

Además de lo anterior, el compuesto (2) también se puede producir de acuerdo con el siguiente método.

El compuesto (2) puede ser producido por derivatización del compuesto (52) descrito en el Método de producción 6 en éster activo, anhídrido de ácido mixto, o similares y haciéndolo reaccionar con el compuesto (67) en presencia de una base. Las condiciones de reacción, los reactivos, base, y solvente usados para la formación de un enlace peptídico entre el compuesto (67) y el compuesto (52)

pueden ser adecuadamente seleccionados de los descritos para la síntesis del compuesto (6).

Mientras tanto, también es posible que todos los compuestos intermediarios de Método de producción 1 a 9 Método de producción pueden estar presentes como en forma de sal y/o hidrato.

El conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención puede absorber la humedad para tener agua de adsorción, por ejemplo, o convertirse en un hidrato cuando se deje en el aire o se someta a procedimientos de purificación tales como recristalización. Tal compuesto o una sal que contiene agua también se incluyen en la presente invención.

Un compuesto marcado con diferentes isótopos radiactivos o no radiactivos también se incluye en la presente invención. Uno o más átomos que constituyen el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención pueden contener un isótopo atómico en relación no natural. Ejemplos del isótopo atómico pueden incluir deuterio (^{2}H), tritio (^{3}H), yodo-125 (^{125}I) y carbono 14 (^{14}C). Además, el compuesto de la presente invención puede ser marcado en forma radiactivs con un isótopo radiactivo tal como tritio (^{3}H), yodo-125 (^{125}I), carbono-14 (^{14}C), cobre-64 (^{64}Cu), zirconio-89 (^{89}Zr), yodo-124 (^{124}I), flúor-18 (^{18}F), indio-111 (^{111}I), carbono-11 (^{11}C) o yodo-131 (^{131}I). El compuesto marcado con un isótopo radiactivo es útil como un agente terapéutico o profiláctico,

un reactivo para la investigación, tal como un reactivo de ensayo y un agente para diagnóstico tal como un agente de diagnóstico por imagen *in vivo*. Sin ser relacionada a la radiactividad, cualquier tipo de variante de isótopos del conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención está dentro del alcance de la presente invención.

Productos farmacéuticos/medicamentos

El conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención exhibe una actividad citotóxica contra las células cancerosas, y por lo tanto, como un medicamento, que puede ser usado en particular como un agente terapéutico y/o agente profiláctico para el cáncer.

Específicamente, el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención se puede usar selectivamente como un medicamento para la quimioterapia, que es un método importante para el tratamiento de cáncer, y como resultado, puede retrasar el desarrollo de las células cancerosas, inhibir el crecimiento de las mismas, y destruir aún más las células cancerosas. Esto puede permitir a los pacientes con cáncer estar libres de síntomas causados por el cáncer o lograr una mejora en la calidad de vida de pacientes con cáncer y logra un efecto terapéutico al preservar la vida de los pacientes con cáncer. Incluso si el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención no llega a destruir las células cancerosas, se puede lograr una mayor

calidad de vida de pacientes con cáncer, mientras se logra la supervivencia a largo plazo, mediante la inhibición o control del crecimiento de las células cancerosas.

El conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención se puede usar como una medicina sola en tal terapia medicinal. Además, el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención se puede usar como un medicamento en combinación con una terapia adicional en la terapia adyuvante y se puede combinar con la operación quirúrgica, radioterapia, terapia hormonal, o similares. Además, el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención también se puede usar como un medicamento para terapia con medicamentos en terapia neoadyuvante.

Además del uso terapéutico como el descrito anteriormente, también se puede esperar el efecto de suprimir el crecimiento de pequeñas células de cáncer metastásico y destruirlas más. En particular, cuando la expresión de HER3 se confirma en las células de cáncer primario, se puede esperar la inhibición de la metástasis del cáncer o un efecto profiláctico mediante la administración del conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención. Por ejemplo, se puede esperar el efecto de inhibición y destrucción de las células cancerosas en un fluido corporal en el curso de la metástasis o el efecto de, por ejemplo, la inhibición y la destrucción de células de cáncer diminutas

inmediatamente después de la implantación en cualquier tejido. En consecuencia, la inhibición de la metástasis del cáncer o un efecto profiláctico se puede esperar, en particular, después de la extirpación quirúrgica del cáncer.

Se puede esperar que el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención produzca un efecto terapéutico mediante la administración como terapia sistémica a los pacientes, así como por administración local a los tejidos de cáncer.

El conjugado anticuerpo-fármaco (1) tuvo una excelente actividad antitumoral, seguridad, y propiedades físicas y exhibió efectos contra cáncer de mama, contra cáncer de pulmón, y contra melanoma *in vitro*.

El conjugado anticuerpo-fármaco (2) tuvo una excelente actividad antitumoral, seguridad, y propiedades físicas y exhibió efectos contra cáncer de mama, contra cáncer de pulmón, contra cáncer colorrectal, y contra melanoma *in vitro* y efectos más fuertes contra cáncer de mama y contra melanoma *in vivo* que los de U1-59.

El conjugado anticuerpo-fármaco (3) tuvo una excelente actividad antitumoral, seguridad, y propiedades físicas y exhibió efectos contra cáncer de mama, contra cáncer de pulmón, contra cáncer ováruico, contra cáncer colorrectal, y contra melanoma *in vitro*, y efectos más fuertes contra cáncer de mama, contra cáncer pulmón, y

efectos más fuertes contra cáncer de mama y contra melanoma *in vivo* que los de estómago y contra melanoma *in vivo* que los de U1-59.

El conjugado anticuerpo-fármaco (4) tuvo una excelente actividad antitumoral, seguridad, y propiedades físicas y exhibió un efecto contra cáncer de mama *in vitro*.

El conjugado anticuerpo-fármaco (5) tuvo una excelente actividad antitumoral, seguridad, y propiedades físicas y exhibió efectos contra cáncer de mama, contra cáncer de pulmón y contra melanoma *in vitro.*

El conjugado anticuerpo-fármaco (6) tuvo una excelente actividad antitumoral, seguridad, y propiedades físicas y exhibió efectos contra cáncer de mama, contra cáncer de pulmón y contra melanoma *in vitro,* y un efecto más fuerte contra el cáncer de mama *in vivo* que el de U1-59.

El conjugado anticuerpo-fármaco (7) tuvo una excelente actividad antitumoral, seguridad, y propiedades físicas y exhibió efectos contra cáncer de mama, contra cáncer de pulmón y contra melanoma *in vitro.*

El conjugado anticuerpo-fármaco (8) tuvo una excelente actividad antitumoral, seguridad, y propiedades físicas y exhibió efectos contra cáncer de mama, contra cáncer de pulmón y contra melanoma *in vitro,* y un efecto más fuerte contra el cáncer de mama *in vivo* que el de U1-59.

El conjugado anticuerpo-fármaco (9) tuvo una

excelente actividad antitumoral, seguridad, y propiedades físicas y exhibió efectos contra cáncer de mama, contra cáncer de pulmón, contra cáncer de ovario, contra cáncer colorrectal y contra melanoma *in vitro.*

El conjugado anticuerpo-fármaco (10) tuvo una excelente actividad antitumoral, seguridad, y propiedades físicas y exhibió efectos contra cáncer de mama, contra cáncer de pulmón, contra cáncer colorrectal y contra melanoma *in vitro,* y un efecto más fuerte contra el cáncer de mama, contra cáncer pulmón, contra cáncer colorrectal, contra cáncer de estómago y contra melanoma *in vivo* que los de U1-59.

El conjugado anticuerpo-fármaco (11) tuvo una excelente actividad antitumoral, seguridad, y propiedades físicas y exhibió un efecto contra cáncer de mama *in vitro*.

El conjugado anticuerpo-fármaco (12) tuvo una excelente actividad antitumoral, seguridad, y propiedades físicas y exhibió efectos contra cáncer de mama, contra cáncer de pulmón, contra cáncer de ovario, contra cáncer colorrectal y contra melanoma *in vitro.*

El conjugado anticuerpo-fármaco (13) tuvo una excelente actividad antitumoral, seguridad, y propiedades físicas y exhibió efectos contra cáncer de mama, contra cáncer de pulmón, contra cáncer colorrectal y contra melanoma *in vitro,* y un efecto más fuerte contra el cáncer de mama

(incluyendo cáncer de mama triple negativo), contra cáncer pulmón, contra cáncer de estómago, contra cáncer de páncreas y contra melanoma *in vivo* que los de U1-59.

El conjugado anticuerpo-fármaco (14) tuvo una excelente actividad antitumoral, seguridad, y propiedades físicas y exhibió un efecto contra cáncer de mama *in vitro*.

El conjugado anticuerpo-fármaco (16a) tuvo una excelente actividad antitumoral, seguridad, y propiedades físicas y exhibió efectos contra cáncer de mama (incluyendo luminal y triple negativo), contra melanoma, contra cáncer de ovario, contra cáncer de vejiga, contra cáncer pulmón, contra cáncer de cabeza y cuello y contra cáncer gástrico *in vitro,* cuando se administró solo o en combinación con trastuzumab, gefinitib, cetuximab, panitumumab o pertuzumab.

Ejemplos del tipo de cáncer a los que se aplica el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención incluyen cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de mama metastásico, cáncer de mama luminal, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico (estómago), tumor estromal gastrointestinal, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer epidermoide, cáncer peritoneal, glioblastoma multiforme del adulto, cáncer hepático,

carcinoma hepatocelular, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de colon y rectal, cáncer endometrial, cáncer de útero, cáncer salival, cáncer renal, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma de ano, cáncer de pene. La quimioterapia es el único tratamiento actual indicado para el cáncer de mama particularmente triple negativo (que carece de la expresión de HER2, estrógeno y receptores de progesterona) entre los cánceres de mama, que se dice que tiene un mal pronóstico. No ha habido casi ningún informe de expresión de HER3 en cáncer de mama triple negativo. Sin embargo, si se observa la expresión de HER3 en los pacientes con cáncer de mama triple negativo, entonces el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención se puede usar como agente terapéutico y/o agente preventivo. Sin embargo, no se limita a ellos con tal de que sea una célula de cáncer que exprese, en una célula de cáncer como un sujeto de tratamiento, una proteína que el anticuerpo del conjugado anticuerpo-fármaco pueda reconocer.

El tratamiento con el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención pueden dirigirse a una célula de cáncer que exprese, en una célula de cáncer como un sujeto de tratamiento, la proteína HER3 que el anticuerpo del conjugado anticuerpo-fármaco pueda reconocer. En la presente memoria, el "cáncer que expresa la proteína HER3" es cáncer que comprende células que tienen proteína HER3 en su

superficie o cáncer que secreta proteína HER3 en sangre. La proteína HER3 se sobreexpresa en diversos tumores humanos y se puede evaluar usando un método por lo general llevado a cabo, tal como el método de tinción inmunohistoquímica (IHC) para la evaluación de la sobreexpresión de la proteína de HER3 en muestras de tumor (primario, metastásico), método de hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) para la evaluación de la amplificación del gen de HER3, o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la evaluación de la sobreexpresión de la proteína HER3 en muestras de sangre.

El conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención muestra un efecto antitumoral mediante el reconocimiento y la mayor internalización de la proteína HER3 expresada en la superficie de células de cáncer. Por lo tanto, el sujeto de tratamiento del conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención no se limita al "cáncer que expresa proteína HER3" y también puede ser, por ejemplo, leucemia, linfoma maligno, plasmocitoma, mieloma, o sarcoma.

El conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención se puede administrar preferiblemente a un mamífero, pero se administra más preferiblemente a un humano.

Las sustancias usadas en una composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo anti-HER3-

fármaco de la presente invención pueden ser adecuadamente seleccionadas y aplicadas de aditivos de formulación o similares que se usan generalmente en la técnica, en vista de la dosis o la concentración de administración.

El conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención se puede administrar como una composición farmacéutica que comprenda al menos un ingrediente farmacéuticamente compatible. Por ejemplo, la composición farmacéutica comprende típicamente al menos un portador farmacéutico (por ejemplo, líquido esterilizado). Como se describe en el presente documento, ejemplos del líquido incluyen agua y aceite (aceite de petróleo y aceite de origen animal, origen vegetal o sintético). El aceite puede ser, por ejemplo, aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral, aceite de ajonjolí o similares. El agua es un portador más típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Solución salina, una solución de dextrosa acuosa, y una solución acuosa de glicerol también se pueden usar como un portador líquido, en particular, para una solución de inyección. Un portador farmacéutico adecuado se puede seleccionar apropiadamente a partir de los conocidos en la técnica. Si se desea, la composición también puede comprender una cantidad traza de un agente humectante, un agente emulsionante o un agente de amortiguador. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados

se describen en "Remington Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Las formulaciones se corresponden con un modo de administración.

Varios sistemas de entrega se conocen y se pueden usar para la administración del conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención. Ejemplos de la ruta de administración pueden incluir intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea, pero no limitada a las mismas. La administración se puede hacer por inyección o inyección en bolo, por ejemplo. De acuerdo con una modalidada específica preferida, la administración del conjugado ligando-fármaco se lleva a cabo mediante inyección. La administración parenteral es una vía de administración preferida.

De acuerdo con una modalidad representativa, la composición farmacéutica se prescribe, como una composición farmacéutica adecuada para administración intravenosa a humanos, de acuerdo con los procedimientos convencionales. La composición para administración intravenosa típicamente es una solución en una solución amortiguadora acuosa estéril e isotónica. Si es necesario, el medicamento puede contener un agente solubilizante y anestésicos locales para aliviar el dolor en el área de inyección (por ejemplo, lidocaína). Generalmente, el ingrediente se proporciona individualmente como cualquiera de polvo liofilizado o un concentrado anhidro

contenido en un contenedor que se obtiene mediante el sellado en una ampolla o un sobre que tiene una cantidad del agente activo o como una mezcla en una forma de dosificación unitaria. Cuando el producto farmacéutico está en forma para ser administrado por inyección, se puede administrar de una botella de inyección que contenga agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando la preparación farmacéutica se administre por inyección, una ampolla de agua estéril o solución salina para inyección puede proporcionarse de tal manera que los ingredientes anteriormente mencionados se mezclen entre sí antes de la administración.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender sólo el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente solicitud como un ingrediente activo o puede comprender el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y al menos un medicamento (por ejemplo, agente de tratamiento de cáncer) que no sea el conjugado. El conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención se puede administrar con otro agente de tratamiento de cáncer, y el efecto anticáncer se puede mejorar en consecuencia. Por ejemplo, otro medicamento tal como un agente anticáncer que se use para tal fin se puede administrar antes de la administración de la composición farmacéutica que comprenda el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención como un ingrediente activo o después de la

administración de la composición farmacéutica que comprenda el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco como ingrediente activo, o se puede administrar simultáneamente con, por separado (individualmente) a partir de, o posteriormente al conjugado anticuerpo-fármaco, y se puede administrar mientras se varía el intervalo de administración para cada uno. En la presente invención, el caso en el que el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención se administra simultáneamente con otro medicamento como una sola formulación que contiene el conjugado anticuerpo-fármaco y la medicina y el caso en el que el anti-HER3 anticuerpo-fármaco conjugado de la presente invención y otro medicamento se administra simultánea o posteriormente como formulaciones separadas o se administran mientras se varía el intervalo de administración para cada uno están ambos incluidos en el alcance de la "composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco y otro medicamento". Ejemplos del agente de tratamiento de cáncer incluyen 5-FU, trastuzumab, trastuzumabb emtansina (T-DM1), cetuximab, gefitinib, panitumumab, pertuzumab, Abraxano, erlotinib, carboplatino, cisplatino, gemcitabina, capecitabina, irinotecano (CPT-11), paclitaxel, docetaxel, pemetrexed, sorafenib, vinblastina, vinorelbina, vemurafenib, los medicamentos descritos en la publicación Internacional Nº WO 2003/038043, análogos de LH-RH (leuprorelina, goserelina, o

similares), fosfato de estramustina, antagonista de estrógenos (tamoxifeno, raloxifeno, o similares), y un inhibidor de aromatasa (anastrozol, letrozol, exemestano, o similares), pero no está limitado con tal de que sea un medicamento que tenga una actividad antitumoral. Estos agentes de tratamiento de cáncer pueden clasificarse, en función de sus objetivos, en: agentes anti-FGER tales como cetuximab, gefitinib, y panitumumab; agentes anti-HER2 tales como trastuzumab, T-DM1 y pertuzumab; agentes anti-HER3 tales como patritumab, MM-121 y MM-111; agentes anti-VEGF tales como infliximab y adalimumab; etc. Además, se pueden clasificar en: anticuerpos anti-EGFR, tales como cetuximab y panitumumab; anticuerpos anti-HER2 tales como trastuzumab y pertuzumab; anticuerpos anti-HER3 tales como patritumab, MM-121 y MM-111; anticuerpos anti-VEGF tales como infliximab y adalimumab; etc. El conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención ejerce un excelente efecto terapéutico cuando se administra en combinación con un agente anti-HER2 o un anticuerpo anti-HER2 en i) el tratamiento de cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, o similares, o cuando se administra en combinación con un agente anti-EGFR o un anticuerpo anti-EGFR en ii) el tratamiento de cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, o similares. Uno o dos o más medicamentos que no

sean el conjugado se pueden usar, y estos medicamentos pueden ser agentes anticáncer o pueden ser medicamentos para aliviar los efectos secundarios causados por los medicamentos de compañía.

En la presente invención, la "composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y otro medicamento" tiene el mismo significado que una "composición farmacéutica en la que el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco se va a administrar en combinación con otro medicamento". En la presente invención, la frase "administrado en combinación" que se usa para el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y otro medicamento significa que el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y otro medicamento se incorporan en el cuerpo de un recipiente dentro de un cierto período. Una formulación única que contiene el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y otro medicamento se puede administrar, o el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y otro medicamento pueden ser formulados por separado y administrados como formulaciones separadas. En el caso de las formulaciones separadas, los tiempos de administración de las mismas no están particularmente limitados, y las formulaciones se pueden administrar al mismo tiempo o se pueden administrar en diferentes momentos o en diferentes días de una manera escalonada. En el caso en el que el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y otro

medicamento se administran por separado en diferentes momentos o en diferentes días, el orden de administración de los mismos no está particularmente limitado. Ya que formulaciones separadas se administran por lo general de acuerdo con sus respectivos métodos de administración, la frecuencia de la misma administración puede ser la mismo o puede ser diferente. Además, tales formulaciones separadas pueden administrarse por el mismo método de administración (vía de administración), o diferentes métodos de administración (vías de administración). No es necesario que el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y otro medicamento existan en el cuerpo al mismo tiempo, y es suficiente que el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y otro medicamento se incorporen en el cuerpo dentro de un cierto período (por ejemplo, 1 mes, preferiblemente 1 semana, más preferiblemente varios días, incluso más preferiblemente 1 día). Alternativamente, cuando se administra uno de los ingredientes activos, el otro ingrediente activo puede ya haber desaparecido del cuerpo.

Ejemplos de la forma de dosificación de la "composición farmacéutica en la que el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco se va a administrar en combinación con otro medicamento" pueden incluir: 1) la administración de una única formulación que comprenda el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y otro medicamento, 2) la administración

simultánea a través de la misma vía de administración de dos formulaciones obtenidas mediante la formulación por separado del conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y otro medicamento, 3) la administración de una manera escalonada a través de la misma vía de administración de dos formulaciones obtenidas formulando por separado el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y otro medicamento, 4) la administración simultánea a través de diferentes vías de administración de dos formulaciones obtenidas mediante la formulación por separado del conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y otro medicamento, y 5) la administración en una de forma escalonada a través de diferentes vías de administración de dos formulaciones obtenidas mediante la formulación por separado del conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y otro medicamento. La dosis, el intervalo de dosificación, la forma farmacéutica, la formulación, etc., de la "composición farmacéutica en la que el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco se va a administrar en combinación con otro medicamento" cumplen con las de la composición farmacéutica que contiene el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención, pero no se limita a las mismas.

Tal composición farmacéutica formulada en dos formulaciones diferentes puede estar en forma de un kit que las contenga.

En la presente invención, la "combinación" del

conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y otro medicamento significa que el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco y la medicina se "administran en combinación".

La composición farmacéutica se puede formular en una formulación de liofilización o una formulación líquida como una formulación que tenga la composición deseada y la pureza necesaria. Cuando se formule como una formulación de liofilización, puede ser una formulación que contenga aditivos de formulación adecuados que se usen en la técnica. También para una formulación líquida, se puede formular como una formulación líquida que contenga diversos aditivos de formulación que se usen en la técnica.

Los constituyentes y la concentración de la composición farmacéutica pueden variar dependiendo del método de administración. Sin embargo, el conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención puede presentar el efecto farmacéutico, incluso a una dosis pequeña cuando el conjugado anticuerpo-fármaco tenga mayor afinidad por un antígeno, es decir, mayor afinidad (= menor valor Kd) en términos de la constante de disociación (es decir, el valor Kd) para el antígeno. Por lo tanto, para la determinación de

la dosis del conjugado anticuerpo-fármaco, la dosis se puede determinar en vista de una situación relativa a la afinidad entre el conjugado anticuerpo-fármaco y el antígeno. Cuando el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención se administre a un ser humano, por ejemplo, aproximadamente 0.001 a 100 mg/kg se pueden administrar una vez o se administran varias veces con un intervalo de un tiempo de 1 a 180 días.

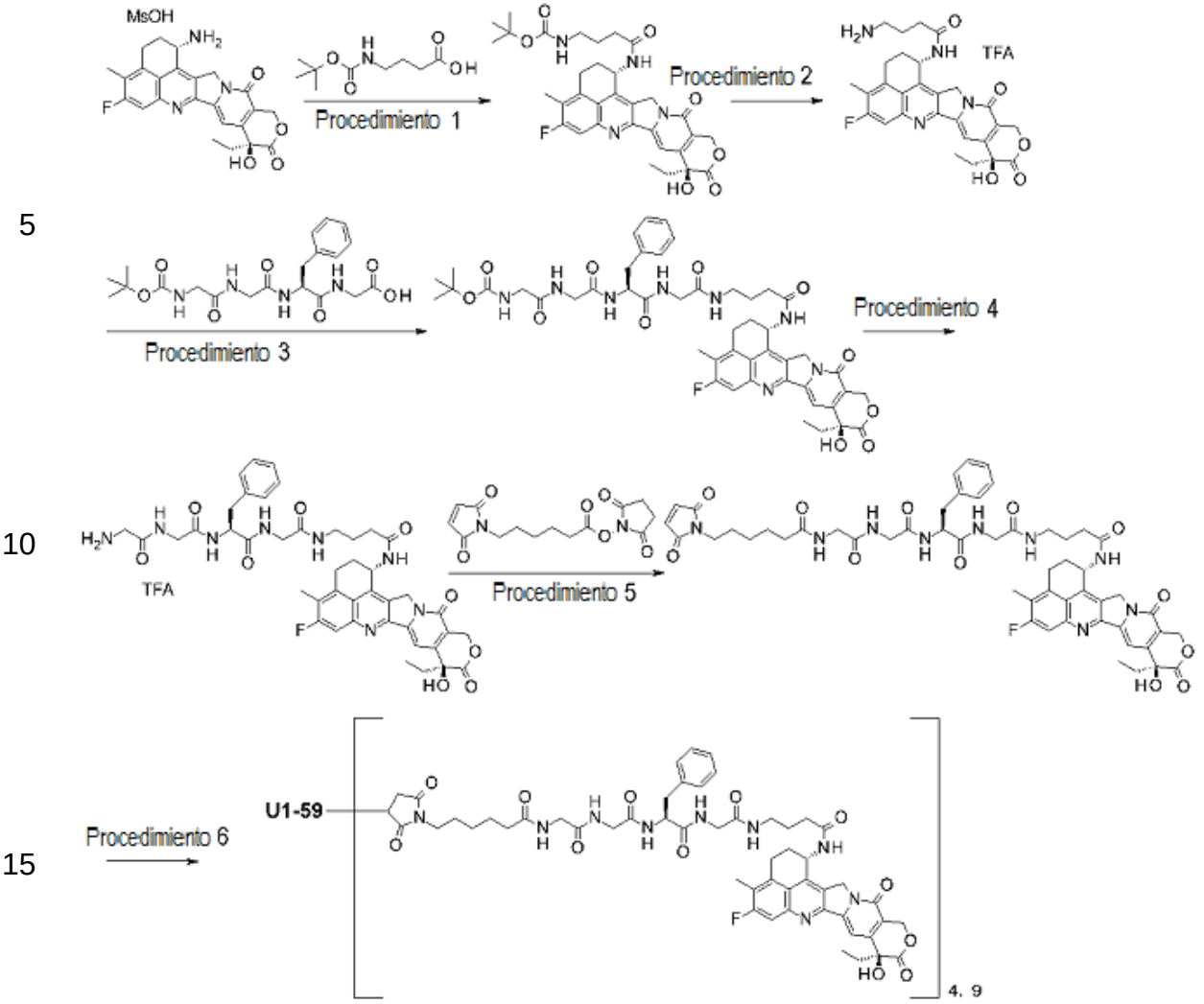
Ejemplos

La presente invención se describe específicamente en vista de los ejemplos que se muestran a continuación. Sin embargo, la presente invención no se limita a ellos. Además, de ninguna manera son interpretados en un sentido limitado. Además, a menos que se describa específicamente de otro modo, el reactivo, solvente y material de partida descritos en la descripción se pueden obtener fácilmente de un proveedor comercial.

Ejemplo de Referencia 1 Producción de U1-59

U1-59 fue producida sobre la base del método descrito en la Publicación Internacional Nº WO 2007/077028.

Ejemplo 1 conjugado anticuerpo-fármaco (1)



Procedimiento 1: (4-{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-4-oxobutil)carbamato de terc-butilo

Ácido 4-(terc-butoxicarbonilamino) butanoico (0.237 g, 1,.3 mmol) se disolvió en diclorometano (10 mL), cargado con N-hidroxisuccinimida (0.130 g, 1,13 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0.216 g, 1,13

mmol), y se agitó durante 1 hora. La solución de reacción se añadió gota a gota a una solución de N-dimetilformamida N (10 mL) cargada con mesilato de exatecano (0.500 g, 0.94 mmol) y trietilamina (0.157 mL, 1.13 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 1 día. El solvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 8: 2 (v/v)] para producir el compuesto del título (0.595 g, cuantitativo).

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) delta: 0.87 (3H, t, J=7.2 Hz), 1.31 (9H, s), 1.58 (1H, t, J=7.2 Hz), 1.66 (2H, t, J=7.2 Hz), 1.89-1.82 (2H, m), 2.12 a 2.21 (3H, m), 2.39 (3H, s), 2.92 (2H, t, J=6.5 Hz), 3.17 (2H, s), 5.16 (1H, d, J=19.2 Hz), 5.24 (1H, d. J=18.8 Hz), 5.42 (2H, s), 5.59-5.55 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.78 (1H, t, J=6.3 Hz), 7.30 (1H, s), 7.79 (1H, d, J=11.0 Hz), 8.40 (1H, d, J=8.6 Hz),

MS (APCI) m/z: 621 $(M+H)^+$.

Procedimiento 2: trifluoroacetato de 4-amino-N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]butanamida

El compuesto (0.388 g, 0.61 mmol) obtenido en el Procedimiento 1 anterior se disolvió en diclorometano (9 mL). Después de la adición de ácido trifluoroacético (9 mL), se

agitó durante 4 horas. El solvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - repartió capa orgánica de cloroformo: metanol: agua = 7: 3: 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título (0.343 g, cuantitativo).

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) 0.87 (3H, t, J=7.2 Hz), 1.79-1.92 (4H, m), 2.10 a 2.17 (2H, m), 2.27 (2H, t, J=7.0 Hz), 2.40 (3H, s), 2.80-2.86 (2H, m), 3.15 a 3.20 (2H, m), 5.15 (1H, d, J=18.8 Hz), 5.26 (1H, d, J=18.8 Hz), 5.42 (2H, s), 5.54-5.61 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.32 (1H, s), 7.72 (3H, s ancho), 7.82 (1H, d, J=11.0 Hz), 8.54 (1H, d, J=8.6 Hz),

MS (APCI) m/z: 521 $(M+H)^+$.

Procedimiento 3: N-(terc-butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-4-oxobutil)glicinamida

N-(terc-butoxicarbonil)glicilglicil-L-fenilalanilglicina (0.081 g, 0.19 mmol) se disolvió en diclorometano (3 mL), se cargó con N-hidroxisuccinimida (0.021 g, 0.19 mmol) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0.036 g, 0.19 mmol) y se agitó durante 3,5 horas. La solución de reacción se añadió gota a gota a una solución de N,N-dimetilformamida (1.5 mL)

cargada con el compuesto (0.080 g, 0.15 mmol) que se ha obtenido en el Procedimiento 2 anterior y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El solvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 8: 2 (v/v)] para producir el compuesto del título (0.106 g, 73%).

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) delta: 0.87 (3H, t, J=7.4 Hz), 1.36 (9H, s), 1.71 (2H, m), 1.86 (2H, t, J=7.8 Hz), 2.15 a 2.19 (4H, m), 2.40 (3H, s), 2.77 (1H, dd, J=12.7. 8.8 Hz), 3.02 (1H, dd, J=14.1. 4.7 Hz), 03/08 a 03/11 (2H, m), 3.16 a 3.19 (2H, m), 3.54 (2H, d, J=5.9 Hz), 3.57-3.77 (4H, m), 4.46-4.48 (1H, m), 5.16 (1H, d, J=19.2 Hz), 5.25 (1H, d, J=18.8 Hz), 5.42 (2H, s), 5.55-5.60 (1H, m), 6.53 (1H, s), 7.00 (1H, t, J=6.3 Hz), 7.17 a 7.26 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.71 (1H, t, J=5.7 Hz), 7.80 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.92 (1H, t, J=5.7 Hz), 8.15 (1H, d, J=8.2 Hz), 8.27 (1H, t, J=5.5 Hz), 8.46 (1H, d, J=8.2 Hz),

MS (APCI) m/z: 939 $(M+H)^+$.

Procedimiento 4: trifluoroacetato de glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-4-oxobutil)glicinamida

El compuesto (1.97 g, 2.10 mmol) obtenido en el

Procedimiento 3 anterior se disolvió en diclorometano (7 mL). Después de la adición de ácido trifluoroacético (7 mL), se agitó durante 1 hora. El solvente se eliminó a presión reducida, y se cargó con tolueno para la destilación azeotrópica. Los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - repartió capa orgánica de cloroformo: metanol: agua = 7: 3: 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título (1.97 g, 99%).

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) delta: 0.87 (3H, t, J=7.4 Hz), 1.71-1.73 (2H, m), 1.82-1.90 (2H, m), 2.12-2.20 (4H, m). 2.40 (3H, s). 2.75 (1H, dd, J=13.7. 9.4 Hz), 3.3 a 3.9 (3H, m), 3.18-3.19 (2H, m), 3.58-3.60 (2H, m), 3.64 (1H, d, J=5.9 Hz), 3.69 (1H, d, J=5.9 Hz), 3.72 (1H, d, J=5.5 Hz), 3.87 (1H, dd, J=16.8. 5.9 Hz), 4.50-4.56 (1H, m), 5.16 (1H, d, J=19.2 Hz), 5.25 (1H, d, J=18.8 Hz), 5.42 (2H, s). 5.55-5.60 (1H, m), 7.17-7.27 (5H, m), 7.32 (1H, s). 7.78-7.81 (2H, m), 7.95-7.97 (3H, m), 8.33-8.35 (2H, m), 8.48-8.51 (2H, m).

MS (APCI) m/z: 839 $(M+H)^{+}$.

Procedimiento 5: N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-4-oxobutil)glicinamida

A una solución en N,N-dimetilformamida (1.2 mL) del

compuesto (337 mg, 0.353 mmol) obtenido en el Procedimiento 4 anterior, se le añadieron trietilamina (44.3 mL, 0.318 mmol) y hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida (119.7 mg, 0.388 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El solvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 5: 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (278.0 mg, 76%).

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) delta: 0.87 (3H, t, J=7.3 Hz), 1.12-1.22 (2H, m), 1.40-1.51 (4H, m), 1.66-1.76 (2H, m), 1.80-1.91 (2H, m), 2.5-2.21 (6H, m), 2.39 (3H, s), 2.79 (1H, dd, J=14.0, 9.8 Hz), 2.98-3.21 (5H, m), 3.55-3.77 (8H, m), 4.41-4.48 (1H, m), 5.15 (1H, d, J=18.9 Hz), 5.24 (1H, d, J=18.9 Hz), 5.40 (1H, d, J=17.1 Hz), 5.44 (1H, d, J=17.1 Hz), 5.54-5.60 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.99 (2H, s), 7.20-7.27 (5H, m), 7.30 (1H, s), 7.70 (1H, t, J=5.5 Hz), 7.80 (1H, d, J=11.0 Hz), 8.03 (1H, t, J=5.8 Hz), 8.08 (1H, t, J=5.5 Hz), 8.14 (1H, d, J=7.9 Hz), 8.25 (1H, t, J=6.1 Hz), 8.46 (1H, d, J=8.5 Hz).

MS (APCI) m/z: 1032 $(M+H)^{+}$.

Procedimiento 6: conjugado anticuerpo-fármaco (1)

Reducir el anticuerpo: U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 fue preparado para tener la concentración de anticuerpo de 10 mg/mL mediante la sustitución del medio con PBS6.0/EDTA usando el Procedimiento

común B y Procedimiento común C descritos en el Método de Producción 1. La solución (1.00 mL) se añadió a un tubo de polipropileno de 2.0 mL y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0.0307 mL; 4.6 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa 1 M de fosfato ácido dipotásico (Nacalai Tesque, Inc.; 0.050 mL). Después de confirmar que la solución tenía un pH de 7.4 +/- 0.1, el enlace disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo se redujo por incubación a 37ºC durante 1 hora.

Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Después de incubar la solución en un baño de agua a 22ºC durante 10 minutos, sulfóxido de dimetilo (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0.0586 mL) y una solución de sulfóxido de dimetilo (0.0615 mL; 9.2 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contiene se añadieron 10 mM del compuesto obtenido en el Procedimiento 5 se añadieron a la misma y se incubó en un baño de agua a 22ºC durante 40 minutos para conjugar el enlazador fármaco al anticuerpo. A continuación, se añadió una solución acuosa (0.0123 mL) de 100 mM de NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) y se agitó mediante el uso de un rotador de tubo (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 20 minutos para terminar reacción del enlazador de fármaco.

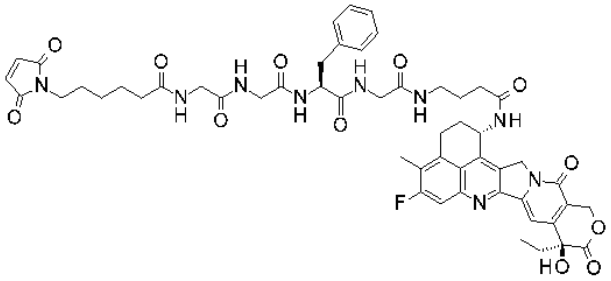
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el Procedimiento común D (ABS se usa como

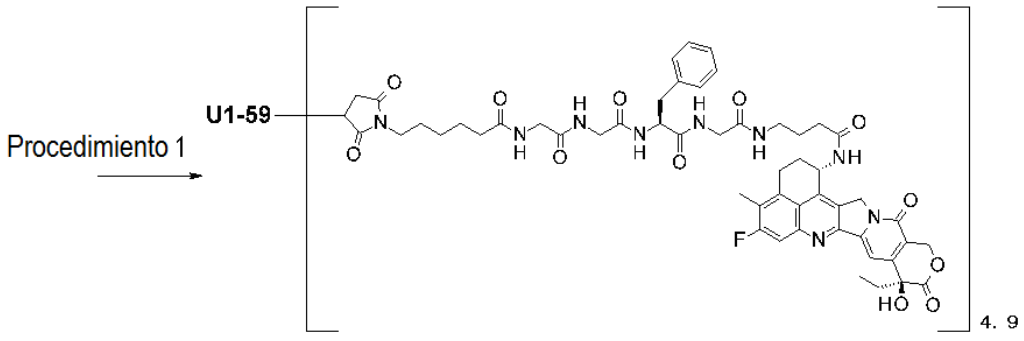
solución amortiguadora) descrito en el Método de producción 1 para dar 6 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo titulado-fármaco.

Caracterización físico-química: Mediante el uso del Procedimiento común E que se describe en el Método de producción 1 (como coeficiente molar de absorción del enlazador de fármaco, se usaron $E_{D,\ 280}$ = 7280 y $E_{D,\ 370}$ = 23400), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1.29 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 7.74 mg (77%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo fue medido por el Procedimiento común E: 4.9.

Ejemplo 2 conjugado anticuerpo-fármaco (2)





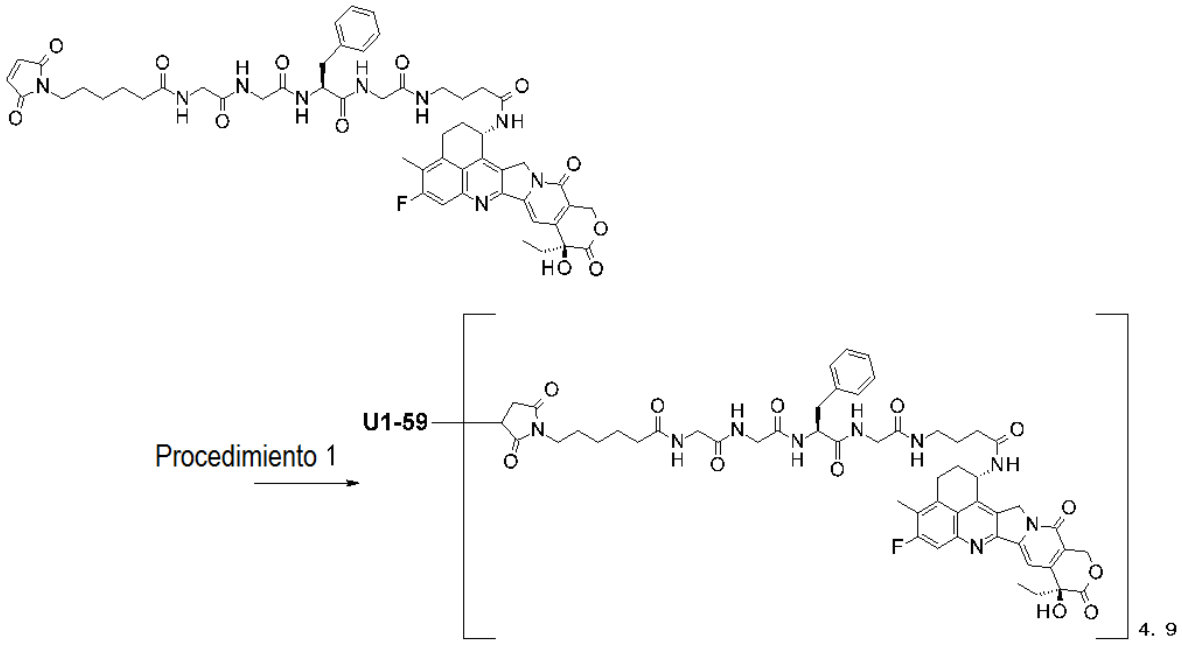
Procedimiento 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (2)

Mediante el uso de U1-59 producido en el Ejemplo de

Referencia 1 y el compuesto obtenido en el anterior Procedimiento 5 del Ejemplo 1, se obtuvo el conjugado anticuerpo titulado-fármaco de la misma manera que en el Procedimiento 6 del Ejemplo 1.

Concentración de anticuerpo: 12.0 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 226,. mg (91%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E: 4.9.

Ejemplo 3 conjugado anticuerpo-fármaco (3)

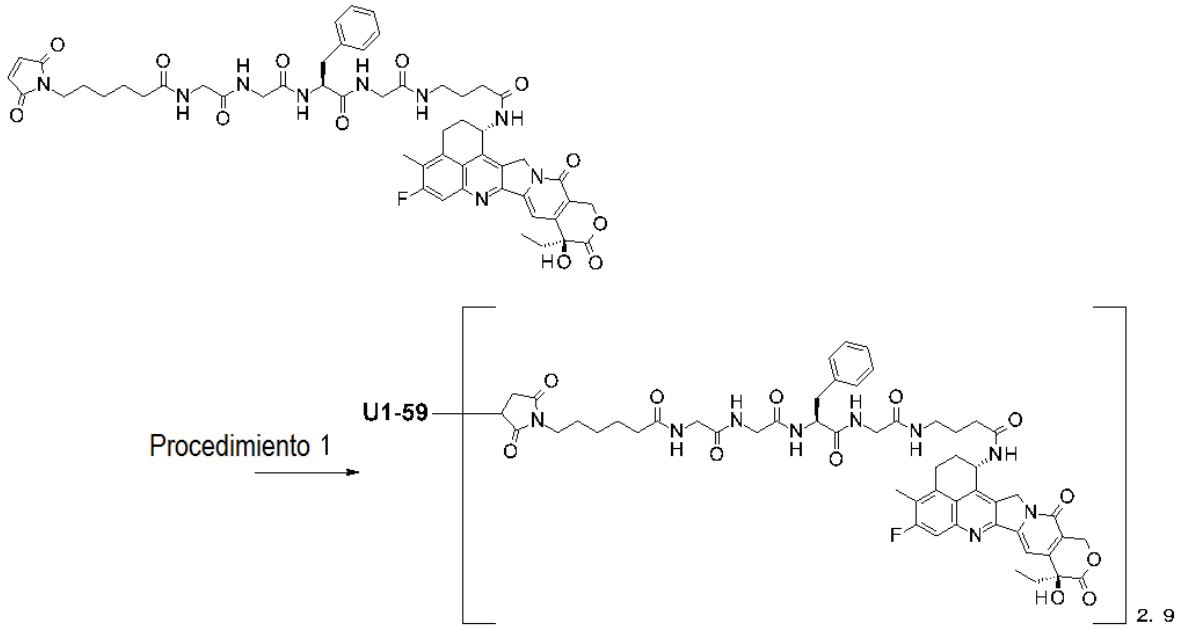


Procedimiento 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (3)

Mediante el uso de U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Procedimiento 5 del Ejemplo 1, se obtuvo el conjugado anticuerpo titulado-fármaco de la misma manera que en el Procedimiento 6 del Ejemplo 1.

Concentración de anticuerpo: 16.9 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 219.7 mg (88%), y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E: 4.9.

Ejemplo 4 conjugado anticuerpo-fármaco (4)



Procedimiento 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (4)

Reduciendo el anticuerpo: U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 fue preparado para tener la concentración de anticuerpo de 10 mg/mL mediante la sustitución del medio con PBS6.0/EDTA usando el Procedimiento común B y Procedimiento común C descritos en el Método de Producción 1. La solución (1.00 mL) se añadió a un tubo de polipropileno de 1.5 mL y se cargó con una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0.0187 mL; 2.8 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución

acuosa 1 M de fosfato ácido dipotásico (Nacalai Tesque, Inc.; 0.0170 mL). Después de confirmar que la solución tenía un pH de 7.0 +/- 0.1, el enlace disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo se redujo por incubación a 37ºC durante 1 hora.

Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Después de añadir una solución de sulfóxido de dimetilo (0.0314 mL; 4.7 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el Procedimiento 5 anteriormente a la solución a temperatura ambiente, se incubó a 15ºC durante 1 hora para conjugar el enlazador fármaco al anticuerpo. A continuación, una solución acuosa (0.0123 mL; 18.4 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) a la misma y se incubó a temperatura ambiente durante otros 20 minutos para terminar la reacción del enlazador de fármaco.

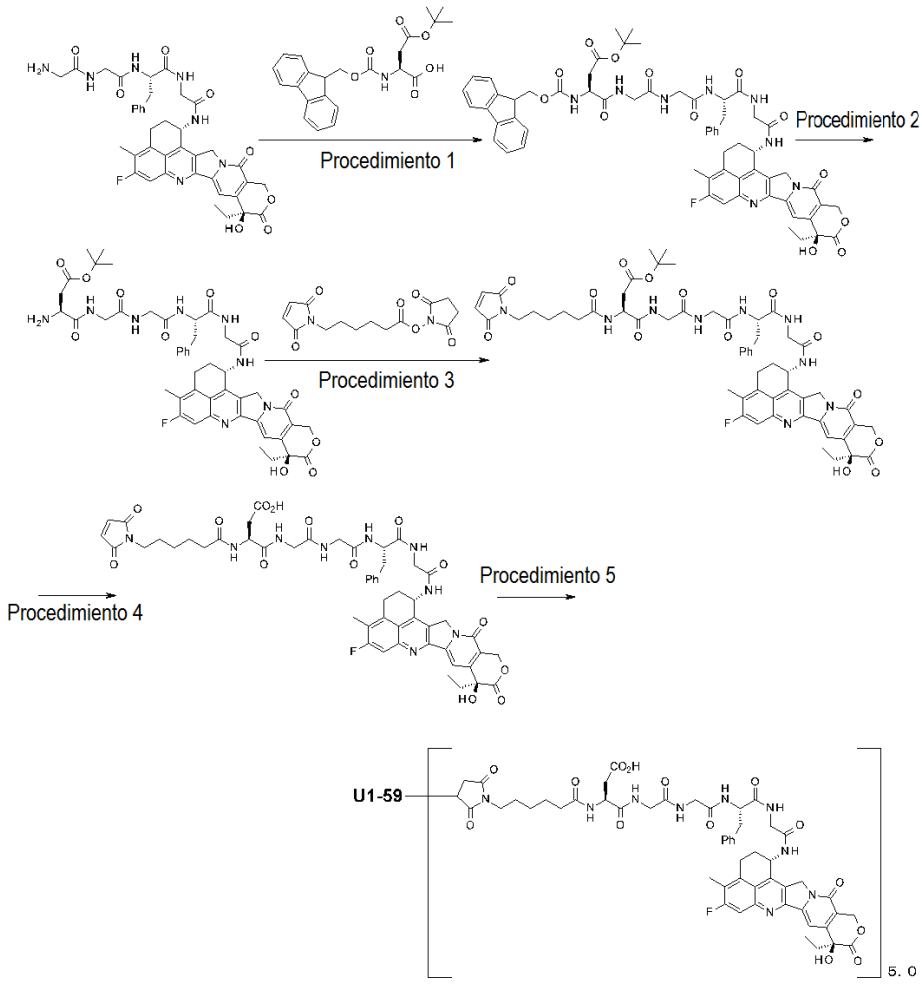
Purificación: La solución anterior se sometió a purificación usando el procedimiento común D (ABS se usa como solución amortiguadora) que se describe en el Método de producción 1 para dar 6 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo titulado-fármaco. Después de eso, la solución se concentró por el Procedimiento común A.

Caracterización físico-química: Mediante el uso del Procedimiento común E que se describe en el Método de producción 1 (como coeficiente molar de absorción del enlazador de fármaco, se usaron $E_{D,\ 280}$ = 5000, y $E_{D,\ 370}$ =

19000), se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 1.02 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 6.1 mg (61%), y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E: 2.9; y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo medido por Procedimiento común F (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usó $E_{D, 280}$ = 5000): 3.2.

Ejemplo 5 Conjugado anticuerpo-fármaco (5)



Procedimiento 1: (5S,14S)-5-bencil-1-{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-14-{[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}-1,4,7,10,13-pentaoxo-3,6,9,12-tetraazahexadecan-16-oato de terc-butilo

Enfriando con hielo, a una solución en N,N-dimetilformamida (10.0 mL) de glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]glicinamida (forma libre del compuesto farmacéutico que se describe en la Publicación Internacional No. WO 1997/46260; 0.250 g, 0.332 mmol), se le añadieron N-hidroxisuccinimida (57,2 mg, 0.497 mmol), y ácido 4-terc-butil-N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-aspártico (0.205 g, 0.497 mmol), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (0.123 g, 0.497 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. El solvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 9: 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0.278 g, 73%).

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) delta: 0.86 (3H, t, J=7.1 Hz), 1.35 (9H, s), 1.79-1.90 (2H, m), 2.3-2.25 (2H, m), 2.40 (3H, s), 2.40-2.51 (2H, m), 2.64-2.82 (2H, m), 2.98 (1H, dd,

J=13.7, 4.6 Hz), 3.16 (2H, s ancho), 3.55 (1H, dd, J=16.7, 5.7 Hz), 3.63-3.80 (4H, m), 4.16-4.34 (3H, m), 4.36-4.50 (2H, m), 5.23 (2H, s), 5.37 (1H, d, J=16.5 Hz), 5.43 (1H, d, J=16.5 Hz), 5.51-5.62 (1H, m), 6.52 (1H, s), 7.10-7.25 (5H, m), 7.26-7.33 (3H, m), 7.39 (2H, t, J=7.3 Hz), 7.65-7.72 (3H, m), 7.80 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.86 (2H, d, J=7.3 Hz), 7.98 (1H, t, J=5.5 Hz), 8.07 (1H, d, J=7.8 Hz), 8.15 (1H, t, J=5.5 Hz), 8.31 (1H, t, J=5.5 Hz), 8.41 (1H, d, J=8.7 Hz),

MS (ESI) m/z: 1147 $(M+H)^+$.

Procedimiento 2: (5S,14S)-14-amino-5-bencil-1-{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-1,4,7,10,13-pentaoxo-3,6,9,12-tetraazahexadecan-16-oato de terc-butilo

A una solución en N,N-dimetilformamida (2.00 mL) del compuesto (0.279 g, 0.242 mmol) obtenido en el Proceso 1 anterior, se le añadió piperidina (0.240 mL, 2.42 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El solvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 2: 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0.265 g, cuantitativo).

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) delta: 0.88 (3H, t, J=7.2

Hz), 1.39 (9H, s), 1.81-1.94 (1H, m), 2.7-2.28 (2H, m), 2.37 (1H, dd, J=15.8, 8.0 Hz), 2.43 (3H, s), 2.60 (1H, dd, J=15.8, 4.9 Hz), 2.75-2.82 (1H, m), 3.00 (1H, dd, J=13.9. 4.5 Hz), 3.16-3.25 (2H, m), 3.50-3.61 (2H, m), 3.65-3.81 (5H, m), 4.40-4.51 (1H, m), 5.27 (2H, dd, J=24.1, 19.0 Hz), 5.43 (2H, dd, J=21.3. 16.2 Hz), 5.56-5.65 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.15-7.28 (5H, m), 7.33 (1H, s), 7.83 (1H, d, J=11.0 Hz), 8.04 (1H, t, J=5.7 Hz), 8.09 (1H, d, J=8.2 Hz), 8.26-8.39 (2H, m), 8.44 (1H, d, J=8.2 Hz).

Procedimiento 3: (5S,14S)-5-bencil-14-{[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]amino}-1-{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-1,4,7,10,13-pentaoxo-3,6,9,12-tetraazahexadecan-16-oato de terc-butilo

A una solución en N,N-dimetilformamida (2.00 mL) del compuesto (0.100 g, 0.108 mmol) obtenido en el Proceso 2 anterior, se le añadió N- hexanoato de succinimidil 6-maleimida (40.0 mg, 0.130 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. El solvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 9: 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (80.0 mg, 66%).

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) delta: 0.88 (3H, t, J=7.2

Hz), 1.13-1.23 (2H, m), 1.37 (9H, s), 1.42-1.54 (4H, m), 1.80-1.96 (2H, m), 2.8-2.25 (4H, m), 2.35-3.76 (15H, m), 2.43 (3H, s), 4.39-4.49 (1H, m), 4.55-4.67 (1H, m), 5.21-5.34 (2H, m), 5.43 (2H, dd, J=21.1. 16.4 Hz), 5.56-5.64 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.01 (2H, d, J=0.8 Hz), 7.16-7.26 (5H, m), 7.33 (1H, s), 7.83 (1H, d, J=11.3 Hz), 8.4-8.18 (3H, m), 8.30-8.37 (1H, m), 8.43 (1H, d, J=8.6 Hz),

MS (ESI) m/z: 1118 $(M+H)^+$.

Procedimiento 4: N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-alpha-aspartilglicilglicil-L-fenilalanil-N-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]glicinamida

Enfriando con hielo, se añadió ácido trifluoroacético (4.00 mL) al compuesto (70.0 mg, 62.6 u moL) obtenido en el Procedimiento 3 anterior, y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El solvente se eliminó a presión reducida para dar el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (55,0 mg, 83%).

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) delta: 0.88 (3H, t, J=7.4 Hz), 1.14-1.24 (2H, m), 1.41-1.53 (4H, m), 1.79-1.95 (2H, m), 2.8-2.28 (4H, m), 2.37-2.60 (2H, m), 2.42 (3H, s), 2.63-2.82 (2H, m), 2.99 (1H, dd, J=14.1, 5.1 Hz), 3.12-3.25 (2H, m), 3.29-3.44 (1H, m), 3.52-3.80 (6H, m), 4.38-4.48 (1H, m),

4.56 (1H, dd, J=13.7, 7.4 Hz), 5.27 (2H, dd, J=24.3, 18.8 Hz), 5.43 (2H, dd, J=21.5, 16.4 Hz), 5.57-5.62 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.01 (2H, s), 7.15-7.26 (5H, m), 7.33 (1H, s), 7.82 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.98 (1H, s ancho), 8.08 (1H, d, J=6.7 Hz), 8.15 (1H, d, J=7.8 Hz), 8.34 (1H, s ancho), 8.44 (1H, d, J=8.6 Hz), 12.26 (1H, s ancho).

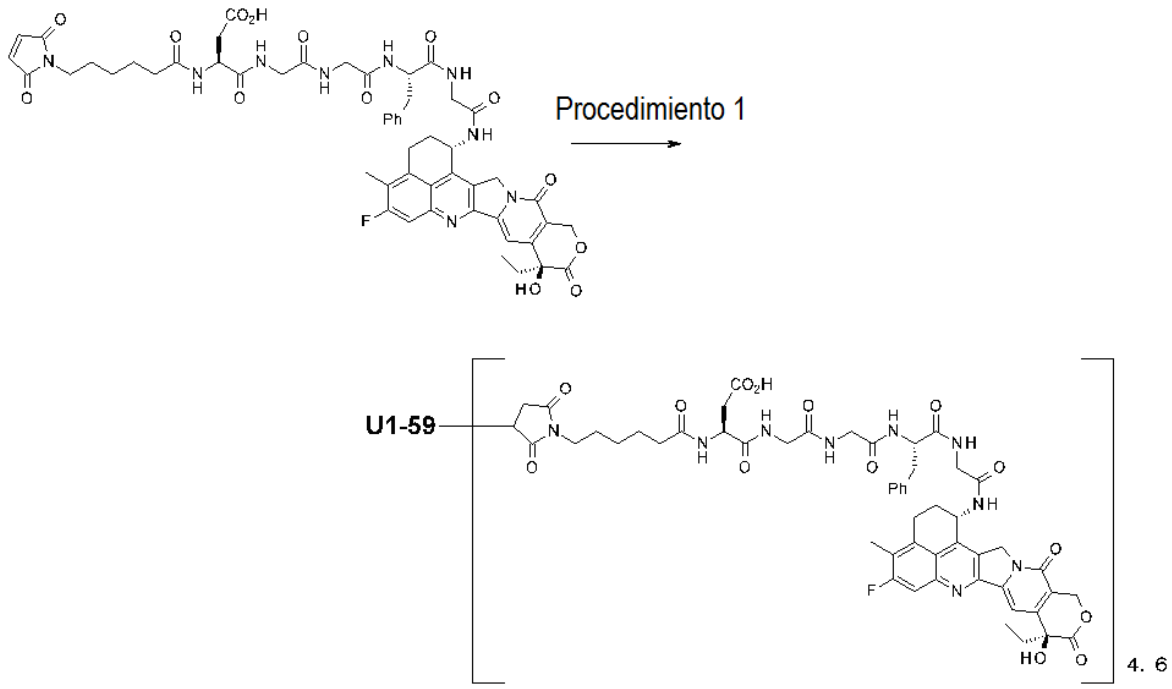
MS (ESI) m/z: 1062 $(M+H)^+$.

Procedimiento 5: Conjugado anticuerpo-fármaco (5)

Mediante el uso de U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Procedimiento 4 anterior, se obtuvo el conjugado anticuerpo titulado-fármaco de la misma manera que en el Procedimiento 6 del Ejemplo 1.

Concentración de anticuerpo: 1.36 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 8.16 mg (82%), y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usaron $E_{D, 280}$ = 7620, $E_{D, 370}$ = 23700): 5.0.

Ejemplo 6 Conjugado anticuerpo-fármaco (6)

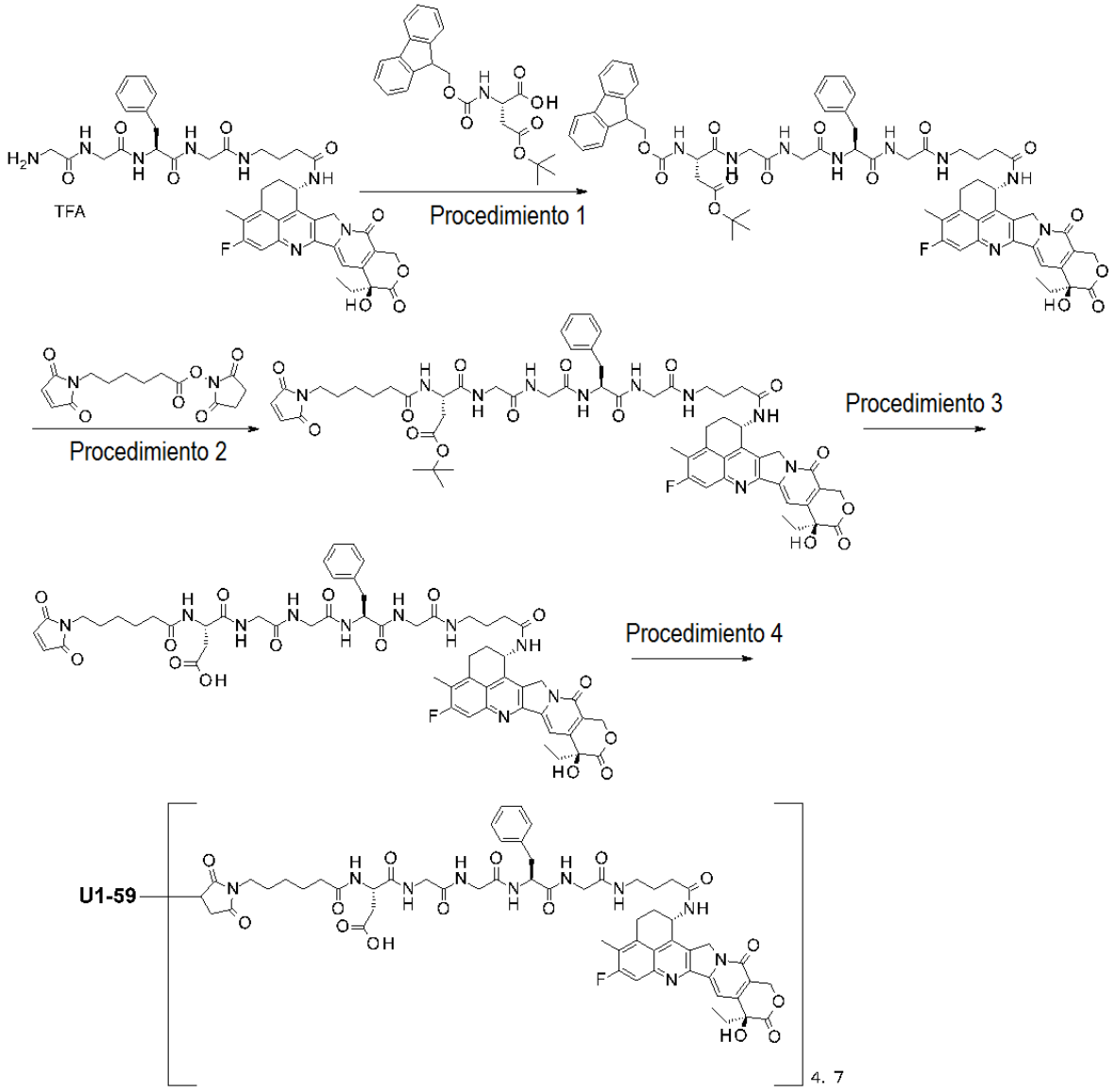


Procedimiento 1: Conjugado anticuerpo-fármaco (6)

Mediante el uso de U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Procedimiento 4 anterior del Ejemplo 5, se obtuvo el conjugado anticuerpo titulado-fármaco de la misma manera que en el Procedimiento 6 del Ejemplo 1.

Concentración de anticuerpo: 11.5 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 224.2 mg (90%), y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento E común (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usaron $E_{D,\ 280}$ = 7620, $E_{D,\ 370}$ = 23700): 4.6.

Ejemplo 7 Conjugado anticuerpo-fármaco (7)



Procedimiento 1: (3S,12S)-12-bencil-21-{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-3-{[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}-4.7,10.13,16,21-hexaoxo-

5,8,11,14,17-pentaazahenicosan-1-oato de terc-butilo

Ácido (2S)-4-terc-butoxi-2-{[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}-4-oxobutanoico (0.625 g, 1.52 mmol) se disolvió en diclorometano (10.0 mL), fue cargado con N-hidroxisuccinimida (0.175 g, 1.52 mol) y 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0.291 g, 1.52 mmol), y se agitó durante 1 hora. La solución de reacción se añadió gota a gota a una solución de N,N-dimetilformamida (10.0 mL) cargada con el compuesto (1.00 g, 1.01 mmol) obtenido en el Procedimiento 4 del Ejemplo 1 anterior y se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. El solvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 8: 2 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0.873 g, 70%).

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) delta: 0.88 (3H, t, J=7.4 Hz), 1.37 (9H, s), 1.68-1.78 (2H, m), 1.81-1.93 (2H, m), 2.10-2.23 (4H, m), 2.41 (3H, s), 2.68-2.85 (3H, m), 2.99-3.22 (5H, m), 3.58-3.81 (6H, m), 4.19-4.36 (3H, m), 4.38-4.52 (2H, m), 5.17 (1H, d, J=19.2 Hz), 5.25 (1H, d, J=19.2 Hz), 5.43 (2H, s), 5.54-5.62 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.15-7.34 (8H, m), 7.41 (2H, t, J=7.2 Hz), 7.66-7.75 (4H, m), 7.81 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.88 (2H, d, J=7.4 Hz), 8.1-8.6 (1H, m), 8.14 (1H, d, J=8.2 Hz), 8.17-8.22 (1H, m), 8.25-8.30 (1H, m), 8.47

(1H, d, J=8.6 Hz).

MS (APCI) m/z: 1232 $(M+H)^+$.

Procedimiento 2: (3S,12S)-12-bencil-3-{[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]amino}-21-{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-4.7,10.13,16,21-hexaoxo-5,8,11,14,17-pentaazahenicosan-1-oato de terc-butilo

El compuesto (0.800 g, 0.649 mmol) obtenido en el Procedimiento 1 anterior se disolvió en N,N-dimetilformamida (3.00 mL), se cargó con piperidina (0.643 mL, 6.49 mmol), y se agitó durante 1 hora. El solvente se eliminó hasta la sequedad a presión reducida y los residuos obtenidos se disolvieron en N,N-dimetilformamida (10 mL). Después de la adición de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida (0.300 g, 0.974 mmol), se agitó durante 20 horas. El solvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 8: 2 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0.224 g, 29%).

RMN-^{1}H (400 MHz. DMSO-d_6) delta: 0.87 (3H, t, J=7.6 Hz), 1.15-1.22 (2H, m), 1.35 (9H, s), 1.44-1.47 (4H, m), 1.71-1.73 (2H, m), 1.80-1.91 (2H, m), 2.08 (2H, t, J=7.6 Hz),

2.13-2.20 (4H, m), 2.40 (3H, s), 2.67 (1H, dt, J=11.1. 4.8 Hz), 2.78 (1H, dd, J=13.6. 9.4 Hz), 2.99-3.17 (6H, m), 3.31-3.36 (2H, m), 3.57-3.76 (6H, m), 4.45-4.47 (1H, m), 4.57-4.60 (1H, m), 5.16 (1H, d, J=18.7 Hz), 5.25 (1H, d, J=18.7 Hz), 5.42 (2H, s), 5.55-5.60 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.99 (2H, s), 7.15-7.27 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.70 (1H, t, J=5.4 Hz), 7.80 (1H, d, J=10.9 Hz), 7.99 (1H, t, J=5.7 Hz), 8.9-8.12 (3H, m), 8.25 (1H, t, J=6.0 Hz), 8.45 (1H, d, J=9.1 Hz).

MS (APCI) m/z: 1203 $(M+H)^+$.

Procedimiento 3: N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]-L-alpha-aspartilglicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-4-oxobutil)glicinamida

Se hizo reaccionar el compuesto (0.224 g, 0.186 mmol) obtenido en el Procedimiento 2 anterior de la misma manera que en el Procedimiento 2 del Ejemplo 1 para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (21,2 mg, 10%).

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) delta: 0.87 (3H, t, J=7.2 Hz), 1.13-1.21 (2H, m), 1.42-1.45 (6H, m), 1.70-1.72 (2H, m), 1.85-1.88 (2H, m), 2.6-2.20 (6H, m), 2.39 (3H, s), 2.63-2.67 (1H, m), 2.78-2.81 (1H, m), 3.4-3.12 (6H, m), 3.63-3.70 (6H, m), 4.46-4.52 (2H, m), 5.16 (1H, d, J=19.2 Hz), 5.25 (1H, d,

J=18.8 Hz), 5.42 (2H, s), 5.55-5.58 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.99 (2H, s), 7.18-7.23 (6H, m), 7.30 (1H, s), 7.71 (1H, t, J=5.5 Hz), 7.79 (1H, d, J=10.9 Hz), 7.99-8.02 (1H, m), 8.10-8.11 (3H, m), 8.27-8.30 (1H, m), 8.47-8.50 (1H, m).

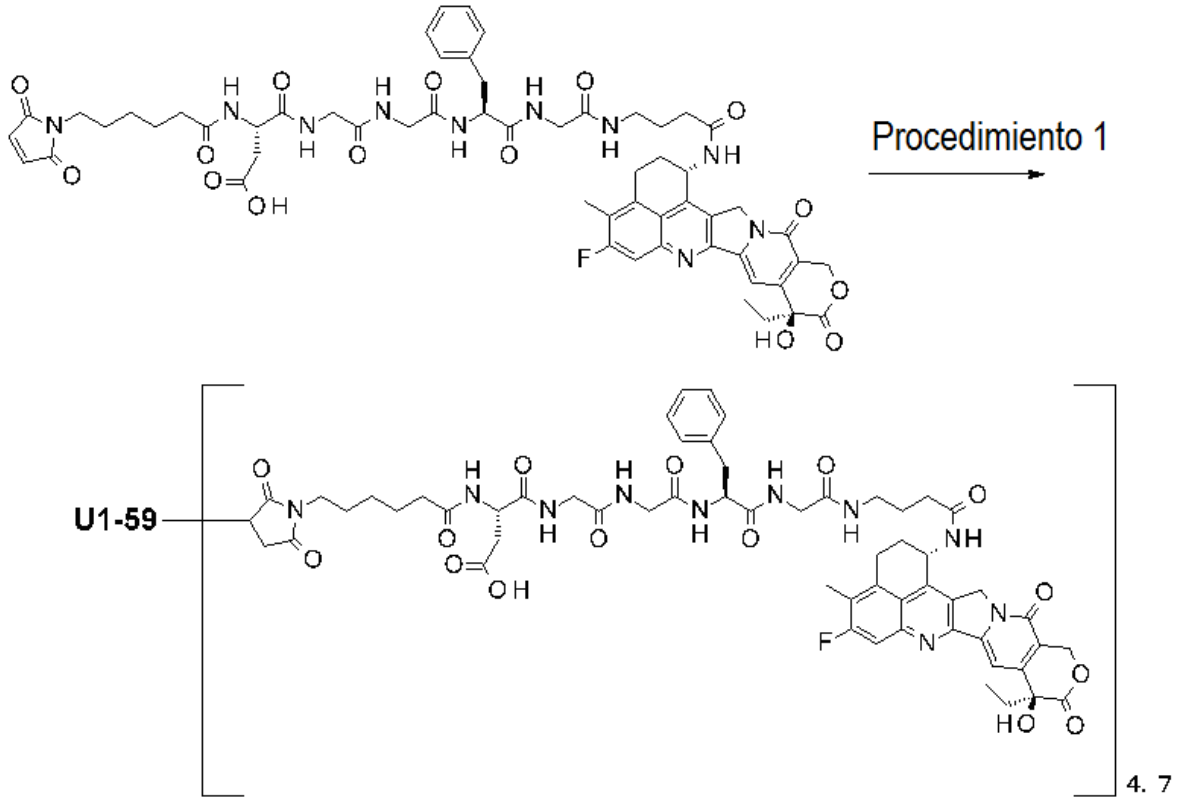
MS (APCI) m/z: 1147 $(M+H)^+$.

Procedimiento 4: conjugado anticuerpo-fármaco (7)

Mediante el uso de U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Procedimiento 3 anterior, se obtuvo el conjugado anticuerpo titulado-fármaco de la misma manera que en el Procedimiento 6 del Ejemplo 1.

Concentración de anticuerpo: 1.39 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 8.34 mg (83%), y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usaron $E_{D,\ 280}$ = 7670. $E_{D,\ 370}$ = 24800): 4.7.

Ejemplo 8 Conjugado anticuerpo-fármaco (8)

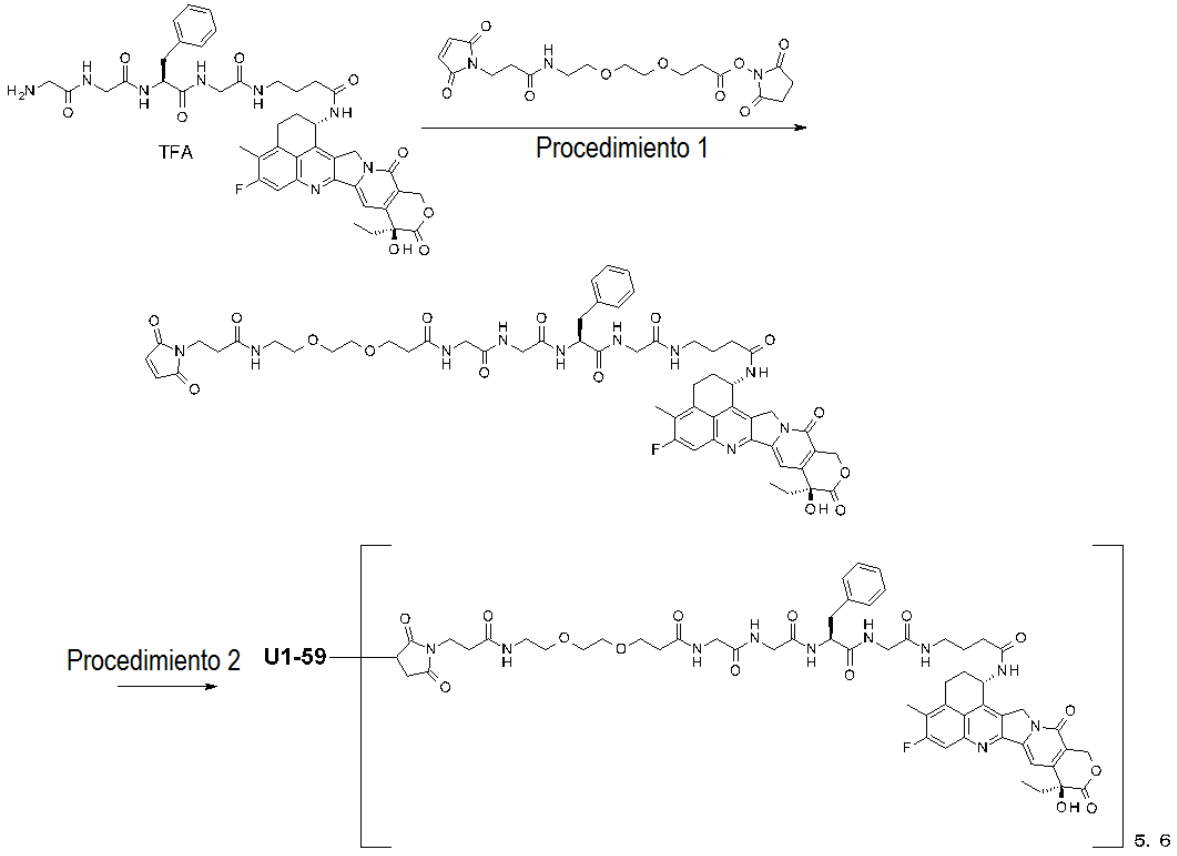


Procedimiento 1: conjugado anticuerpo-fármaco (8)

Mediante el uso de U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Procedimiento 3 anterior del Ejemplo 7, se obtuvo el conjugado anticuerpo titulado-fármaco de la misma manera que en el Procedimiento 6 del Ejemplo 1.

Concentración de anticuerpo: 11.2 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 228.5 mg (91%), y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usaron $E_{D,\ 280}$ = 7670, $E_{D,\ 370}$ = 24800): 4.7.

Ejemplo 9 Conjugado anticuerpo-fármaco (9)



Procedimiento 1: N-{3-[2-(2-{[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoil]amino}etoxi)etoxi]propanoil}glicilglicil-L-fenilalanil-N-(4-{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-4-oxobutil)glicinamida

El compuesto (100 mg, 0.119 mmol) obtenido en el procedimiento 4 del Ejemplo 1 anterior se hizo reaccionar de la misma manera que en el Procedimiento 5 del Ejemplo 1 mediante el uso de 3-(2-(2-(3-

maleinimidepropanamida)etoxi)etoxi) propanoato de N-succinimidilo (50.7 mg, 0.119 mmol) en lugar de hexanoato de N-succinimidil 6-maleimida para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (66.5 mg, 48%).

RMN-^{1}H (400 MHz. DMSO-d_6) delta: 0.85 (3H, t, J=7.4 Hz), 1.65-1.74 (2H, m), 1.77-1.90 (2H, m), 2.7-2.19 (4H, m), 2.30 (2H, t, J=7.2 Hz), 2.33-2.36 (2H, m), 2.38 (3H, s), 2.76 (1H, dd, J=13.7. 9.8 Hz), 2.96-3.18 (9H, m), 3.42-3.44 (4H, m), 3.53-3.76 (10H, m), 4.43 (1H, td, J=8.6. 4.7 Hz), 5.14 (1H, d, J=18.8 Hz), 5.23 (1H, d, J=18.8 Hz), 5.38 (1H, d, J=17.2 Hz), 5.42 (1H, d, J=17.2 Hz), 5.52-5.58 (1H, m), 6.52 (1H, s), 6.98 (2H, s), 7.12-7.17 (1H, m), 7.18-7.25 (4H, m), 7.29 (1H, s), 7.69 (1H, t, J=5.5 Hz), 7.78 (1H, d, J=11.3 Hz), 7.98-8.03 (2H, m), 8.11 (1H, d, J=7.8 Hz), 8.16 (1H, t, J=5.7 Hz), 8.23 (1H, t, J=5.9 Hz), 8.44 (1H, d, J=9.0 Hz),

MS (APCI) m/z: 1149 $(M+H)^+$.

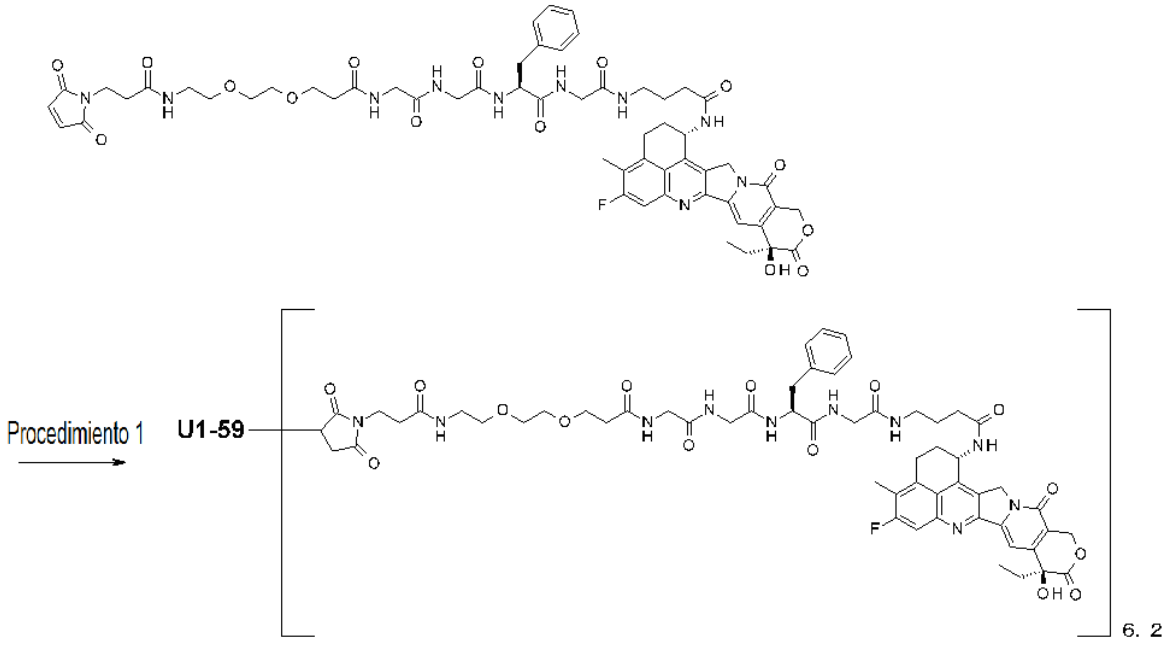
Procedimiento 2: conjugado anticuerpo-fármaco (9)

Mediante el uso de U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Procedimiento 1 anterior, se obtuvo el conjugado anticuerpo titulado-fármaco de la misma manera que en el Procedimiento 6 del Ejemplo 1.

Concentración de anticuerpo: 2.08 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 18.7 mg (94%), y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E (como

coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usaron $E_{D,\ 280}$ = 4964, $E_{D,\ 370}$ = 18982): 5.6.

Ejemplo 10 Conjugado anticuerpo-fármaco (10)



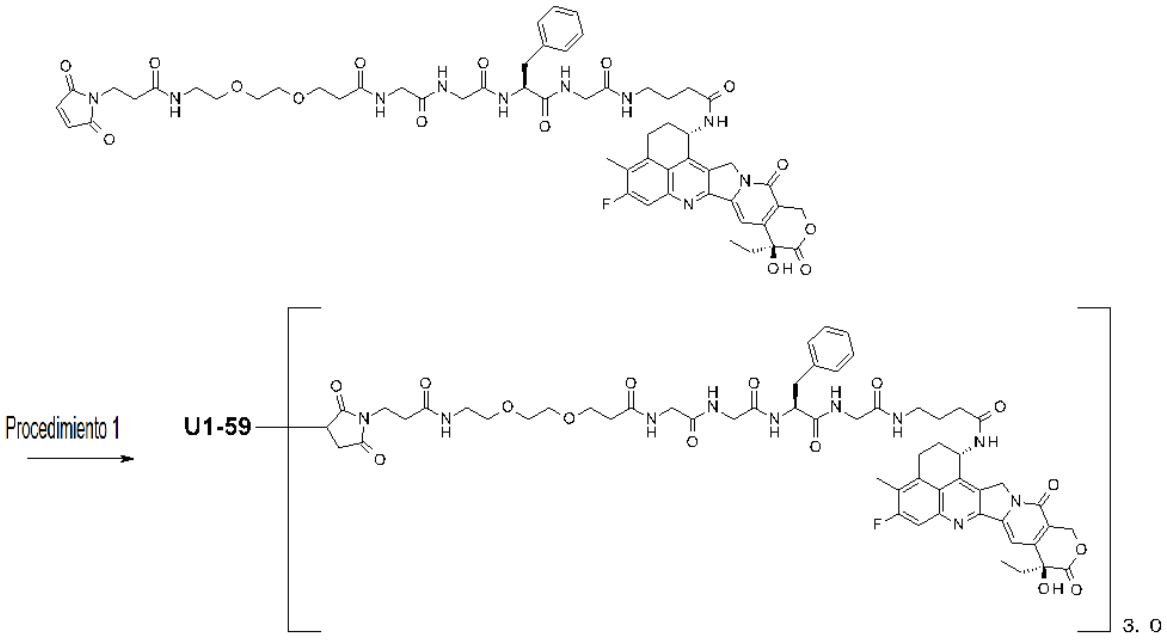
Procedimiento 1: conjugado anticuerpo-fármaco (10)

Mediante el uso de U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Procedimiento 1 anterior del Ejemplo 9, se obtuvo el conjugado anticuerpo titulado-fármaco de la misma manera que en el Procedimiento 6 del Ejemplo 1.

Concentración de anticuerpo: 19.7 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 236.4 mg (95%), y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usaron $E_{D,\ 280}$ = 4964, $E_{D,\ 370}$ = 18982): 6.2; y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por

molécula de anticuerpo medido por Procedimiento común F (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usó $E_{D,\ 280}$ = 4964): 6.4.

Ejemplo 11 Conjugado anticuerpo-fármaco (11)



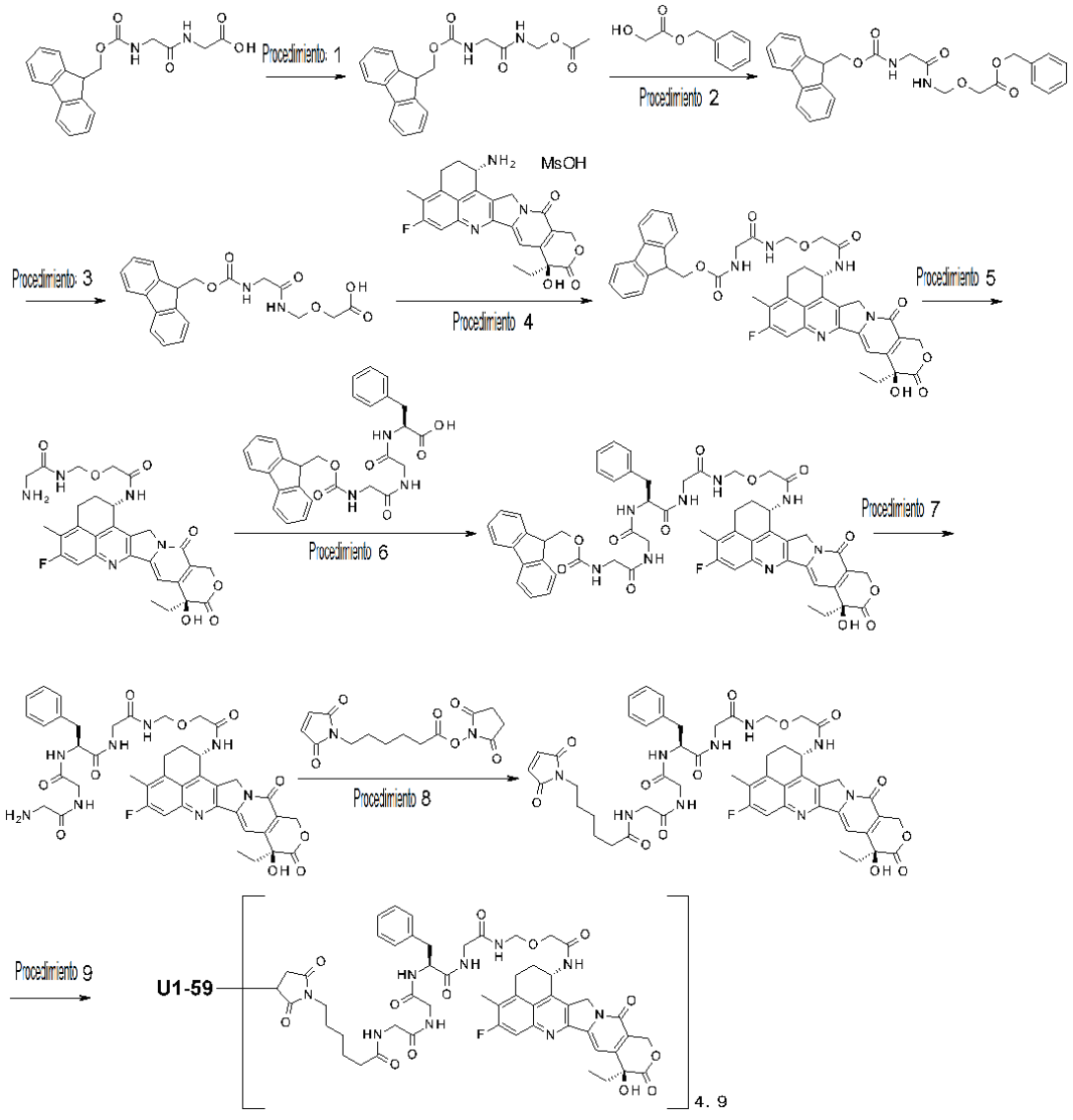
Procedimiento 1: conjugado anticuerpo-fármaco (11)

Mediante el uso de U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Procedimiento 1 anterior del Ejemplo 9, se obtuvo el conjugado anticuerpo titulado-fármaco de la misma manera que en el Procedimiento 1 del Ejemplo 4.

Concentración de anticuerpo: 0.88 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 5.28 mg (53%), y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar del

enlazador de fármaco, se usaron $E_{D, 280}$ = 4964, $E_{D, 370}$ = 18982): 3.0; y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo medido por procedimiento común F (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usó $E_{D, 280}$ = 4964): 3.3.

Ejemplo 12 Conjugado anticuerpo-fármaco (12)



Procedimiento 1: acetato de ({N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicil}amino)metilo

A una mezcla que contenía N-9-fluorenilmetoxicarbonilglicilglicina (4.33 g, 12.2 mmol), se le añadieron tetrahidrofurano (120 mL), y tolueno (40.0 mL), piridina (1.16 mL, 14.7 mmol) y tetraacetato de plomo (6,84 g, 14.7 mmol) y se sometió a reflujo con calentamiento durante 5 horas. Después de que la solución de reacción se enfrió a temperatura ambiente, el material insoluble se eliminó por filtración a través de Celite, y el filtrado se concentró a presión reducida. Los residuos obtenidos se disolvieron en acetato de etilo, se lavaron con agua y salmuera saturada, y después se secó la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro. Después de eliminar el solvente a presión reducida, los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 9: 1 (v/v)- acetato de etilo] para dar el compuesto del título como sólido incoloro (3,00 g, 67 %).

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) delta: 2.07 (3H, s), 3.90 (2H, d, J=5.1 Hz), 4.23 (1H, t, J=7.0 Hz), 4.46 (2H, d, J=6.6 Hz), 5.26 (2H, d, J=7.0 Hz), 5.32 (1H, s ancho), 6.96 (1H, s ancho), 7.32 (2H, t, J=7.3 Hz), 7.41 (2H, t, J=7.3 Hz), 7.59 (2H, d, J=7.3 Hz), 7.77 (2H, d, J=7.3 Hz).

Procedimiento 2: [({N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicil}amino)metoxi] acetato de bencilo

A una solución en tetrahidrofurano (40.0 mL)del compuesto (3.68 g, 10.0 mmol) obtenido en el procedimiento 1 anterior y glicolato de bencilo (4.99 g, 30.0 mmol), se le añadió terc-butóxido de potasio (2.24 g, 20.0 mmol) a 0ºC y se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La solución de reacción se cargó con acetato de etilo y agua a 0ºC y se extrajo con acetato de etilo y cloroformo. La capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato de sodio y se filtró. El solvente se eliminó a presión reducida. Los residuos obtenidos se disolvieron en dioxano (40.0 mL) y agua (10.0 mL), se cargó con carbonato ácido de sodio (1.01 g, 12.0 mmol) y cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (2.59 g, 10.0 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se cargó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato de sodio y se filtró. El solvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía de sílice en columna de gel [hexano: acetato de etilo = 100: (v/v) 0-0: 100] para dar el compuesto del título en sustancia oleosa incolora (1.88 g, 40%).

RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) delta: 3.84 (2H, d, J=5.5 Hz), 4.24 (3H, t, J=6.5 Hz), 4.49 (2H, d, J=6.7 Hz), 4.88 (2H, d, J=6.7 Hz), 5.15-5.27 (1H, m), 5.19 (2H, s), 6.74 (1H,

s ancho), 7.31-7.39 (7H, m), 7.43 (2H, t, J=7.4 Hz), 7.61 (2H, d, J=7.4 Hz), 7.79 (2H, d, J=7.4 Hz).

Procedimiento 3: ácido [({N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicil}amino)metoxi]acético

El compuesto (1.88 g, 3.96 mmol) obtenido en el Procedimiento 2 anterior se disolvió en etanol (40.0 mL) y acetato de etilo (20.0 mL). Después de la adición de catalizador de paladio carbono (376 mg), se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de hidrógeno durante 2 horas. El material insoluble se eliminó por filtración a través de Celite, y el solvente del filtrado se eliminó a presión reducida para dar el compuesto del título como un sólido incoloro (1.52 g, cuantitativo).

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) delta: 3.62 (2H, d, J=6,3 Hz), 3.97 (2H, s), 4.18-4.32 (3H, m), 4.60 (2H, d, J=6.7 Hz), 7.29-7.46 (4H, m), 7.58 (1H, t, J=5.9 Hz), 7.72 (2H, d, J=7.4 Hz), 7.90 (2H, d, J=7.4 Hz), 8.71 (1H, t, J=6.5 Hz),

Procedimiento 4: (2-{[(2-{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi)metil]amino}-2-oxoetil)carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo

Enfriando con hielo, a una solución en N,N-dimetilformamida (10.0 mL) de mesilato de exatecano (0.283 g, 0.533 mmol), N-hidroxisuccinimida (61.4 mg, 0.533 mmol), y el

compuesto (0.205 g, 0.533 mmol) obtenido en el anterior Procedimiento 3, se añadieron N,N-diisopropiletilamina (92.9 uL, 0.533 mmol) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (0.143 g, 0.693 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El solvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - repartió capa orgánica de cloroformo: metanol: agua = 7: 3: 1 (v/v/v)] para producir el compuesto del título en forma de un color marrón pálido sólido (0.352 g, 82%).

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) delta: 0.81 (3H, t, J=7.4 Hz), 1.73-1.87 (2H, m), 2.6-2.20 (2H, m), 2.34 (3H, s), 03.01-03.23 (2H, m), 3.58 (2H, d, J=6.7 Hz), 3.98 (2H, s), 4.13-4.25 (3H, m), 4.60 (2H, d, J=6.7 Hz), 5.09-5.22 (2H, m), 5.32-5.42 (2H, m), 5.50-5.59 (1H, m), 6.49 (1H, s), 7.24-7.30 (3H, m), 7.36 (2H, t, J=7.4 Hz), 7.53 (1H, t, J=6.3 Hz), 7.66 (2H, d, J=7.4 Hz), 7.75 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.84 (2H, d, J=7.4 Hz), 8.47 (1H, d, J=8.6 Hz), 8.77 (1H, t, J=6.7 Hz).

MS (ESI) m/z: 802 $(M+H)^+$.

Procedimiento 5: N-[(2-{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi)metil]glicinamida

A una solución en N,N-dimetilformamida (11.0 mL) del compuesto (0.881 g, 1.10 mmol) obtenido en el

Procedimiento 4 anterior, se le añadió piperidina (1.1 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El solvente se eliminó a presión reducida para dar una mezcla que contenía el compuesto del título. La mezcla se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional.

Procedimiento 6: N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi)metil]glicinamida

Enfriando con hielo, a una solución en N,N-dimetilformamida (50.0 mL) de la mezcla (0.439 mmol) obtenida en el Procedimiento 5 anterior, se le añadieron N-hidroxisuccinimida (0.101 g, 0.878 mmol), y N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]glicilglicil-L-fenilalanina (el compuesto descrito en la patente japonesa abierta al público No. 2002-60351; 0.440 g, 0.878 mmol), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (0.181 g, 0.878 mmol) y se agitó; a temperatura ambiente durante 4 días. El solvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 9: 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido naranja pálido (0.269 g, 58%).

MS (ESI) m/z: 1063 $(M+H)^+$.

Procedimiento 7: Glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-

{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi)metil]glicinamida

A una solución en N,N-dimetilformamida (4.00 mL) del compuesto (0.269 g, 0.253 mmol) obtenido en el Procedimiento 6 anterior, se le añadió piperidina (0.251 mL, 2.53 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El solvente se eliminó a presión reducida para dar una mezcla que contenía el compuesto del título. La mezcla se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional.

Procedimiento 8: N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-{[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino}-2-oxoetoxi)metil]glicinamida

A una solución en N,N-dimetilformamida (10.0 mL) del compuesto (0.253 mmol) obtenido en el Procedimiento 7 anterior, se le añadió hexanoato de de N-succinimidil 6-maleimida (0.156 g, 0.506 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El solvente se eliminó a presión reducida y los residuos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna

de gel de sílice [cloroformo - cloroformo: metanol = 9: 1 (v/v)] para producir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (0.100 g, 38%).

RMN-^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) delta: 0.83 (3H, t, J=7.2 Hz), 1.9-1.21 (2H, m), 1.33-1.47 (4H, m), 1.75-1.90 (2H, m), 2.00-2.23 (4H, m), 2.36 (3H, s), 2.69-2.81 (1H, m), 2.94-3.03 (1H, m), 3.6-3.22 (2H, m), 3.23-3.74 (6H, m), 3.98 (2H, s), 4.39-4.50 (1H, m), 4.60 (2H, d, J=6.7 Hz), 5.17 (2H, s), 5.39 (2H, s), 5.53-5.61 (1H, m), 6.50 (1H, s), 6.96 (2H, s), 7.11-7.24 (5H, m), 7.28 (1H, s), 7.75 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.97 (1H, t, J=5.7 Hz), 8.03 (1H, t, J=5.9 Hz), 8.09 (1H, d, J=7.8 Hz), 8.27 (1H, t, J=6.5 Hz), 8.48 (1H, d, J=9.0 Hz), 8.60 (1H, t, J=6.5 Hz).

MS (ESI) m/z: 1034 $(M+H)^+$.

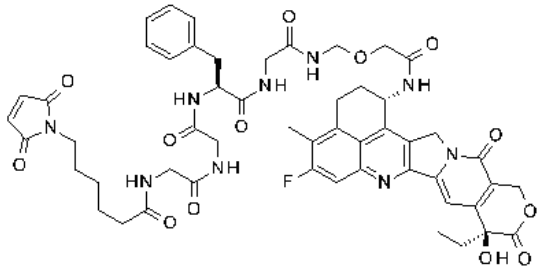
Procedimiento 9: conjugado anticuerpo-fármaco (12)

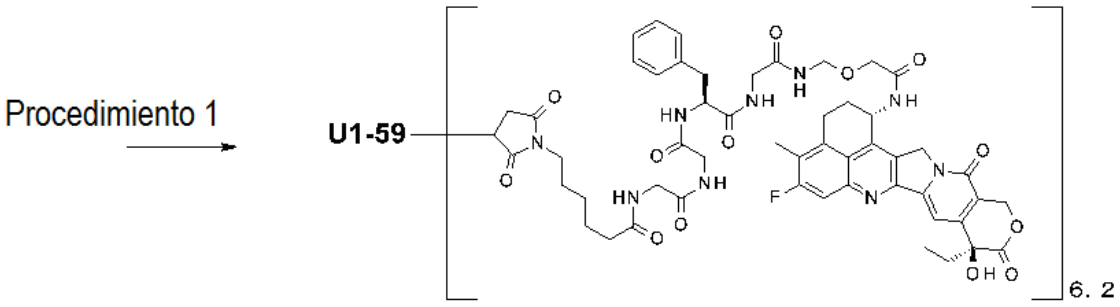
Mediante el uso de U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 y del compuesto obtenido en el Procedimiento 8 anterior, se obtuvo el conjugado anticuerpo titulado-fármaco de la misma manera que en el Procedimiento 6 del Ejemplo 1.

Concentración de anticuerpo: 2.11 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 19.0 mg (95%), y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por

molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usaron $E_{D,\ 280}$ = 5178, $E_{D,\ 370}$ = 20217): 4.9.

Ejemplo 13 conjugado anticuerpo-fármaco (13)





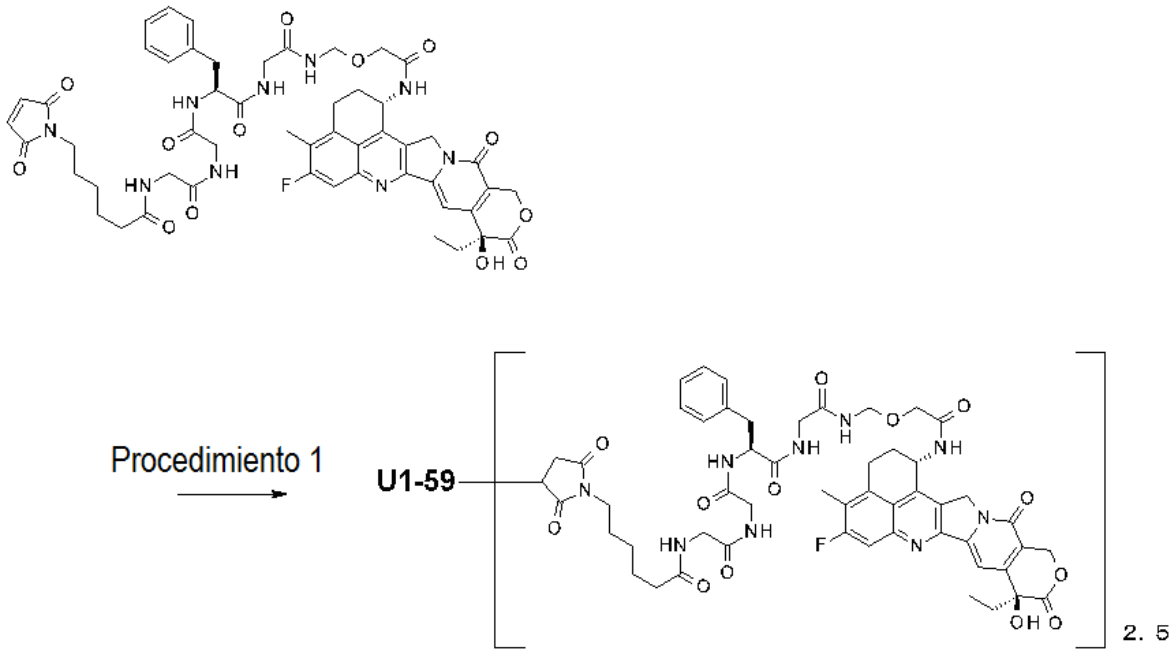
Procedimiento 1: conjugado anticuerpo-fármaco (13)

Mediante el uso de U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 y el compuesto obtenido en el Procedimiento 8 anterior del Ejemplo 12, se obtuvo el conjugado anticuerpo titulado-fármaco de la misma manera que en el Procedimiento 6 del Ejemplo 1.

Concentración de anticuerpo: 22.2 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 244.2 mg (98%), y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E (como

coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, $E_{D,\ 280}$ = 5178, $E_{D,\ 370}$ = 20217): 6.2; y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo medido por procedimiento común F (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, $E_{D,\ 280}$ = 5178): 7.0.

Ejemplo 14 conjugado anticuerpo-fármaco (14)



Procedimiento 1: conjugado anticuerpo-fármaco (14)

Reducción del anticuerpo: U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 fue preparado para tener la concentración de anticuerpo de 10 mg/mL mediante la sustitución del medio con PBS6.0/EDTA usando el Procedimiento común B y procedimiento común C descritos en el Método de Producción 1. La solución (1.00 mL) se añadió a un tubo de polipropileno 2.0 mL y se cargó con una solución acuosa de

TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0.0160 mL; 2.4 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa 1 M de fosfato ácido dipotásico (Nacalai Tesque, Inc.; 0.0150 mL). Después de confirmar que la solución tenía un pH de 7.0 +/- 0.1, el enlace disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo se redujo por incubación a 37ºC durante 1 hora.

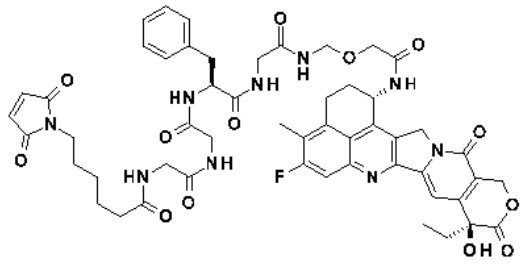
Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Después de incubar la solución en un baño de agua a 15ºC durante 10 minutos, sulfóxido de dimetilo (Sigma-Aldrich Co. LLC; 0.0209 mL) y una solución de sulfóxido de dimetilo (0.0315 mL; 5.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido en el anterior procedimiento 8 del Ejemplo 12 se le añadió a la misma y se incubó en un baño de agua a 15ºC durante 60 minutos para conjugar el enlazador fármaco al anticuerpo. A continuación, se añadió una solución acuosa (0.0050 mL) de NAC 100 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC) y se agitó mediante el uso de un rotador de tubo (MTR-103, fabricado por AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante otros 20 minutos a terminar la reacción del enlazador de fármaco.

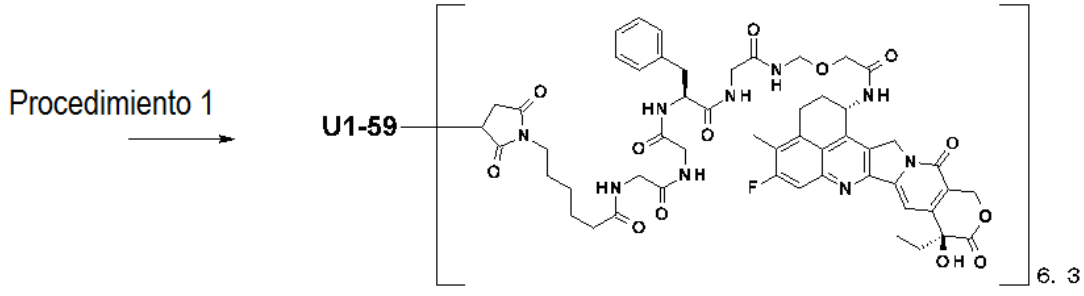
De acuerdo con los mismos procesos de purificación y caracterizaciones físico-químicas que en el Procedimiento 6 del Ejemplo 1, se obtuvieron los siguientes valores de características.

Concentración de anticuerpo: 1.46 mg/mL,

rendimiento de anticuerpo: 8.76 mg (88%), y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, $E_{D,\ 280}$ = 5178, $E_{D,\ 370}$ = 20217): 2.5; y número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo medido por Procedimiento común F (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, $E_{D,\ 280}$ = 5178): 2.9.

Ejemplo 15 Conjugado anticuerpo-fármaco (15)





Procedimiento 1: conjugado anticuerpo-fármaco (15)

Reducción del anticuerpo: U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 fue preparado para tener la concentración de anticuerpo de 10 mg/mL mediante la sustitución del medio con PBS6.0/EDTA usando el Procedimiento

común B y Procedimiento común C descritos en el Método de Producción 1. La solución (100 mL) se añadió a un matraz Erlenmeyer de policarbonato de 250 mL y se cargó con una solución acuosa 1 M de fosfato ácido dipotásico (1.70 mL) y después una solución acuosa de TCEP 10 mM (4.010 mL; 6.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente con agitación usando un agitador magnético. Después de confirmar que la solución tenía un pH de 7.0 +/- 0.1, se detuvo la agitación, y el enlace disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo se redujo por incubación a 37ºC durante 1 hora.

Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Después de enfriar la solución anterior a 15°C, una solución de DMSO (6.684 mL; 10.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM de compuesto obtenido en el anterior Procedimiento 8 del Ejemplo 12 se añadió gradualmente con agitación. La mezcla se agitó a 15ºC durante los primeros 30 minutos y, después de parar la agitación, se incubó durante 1 hora más para conjugar el enlazador fármaco al anticuerpo. A continuación, una solución acuosa (0.862 mL; 12.9 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió de NAC 100 mM con agitación y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos para terminar la reacción de enlazador de fármaco sin reaccionar.

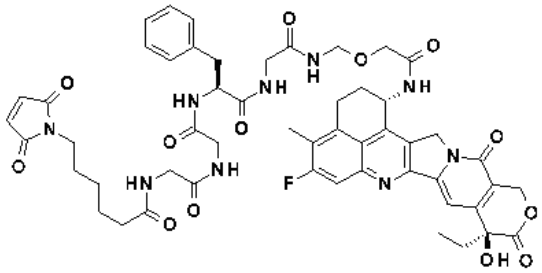
Purificación: Una solución en ácido acético acuoso

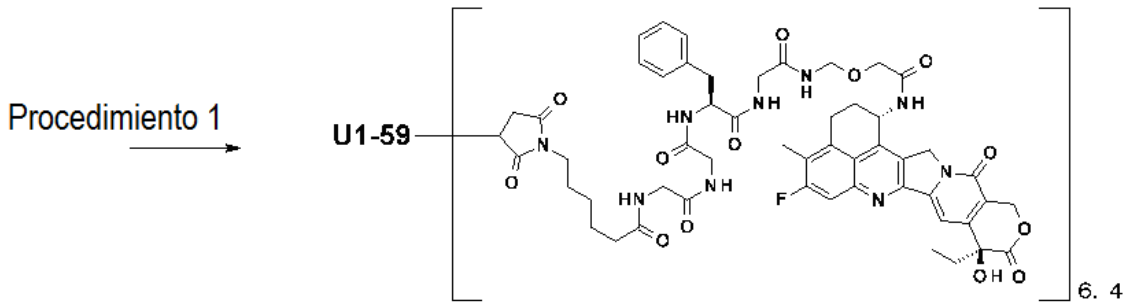
al 20% (aproximadamente 0.6 mL) y ABS (100 mL) se añadió gradualmente a la solución con agitación para ajustar el pH de la solución a 5.5 +/- 0.1. Esta solución se sometió a microfiltración (filtro de Millipore Corp. Millex-HV, 0.45 um, membrana de PVDF) para eliminar la materia blanquecina. Esta solución se sometió a purificación de ultrafiltración usando un aparato de ultrafiltración constituido por una membrana de ultrafiltración (Merck Japan, Ltd., Pellicon XL Cassette, Biomax 50 KDa), una bomba de tubo (Cole-Parmer International, E.U.A., bomba MasterFlex modelo 77521-40, cabezal de bomba modelo 7518-00), y un tubo (Cole-Parmer Internacional, U.S.A., tubo MasterFlex L/S16). Específicamente, mediante la adición gota a gota de ABS (un total de 1600 mL) como una solución amortiguadora para la purificación de la solución de reacción, mientras se llevaba a cabo la purificación de ultrafiltración, enlazadores de fármaco no conjugados y otros reactivos de bajo peso molecular se retiraron mientras que la solución amortiguadora se sustituyó con ABS y además la solución se concentró. La solución purificada obtenida se sometió a microfiltración (0.22 um (filtro Millipore Corp. Millex-GV, membrana de PVDF) para producir 37.5 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo titulado-fármaco.

Concentración de anticuerpo: 26.5 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 993.0 mg (90%), número promedio de

moléculas de fármaco conjugadas (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usaron $E_{D,\ 280}$ = 5178 y $E_{D,\ 370}$ = 20217): 6.3, y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común F (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usó $E_{D,\ 280}$ = 5178): 7.3.

Ejemplo 16a conjugado anticuerpo-fármaco (16a)





Procedimiento 1: conjugado anticuerpo-fármaco (16a)

Reducción del anticuerpo: U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 fue preparado para tener la concentración de anticuerpo de 10 mg/mL mediante la sustitución del medio con PBS6.0/EDTA usando el Procedimiento B común y Procedimiento común C descritos en el Método de

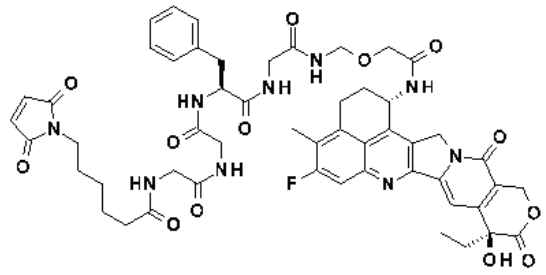
Producción 1. La solución (15 mL) se añadió a un recipiente de tereftalato de polietileno de 50 mL y se cargó con una solución acuosa 1 M de fosfato ácido dipotásico (0.255 mL) y después una solución acuosa de TCEP 10 mM (0.601 mL; 6.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente con agitación usando un agitador magnético. Después de confirmar que la solución tenía un pH de 7.0 +/- 0.1, el enlace disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo se redujo por incubación a 37ºC durante 2 horas.

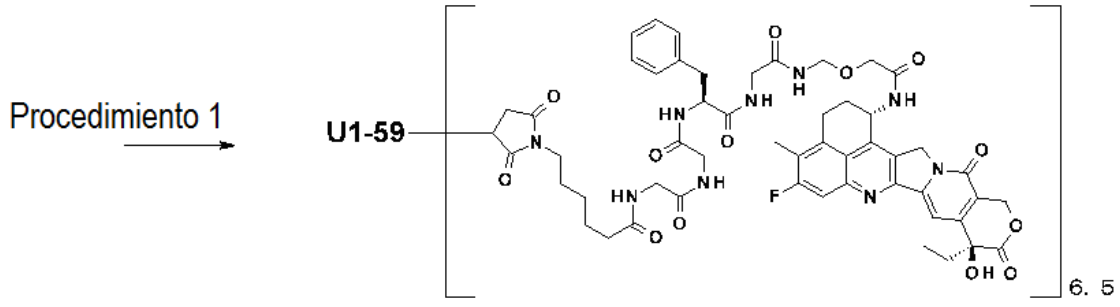
Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Después de enfriar la solución anterior a 15°C, una solución de DMSO (1.002 mL; 10.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM de compuesto obtenido en el anterior Procedimiento 8 del Ejemplo 12 se añadió gradualmente con agitación. La mezcla se agitó a 15ºC durante 30 minutos para conjugar el enlazador fármaco al anticuerpo. A continuación, una solución acuosa (0.129 mL; 12.9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadió con agitación y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos para terminar la reacción de enlazador de fármaco sin reaccionar. De acuerdo con los mismos procesos de purificación y caracterizaciones físico-químicas que en el Procedimiento 6 del Ejemplo 1, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpo: 2.36 mg/mL,

rendimiento de anticuerpo: 140 mg (59.5 mL) (94%), número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usaron $E_{D,\ 280}$ = 5178 y $E_{D,\ 370}$ = 20217): 6.4, y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común F (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usó $E_{D,\ 280}$ = 5178): 7.7.

Ejemplo 16b conjugado anticuerpo-fármaco (16b)





Reducción del anticuerpo: U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 fue preparado para tener la concentración de anticuerpo de 10 mg/mL mediante la sustitución del medio con PBS6.0/EDTA usando el Procedimiento común B y procedimiento común C descrito en el Método de

Producción 1. La solución (900 mL) se añadió a un matraz Erlenmeyer de policarbonato de 2000 mL y se cargó con una solución acuosa 1 M de fosfato ácido dipotásico (15.3 mL) y después una solución acuosa de TCEP 10 mM (36.1 mL; 6.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente con agitación usando un agitador magnético. Después de confirmar que la solución tenía un pH de 7.0 +/- 0.1, se detuvo la agitación, y el enlace disulfuro en la parte de bisagra en el anticuerpo se redujo por incubación a 37ºC durante 2 horas.

Conjugación entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco: Después de enfriar la solución anterior a 15°C, una solución de DMSO (60.16 mL; 10.0 equivalentes por molécula de anticuerpo) que contenía 10 mM del compuesto obtenido de Procedimiento 8 del Ejemplo 12 se añadió gradualmente con agitación. La mezcla se agitó a 15ºC durante 30 minutos para conjugar el enlazador de fármaco al anticuerpo. A continuación, una solución acuosa (7.76 mL; 12.9 equivalentes por molécula de anticuerpo) de NAC 100 mM se añadió con agitación y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos para terminar la reacción de enlazador de fármaco sin reaccionar.

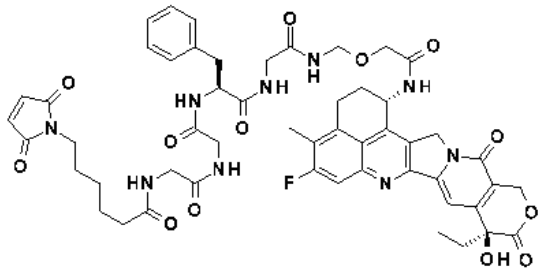
Purificación: Una acuosa solución de ácido acético al 20% (aproximadamente 5 mL) y ABS (1000 mL) se añadió gradualmente a la solución con agitación para ajustar el pH

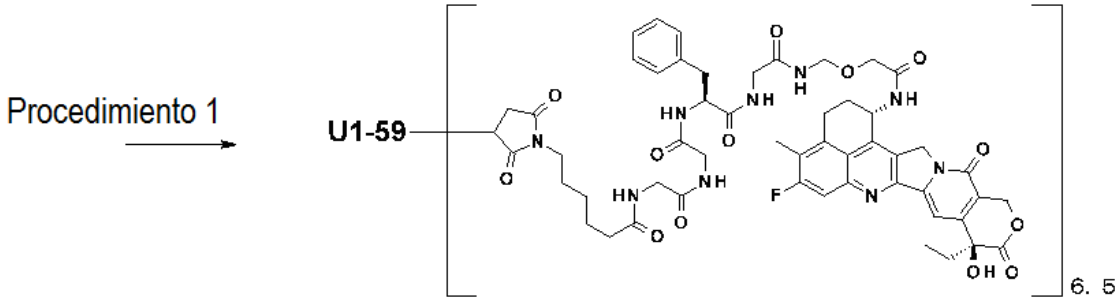
de la solución a 5.5 +/- 0.1. Esta solución se sometió a microfiltración (Millipore Corp. Stericup, 0.45 um, membrana de PVDF) para eliminar la materia blanquecina. Esta solución se sometió a purificación de ultrafiltración usando un aparato de ultrafiltración constituido por una membrana de ultrafiltración (Merck Japan, Ltd., mini casete Pellicon 2, Ultracel 30 KDa, 0.1 m^2), una bomba de tubo (Cole-Parmer International, E.U.A., bomba MasterFlex modelo 7528-20, cabezal de bomba modelo 77800-62) y un tubo (Cole-Parmer International, E.U.A., tubos Masterflex L/S24 y 25). Específicamente, mediante la adición gota a gota de ABS (un total de 16 L) como una solución amortiguadora para la purificación de la solución de reacción, mientras se llevaba a cabo la purificación de ultrafiltración, enlazadores de fármaco no conjugados y otros reactivos de bajo peso molecular se retiraron mientras la solución amortiguadora se sustituyó con ABS y además la solución se concentró para producir aproximadamente 500 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo titulado-fármaco.

Concentración de anticuerpo: 19.66 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 9.830 mg (109%), y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por

molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usaron $E_{D,\ 280}$ = 5178 y $E_{D,\ 370}$ = 20217): 6.5.

Ejemplo 16c Conjugado anticuerpo-fármaco (16c)





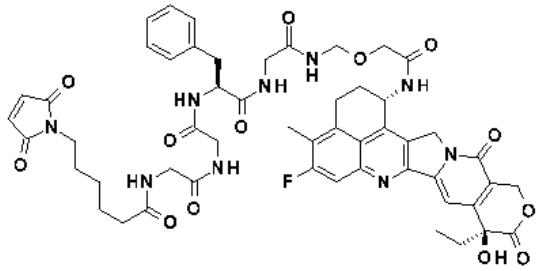
6.5

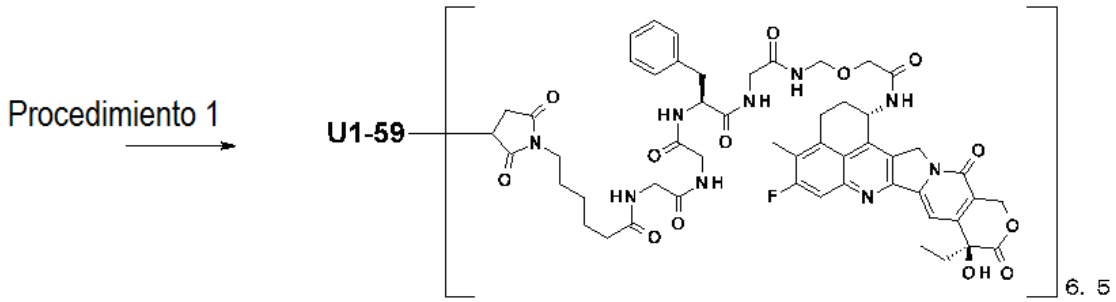
Mediante el uso de U1-59 producido en el Ejemplo de Referencia 1 y del compuesto obtenido en anterior Procedimiento 8 del Ejemplo 12, se obtuvo el conjugado anticuerpo titulado-fármaco de la misma manera que en el Ejemplo 16b.

Concentración de anticuerpo: 16.21 mg/mL, rendimiento de anticuerpo: 9.726 mg (600 mL, 108%), y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E (como coeficiente de absorción

molar del enlazador de fármaco, se usaron $E_{D,\ 280}$ = 5178 y $E_{D,\ 370}$ = 20217): 6.5.

Ejemplo 16d Conjugado anticuerpo-fármaco (16d)





Los conjugados anticuerpo-fármaco (16a) (16b), y (16c) producidos en los Ejemplos 16a, 16b, y 16c, respectivamente, se mezclaron (un total de aproximadamente 18 g) y sometieron más a ultrafiltración de la misma manera que en el Ejemplo 16b (se usaron 11 L de ABS). La solución purificada obtenida se sometió a microfiltración (Millipore Corp. Stericup, 0.45 um y 0.22 um, membrana de PVDF) para producir 745 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo titulado-fármaco. Mediante la adición de otros 110 mL de ABS, se obtuvieron 855 mL de una solución que contenía el conjugado anticuerpo titulado-fármaco.

Concentración de anticuerpo: 20.0 mg/mL,

rendimiento de anticuerpo: 17.1 g (94%), número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común E (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usaron $E_{D, 280}$ = 5178 y $E_{D, 370}$ = 20217): 6.5, y número promedio de moléculas de conjugado de fármaco (n) por molécula de anticuerpo medido por el Procedimiento común F (como coeficiente de absorción molar del enlazador de fármaco, se usaron $E_{D, 280}$ = 5178): 7.8.

Ejemplo de prueba 1 afinidad de unión a HER3 de conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con U1-59

Método:

Una línea celular de cáncer de mama humano HCC1569 (CRL-2330) de la ATCC se cultivó en un medio RPMI1640 (adquirido de Invitrogen Corp., que contenía 10% de albúmina de suero bovino (fabricado por Invitrogen Corp.) y 2 mM de L-glutamina (fabricada por Invitrogen Corp.)). Las células se disociaron de la placa de cultivo usando ACCUTASE (R) SOLUTION (Millipore Corp., SCR005) o EDTA (5 mM, amortiguador de fosfato salino (PBS, cloruro de sodio 137 mM, cloruro de potasio 2.7 mM, fosfato diácido de potasio 1.47 mM, y fosfato diácido disódico 10.5 mM)), y el número de células vivas se midió mediante tratamiento con azul de tripano. Los mismos números de células suspendidas en una célula activada por fluorescencia (FACS) de amortiguador (PBS que contenía 3% de

FBS y azida de sodio al 0.004%) se inocularon en placas de 96 pocillos de fondo en U, y las células se precipitaron por centrifugación y se suspendieron en 100 uL de una dilución enfriada con hielo de anticuerpo o conjugado anticuerpo-fármaco o amortiguador FACS.

El anticuerpo o cada conjugado anticuerpo-fármaco se diluyó en serie en una proporción de 1/3 con un amortiguador de FACS y se ajustó a 30 ug/mL a 5 ng/mL (200 nM a 0.03 nM). Las células tratadas con un amortiguador de FACS sin la adición de un anticuerpo primario se usaron como grupo de control.

U1-59, el conjugado anticuerpo-fármaco (3), el conjugado anticuerpo-fármaco (10), o el conjugado anticuerpo-fármaco (13) se evaluó como el anticuerpo o los conjugados de anticuerpo-fármaco.

Se hicieron reaccionar las células de cada grupo con una dilución de anticuerpo primario durante 45 minutos en hielo y después se lavaron con un amortiguador de FACS. Además, 100 uL de un amortiguador FACS o una solución de reacción de un anticuerpo secundario diluida 1/100 (ficoeritrina (PE)- anticuerpo anti humano acoplado, Dianova GmbH # 709-116-149) se añadió a la misma. Las células se trataron durante 45 minutos en hielo en la oscuridad y después se lavaron con un amortiguador de FACS, y las células muertas se excluyeron usando un amortiguador FACS o un

amortiguador FACS suplementado con 7-aminoactinomicina D (7AAD, Sigma-Aldrich Co. LLC, # A9400, 1.1 ug/mL).

Las señales de fluorescencia de las células vivas fueron evaluadas usando citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences/Accuri (R) Cytometers Inc., número de serie 1424) y software Cflow (muestreador Cflow versión 1.0.264.13).

Para la corrección de las señales derivadas de PE y 7-AAD, se evaluaron las señales de fluorescencia de U1-59 (30 ug/mL) y las células teñidas con el anticuerpo secundario marcado con PE o 7-AAD.

Para cuantificar las señales de fluorescencia específicas de U1-59 en las células, se usaron los valores obtenidos por la resta de las señales FL-2 de las células tratadas sólo con el anticuerpo secundario o 7-AAD. La afinidad de unión de equilibrio (KD) y la fuerza de unión máxima (Bmax) se calcularon usando software GraphPad Prism (versión 5.04 para Windows (R) (unión específica de un sitio)).

Los resultados se muestran en la Figura 3 y en la Tabla 1. La Figura 3 y la Tabla 1 muestran la intensidad de fluorescencia media de HCC1569 tratado con diluciones en serie de U1-59 o cada conjugado anticuerpo-fármaco. La afinidad de unión en equilibrio KD y la fuerza de unión máxima Bmax se calcularon usando software GraphPad Prism.

Tabla 1

	U1-59	Conjugado anticuerpo-fármaco (3)	Conjugado anticuerpo-fármaco (10)	Conjugado anticuerpo-fármaco (13)
Bmax	31830	28981	28841	28415
Kd (nM)	4.672	1.653	1.554	2.757

El conjugado anticuerpo-fármaco (3) o el conjugado anticuerpo-fármaco (10) exhibieron afinidad de unión promedio KD para HCC-1569 equivalente a KD del anticuerpo anti-HER3 no conjugado U1-59. El conjugado anticuerpo-fármaco (13) también mostró afinidad de unión promedio KD equivalente a KD del anticuerpo anti-HER3 no conjugado U1-59 (2.7 nM vs. 1.6 nM). Los valores KD de los diferentes conjugados anticuerpo-fármaco sugirieron que los procesos de conjugación anticuerpo-fármaco no afectan significativamente la afinidad de unión de U1-59.

Ejemplo de Ensayo 2 Inhibición de la señal de HER3 por conjugado anticuerpo-fármaco anti-HER3

Método:

Una línea celular de cáncer de pulmón A549 humano (CRS-300114) de Cell Lines Service se disoció por tratamiento con tripsina, y 50,000 células vivas se inocularon a 3 mL de DMEM/F12 (Invitrogen Corp., # 21331-020) + 10% de FBS

(Invitrogen Corp., # 10270-106) en cada uno de 6 pocillos. Después de cultivar las células durante 3 días, el medio se reemplazó con 2 mL de un medio fresco.

El anticuerpo o cada conjugado anticuerpo-fármaco se añadió directamente a 2 mL de un medio en cada uno de los 6 pocillos de manera que la concentración final fuera de 10 ug/mL (se añadieron 20 ul de una solución madre de 1 ug/uL de anticuerpo o conjugado anticuerpo-fármaco).

U1-59, el conjugado anticuerpo-fármaco (3), el conjugado anticuerpo-fármaco (10), o el conjugado anticuerpo-fármaco (13) se usó como el anticuerpo o el conjugado anticuerpo-fármaco. Un grupo no tratado se usó como control.

Las células se cultivaron durante 2 días, se lavaron una vez con PBS, y se trataron con 100 uL de un amortiguador enfriado con hielo (50 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), pH 7.5, cloruro de sodio 150 mM, 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 12.5% de glicerina, 1% de Triton X-100, y 10 mM de pirofosfato de sodio tetrabásico suplementado con inhibidores de proteinasa (Roche Diagnostics, Inc., # 11697 498 001), fluoruro de sodio 10 mM, vanadato de sodio 1 mM, fenil-metano-sulfonil-fluoruro 1 mM (PMSF), y 10 ug/mL de aprotinina (Sigma-Aldrich Co. LLC, A1153)) durante 30 minutos a 4ºC para la lisis. El lisado se lavó durante 20 minutos a 13000 rpm a 4ºC, y el sobrenadante

se usó en la proteína de medición de concentración por el ensayo de Bradford (Sigma-Aldrich Co. LLC, # B6916, el estándar BSA fue de Thermo Fisher Scientific Inc., # 23209). Para cada muestra (cantidad de proteínas: 120 ug), se añadió una concentración de 4 veces de un amortiguador de LDS (Invitrogen Corp., que contenía DTT (concentración final: 166.67 mM)), y su volumen se ajustó finalmente a 40 uL con agua. La muestra se hirvió durante 10 minutos a 70ºC y se añadió a los pocillos de gel NuPage Mini Bis-Tris (4% -12%, 1.5 mm de espesor, 10 ranuras/gel, Invitrogen Corp.). Como patrones de proteína, 7.5 uL de escalera afilada Novex (R) (Invitrogen Corp. P/N 57318) fueron añadidos. La muestra se sometió a electroforesis durante 70 minutos a 175 V con 1 x de amortiguador de ejecución MOPS (Invitrogen Corp.) que contenía antioxidante NuPage (Invitrogen Corp., NP0005, Lote 1356629 añadido a la cámara interna. Las proteínas separadas por electroforesis en gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare Life Sciences) que tenía un tamaño de poro de 0.45 um usando amortiguador de transferencia NuPage (Invitrogen Corp.) que contenía 10% de metanol y antioxidante NuPage (Invitrogen Corp., NP0005, Lote 1356629, dilución 1: 1000). Las proteínas se transfirieron durante 80 minutos en un volumen constante de 30 V.

Se cortó la membrana de transferencia, se separó en fracciones de 100 kDa o mayores y 30 a 100 kDa, se lavó dos

veces con PBS que contenía 0.1% de Tween-20, y se bloqueó por agitación durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo Odyssey (LI-COR, Inc., # 927-40000). La membrana de transferencia de este modo bloqueada se trató durante la noche a 4ºC con una solución de un anticuerpo primario diluida (mezcla de solución de bloqueo Odyssey y PBS en cantidades iguales).

Un anticuerpo anti-HER3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., SC-81455, dilución 1:500) y un anticuerpo anti-HER fosforilado (Cell Signaling Technology, Inc., # 4791, 1:1000) se usaron como el anticuerpo primario, y un anticuerpo anti-actina (Neomarkers, #MS1295, dilución 1:3333) se usó como un control de electroforesis.

La membrana de transferencia se lavó tres veces (5 minutos para cada uno) con PBS que contenía 0.1% de Tween-20 y se hizo reaccionar con una dilución que contenía un anticuerpo secundario (mezcla de solución de bloqueo Odyssey y PBS en cantidades iguales) durante 1 hora a temperatura ambiente en una cuarto oscuro.

Se usó IRDye 680RD anti-ratón de cabra (LI-COR, Inc., # 926-68070, dilución 1:25000) o tinte IR de anti-conejo de cabra 800CW (LI-COR, Inc., # 926-32211, dilución 1:10000) como el anticuerpo secundario. La membrana de transferencia se lavó tres veces (6 minutos para cada uno) con PBS que contenía Tween-20 0.1%, seguida por detección de

la señal usando formador de imágenes de infrarrojos Odyssey (LI-COR, Inc.).

Los resultados se muestran en la Figura 4. Las células A549 se cultivaron durante 2 días con U1-59 o diferentes conjugados anticuerpo-fármaco. HER3 o HER3 fosforilado se evaluó por Western Blot. pan-Actina se detectó como un control de electroforesis.

Como resultado del cultivo de A549 durante 2 días con 10 ug/mL de U1-59 o conjugado anticuerpo-fármaco, la fosforilación de HER3 se redujo en comparación con las células no tratadas. Esta reducción en la fosforilación de HER3 fue equivalente entre U1-59 y el conjugado anticuerpo-fármaco, lo que sugiere que una pluralidad de procesos de conjugación de fármaco no afectó una función de inhibición de señales derivada de HER3 U1-59.

Cuando A549 se trató con U1-59 o cada conjugado anticuerpo-fármaco durante 2 días, la reducción en la expresión de HER3 se observó también en comparación con las células no tratadas. El grado de esta reducción en la expresión era equivalente entre U1-59 y el conjugado anticuerpo-fármaco. Esto sugiere que una pluralidad de procesos de conjugación de fármaco no afectó la internalización mediada por U1-59 (ver Ejemplo de prueba con respecto a la internalización) y regulación a la baja inducida por U1-59 (véase el Ejemplo de prueba respecto a la

inhibición de la señal).

Ejemplo de prueba 3 Reducción de la expresión de HER3 en la superficie celular por U1-59 y el conjugado anticuerpo-fármaco

Método:

La internalización de HER3 por U1-59 y cada conjugado anticuerpo-fármaco se evaluó mediante citometría de flujo. 70,000 células vivas de HCC1569 (de ATCC) se suspendieron en 0.5 mL de RPMI 1640 (Invitrogen Corp., # 31870-025) (que contenía 10% de SFB (Invitrogen Corp., # 10270-106 o PAN Biotech GmbH, # 1505-P131304) y glutamina 2 mM (Invitrogen Corp., # 25030-024)) y se inocularon a cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Las células se cultivaron durante 4 días, y el medio se reemplazó con 0.5 mL de un medio fresco antes del inicio de la prueba de internalización. Cinco microgramos del anticuerpo o cada conjugado anticuerpo-fármaco se añadieron a 0.5 mL en cada pocillo de la placa de 24 pocillos de manera que la concentración final fuera de 10 ug/mL. Las células se cultivaron durante 1 hora a 37ºC en presencia del anticuerpo o el conjugado anticuerpo-fármaco. U1-59, el conjugado anticuerpo-fármaco (3), el conjugado anticuerpo-fármaco (10), o el conjugado anticuerpo-fármaco (13) se usó como el anticuerpo o el conjugado anticuerpo-fármaco. Las células como control positivo o control negativo no se trataron en

algunos procedimientos.

Para análisis de citometría de flujo, las células se lavaron una vez con PBS y se disociaron de la placa usando mM de EDTA 5 (100 uL/pocillo) disuelto en ACCUTASE (R) SOLUTION (Millipore Corp., SCR005) o PBS. Las células se suspendieron en 200 uL de un amortiguador de FACS enfriado con hielo (PBS que contenía 3% de FBS y azida de sodio al 0.004%), luego se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U, y se dejaron en hielo. Las células se lavaron una vez con un amortiguador de FACS. Para cada muestra, se añadieron 100 uL de U1-59 (10 ug/mL) diluido con un amortiguador de FACS o solamente un amortiguador FACS. Las células se trataron durante 45 minutos con agitación en hielo y después se lavaron con un amortiguador de FACS, y 100 uL de un anticuerpo anti-humano de anticuerpo secundario marcado con PE (Dianova GmbH, 709-116-149) disuelto en una proporción de 1:100 en un amortiguador de FACS, o solamente un amortiguador de FACS, se añadió a cada pocillo. Las células se trataron durante 45 minutos en un cuarto oscuro con agitación en hielo. Las células se lavaron con un amortiguador de FACS y se trataron con un amortiguador de FACS o un amortiguador de FACS que contenía 7AAD (Sigma-Aldrich Co. LLC, A9400. 1.1 ug a 1.25 ug/mL) para la tinción de las células muertas. Las señales de fluorescencia de las células vivas se midieron usando citómetro de flujo Accuri C6

. Para la corrección de las señales de PE y 7-AAD, se usaron U1-59 (10 ug/mL) y las células teñidas con sólo el anticuerpo secundario marcado con PE o 7-AAD.

Para cuantificar las señales específicas de HER3, los valores de las células teñidas con sólo el anticuerpo secundario o 7-AAD se restaron de los valores FL-2 de las células teñidas con el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario, y más 7-AAD.

Cuando las señales FL-2 de las células no tratadas con U1-59 o el conjugado anticuerpo-fármaco (sin internalización) se definieron como el valor máximo, se calculó la reducción de HER3 (internalización) en la superficie de las células tratadas con U1-59 o el conjugado anticuerpo-fármaco a 37ºC.

Un valor medio calculado a partir de 2 a 3 pocillos se usó para el control positivo (sin tratamiento a 37ºC) y el control negativo (sin la adición del anticuerpo primario), y se cuantificó la internalización en los pocillos de cada grupo de tratamiento.

Los resultados se muestran en la Figura 5. Este diagrama muestra un valor medio de reducción en la expresión HER3 en la superficie de las células HCC1569 tratadas con U1-59 o cada conjugado anticuerpo-fármaco (37°C, 1 hr). La expresión de HER3 de un grupo sin la adición de U1-59 o el conjugado anticuerpo-fármaco se define como el valor máximo

de la expresión de HER3 en las células. Los valores de los grupos tratados con sólo el anticuerpo secundario o 7-AAD se usaron como fondos. Los grupos tratados con U1-59 o cada conjugado anticuerpo-fármaco durante 1 hora se usaron como grupos de tratamiento. Los valores de FL-2 fueron casi los mismos entre U1-59 y el conjugado anticuerpo-fármaco.

La reducción de la fluorescencia generada causada por el tratamiento de HCC-1569 con U1-59 o cada conjugado anticuerpo-fármaco indica reducción en la expresión de HER3. En comparación con una reducción de aproximadamente 50% en la expresión de HER3 por U1-59, la reducción en la expresión de HER3 por cada conjugado anticuerpo-fármaco también exhibió un valor equivalente o superior a ella, lo que sugiere que los procesos de conjugación a fármaco del anticuerpo no afectaron negativamente la función del internalización a HER3 del anticuerpo.

Ejemplo de prueba 4 Inhibición de la señal mitogénica o de supervivencia *in vitro* por conjugado anticuerpo-fármaco HER3 en la línea celular de cáncer humano

Método:

La actividad inhibidora de cada conjugado anticuerpo-fármaco HER3 contra señales mitogénicas o de supervivencia se midió en presencia de 10% de FBS. El crecimiento y desarrollo de las células se evaluó mediante la medición de la actividad de trifosfato de adenosina (ATP) en

los grupos tratados con conjugados no tratados y anticuerpo-fármaco. Líneas celulares de cáncer adherentes (línea celular de cáncer de mama humano HCC1569 (CRL-2330) a partir de ATCC, línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-453 (CLB-22) a partir de ATCC, y línea celular de cáncer colorrectal humano HT-29 (CPQ-57) de ProQinase GmbH) se cultivaron en sistemas de cultivo 2D, y las líneas celulares de cáncer flotantes (no adherentes) (línea celular de melanoma humano A375 (CRL-1619) a partir de ATCC y línea celular de cáncer de pulmón humano A549 (CRS-300114) a partir de Cell Line Service) se cultivaron en sistemas de cultivo 3D.

Tratamiento de células adherentes

Cada línea celular de cáncer se suspendió en 100 uL de cada medio a una densidad baja (500 células/pocillo para HT-29, 800 células/pocillo para MDA-MB-453, y 1000 células/pocillo para HCC-1569) y se inoculó a placa inferior óptica de 96 micropocillos (Thermo Fisher Scientific Inc./Nunc, # 165306, pared blanca y fondo transparente). En cuanto a HCC-1569 y MDA-MB-453, las células se cultivaron en un medio RPMI1640 (Invitrogen Corp., 31870-025) que contenía 10% de SFB (Invitrogen Corp., 10270-106) y glutamina 2 mM (Invitrogen Corp., 25030-024). En cuanto a HT-29, las células se cultivaron en medio 5A de McCoy una (Invitrogen Corp., 26600-023) que contenía 10% de SFB (Invitrogen Corp.,

10270-106) y glutamina 2 mM (Invitrogen Corp., 25030-024). Los pozos de borde de cada placa se llenaron con 100 uL de un medio.

Las células se cultivaron durante 3 días, y el medio se reemplazó con 95 uL de un medio fresco antes del tratamiento con conjugado anticuerpo-fármaco.

Se usaron el conjugado anticuerpo-fármaco (3), el conjugado anticuerpo-fármaco (10), y el conjugado anticuerpo-fármaco (13). Un grupo no tratado se fijó como control para medir el crecimiento celular normal.

Mediante la adición de 5 ul de cada conjugado anticuerpo-fármaco concentrado en una concentración de 20 veces a 95 uL de un medio de cultivo (10% FBS) contenido en cada pocillo de la placa de 96 pocillos, se estableció la concentración final. Sólo se añadieron 5 uL de un medio a cada pocillo de control. El ensayo se realizó por triplicado por muestra.

Con el fin de calcular la concentración del conjugado anticuerpo-fármaco en el que el crecimiento o la supervivencia de las células se redujo en un 50%, las concentraciones del conjugado anticuerpo-fármaco se prepararon por diluciones 4 veces (10 ug/mL a 0.15 ng/mL o 40 ug/mL a 0.15 ng/mL), y las células se trataron con estas concentraciones del conjugado anticuerpo-fármaco y se compararon con el grupo no tratado en términos de actividad

ATP. La evaluación se realizó por cultivo de 5 días de HT-29 y cultivo de 7 días de HCC-1569 y MDA-MB-453 así complementado con el conjugado anticuerpo-fármaco. Se usó el ensayo de viabilidad de células luminiscente CellTiter-Glo (R) para evaluar la actividad del conjugado anticuerpo-fármaco. Este método implica la medición de las células vivas que tienen actividad metabólica sobre la base de la actividad de ATP y, finalmente, la estimación del número de células vivas y empleó CellTiter-Glo (R) Luminiscent Cell (Promega K.K., G7573) en forma de un kit.

Cien microlitros de reactivo CellTiter-Glo (R) se añadieron a cada pocillo de la placa de 96 pocillos y se almacenó durante 25 minutos a 65 minutos a temperatura ambiente en un cuarto oscuro antes de la medición usando Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter (programa luminiscencia, tiempo de medición: 0.5 s). Los pocillos que contenían sólo una solución de cultivo sin la inoculación de las células se ensayaron como espacios en blanco. Con el fin de medir la reducción en la actividad de ATP, un valor medio de luminiscencia de 3 pocillos se calculó en cada condición (Microsoft Excel 2010). Con el fin de eliminar las señales de células independientes, el valor medio de luminiscencia de los espacios en blanco se restó del valor medio de la luminiscencia de las células tratadas con el conjugado anticuerpo-fármaco (Microsoft Excel 2010). La tasa de

reducción (%) en la luminiscencia se calculó por comparación con las células del grupo no tratado (Microsoft Excel 2010). Este valor se interpreta como la tasa de inhibición (%) del crecimiento celular o la supervivencia.

Tratamiento de células flotantes

Ya que A375 y A549 tienen una tasa de crecimiento más rápida que la de otras líneas de células, la medición de crecimiento se llevó a cabo en sistemas de cultivo 3D no adherentes.

Cada línea celular de cáncer se suspendió en 75 uL de cada medio a una densidad baja (500 células/pocillo para A375 y 1500 células/pocillo para A549) y se inocularon a una placa de cultivo 3D no adherente de fondo redondo de 96 pocillos (Prime Surface 96U; Sumitomo Bakelite Co., Ltd.; nº de pedido MS-9096U). En cuanto a A375, las células se cultivaron en un medio DMEM (Invitrogen Corp., 41965-039) que contenía 10% de SFB (Invitrogen Corp., 10270-106) y glutamina 2 mM (Invitrogen Corp., 25.030-024). En cuanto a A549, las células se cultivaron en un medio DMEM/F12 (Invitrogen Corp., 21331-020) que contenía 10% de SFB (Invitrogen Corp., 10270-106) y glutamina 2 mM (Invitrogen Corp., 25.030-024). Los pozos de borde de cada placa se llenaron con 150 uL de un medio. Las células se cultivaron durante 3 días, y la dosis final se ajustó a 142.5 uL o 150 uL mediante la adición de 67.5 ó 75 uL de un medio fresco antes de la adición de

conjugado anticuerpo-fármaco. Se usaron el conjugado anticuerpo-fármaco (3), el conjugado anticuerpo-fármaco (10), y el conjugado anticuerpo-fármaco (13). Un grupo no tratado se fijó como control para medir el crecimiento celular normal.

Mediante la adición de 7.5 o 8 uL de cada conjugado anticuerpo-fármaco concentrado en una concentración de 20 veces a 142.5 ó 150 uL de un medio de cultivo (10% FBS) contenido en cada pocillo de la placa de 96 pocillos, se estableció la concentración final. La dosis final se estableció en 150 ul o 158 ul. Sólo 7.5 o 8 uL de un medio se añadieron a cada pocillo de control. El ensayo se realizó por triplicado por muestra.

Con el fin de calcular la concentración del conjugado anticuerpo-fármaco en el que el crecimiento o la supervivencia de las células se redujo en un 50%, las concentraciones del conjugado anticuerpo-fármaco se prepararon por diluciones 4 veces (10 ug/mL a 0.15 ng/mL o 40 ug/mL a 0.15 ng/mL), y las células se trataron con estas concentraciones del conjugado anticuerpo-fármaco y se compararon con el grupo no tratado en términos de actividad ATP. La evaluación se llevó a cabo mediante el cultivo de 7 días de las células así suplementadas con el conjugado anticuerpo-fármaco. Se usó el ensayo de viabilidad de células luminiscente CellTiter-Glo (R) para evaluar la

actividad del conjugado anticuerpo-fármaco. Este método implica la medición de las células vivas que tienen actividad metabólica sobre la base de la actividad de ATP y, finalmente, la estimación del número de células vivas y empleó CellTiter-Glo (R) Luminiscent Cell (Promega K.K., G7573) en forma de un kit.

Antes de la medición, 50 uL del medio se retiraron de cada pocillo, y se añadió 100 uL de reactivo CellTiter-Glo (R) a cada pocillo de la placa de 96 pocillos y se almacenó durante 30 minutos a 55 minutos a temperatura ambiente en un cuarto oscuro antes de la medición usando Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter (luminiscencia programa, tiempo de medición: 0.5 s). Antes de la medición, 180 uL se recogió de cada pocillo y se transfirió a la placa blanca medible de fondo óptico de 96 micropocillos. Los pocillos que contenían sólo una solución de cultivo sin la inoculación de las células se ensayaron como espacios en blanco. El método para calcular la concentración del conjugado anticuerpo-fármaco en el que el crecimiento o la supervivencia de las células fueron inhibidos por 50% se describe en el método de evaluación en cuanto a las células adherentes.

Los resultados sobre las líneas de cáncer de mama humano HCC1569 y MDA-MB453 se muestran en las Figuras 6A - 7B, respectivamente. Los resultados sobre la línea de melanoma humano A375 se muestran en las Figuras 8A-8B. Los

resultados sobre la línea de cáncer colorrectal humano HT29 se muestran en las Figuras 9A-9B. Los resultados sobre la línea de cáncer de pulmón humano A549 se muestran en las Figuras 10A-10B. Una de cada figura muestra celular crecimiento o la supervivencia derivado del conjugado anticuerpo-fármaco en presencia de 10% de FBS. La ordenada representa un valor que indica la actividad de luminiscencia ATP de cada muestra. La abscisa representa la concentración de cada conjugado anticuerpo-fármaco. Los datos se indican por media +/- desviación estándar de triplicados. B de cada figura muestra el porcentaje de reducción en la luminiscencia causada por el tratamiento conjugado anticuerpo-fármaco cuando la luminiscencia de un grupo no tratado se definió como 100%.

Se añadieron tres tipos de conjugados anticuerpo-fármaco a diversas líneas celulares de cáncer humano en presencia de 10% de FBS y se evaluaron para el crecimiento *in vitro* en los sistemas de 2D o 3D. La tasa de inhibición del crecimiento celular o el desarrollo en el grupo no tratado o por cada conjugado anticuerpo-fármaco se calculó a partir del ensayo CellTiter-Glo (R) de la actividad ATP. En la evaluación de la actividad ATP, estos conjugados anticuerpo-fármaco inhibieron fuertemente el crecimiento celular o la supervivencia de dos tipos de líneas de células de cáncer de mama (HCC-1569 y MDA-MB-453) y un tipo de línea de melanoma

humano (A375).

La adición de cada conjugado anticuerpo-fármaco y el cultivo (en presencia de 10% de FBS) durante 7 días reduce la actividad de ATP por 55 a 75% en HCC1569, por 60 a 83% en MDA-MB-453, y por 60 a 70% en A375. La actividad inhibidora del conjugado anticuerpo-fármaco contra el crecimiento celular o la supervivencia no fue fuerte en la línea de cáncer colorrectal humano HT-29 y la línea A549 de cáncer de pulmón humano en comparación con las líneas de cáncer de mama humano y melanoma humano. En HCC-1569 y MDA-MB-453, el conjugado anticuerpo-fármaco (10) exhibió una fuerte actividad inhibidora, que no difiere en gran medida de la actividad inhibidora del conjugado anticuerpo-fármaco (3) *in vitro*. Por el contrario, en las dos líneas de cáncer de mama humano, el conjugado anticuerpo-fármaco (13) exhibió una baja actividad y requiere una concentración de 15 nM para alcanzar una inhibición del 50% del crecimiento celular o la supervivencia, aunque el conjugado anticuerpo-fármaco (3) o el conjugado anticuerpo-fármaco (10) logra esta inhibición a 1 nM o más bajos. En la línea de melanoma humano en comparación con las líneas de cáncer de mama humano, la actividad del conjugado anticuerpo-fármaco (13) fue equivalente a la del conjugado anticuerpo-fármaco (3) o el conjugado anticuerpo-fármaco (10).

Todos los conjugados anticuerpo-fármaco soportaron

una tasa máxima de inhibición del orden de 61-68%. Los conjugados anticuerpo-fármaco consiguen una inhibición del 50% de la actividad ATP a una concentración de 1 a 4 nM.

Además de la prueba anterior, la actividad inhibidora del conjugado anticuerpo-fármaco (13) contra el crecimiento celular o supervivencia de una línea celular de cáncer de ovario humano OVCAR-8 también se confirmó *in vitro* (datos no mostrados).

Ejemplo de prueba 5 Comparación de la tasa de inhibición del crecimiento o supervivencia *in vitro* de células de la línea celular de cáncer humano en función del número de moléculas de fármaco (altas o medias) cargadas en el conjugado anticuerpo-fármaco

Método:

Se evaluaron conjugados de anticuerpo-fármaco que difieren en el número de moléculas de fármaco cargado para la actividad inhibidora *in vitro* contra el crecimiento o la supervivencia celular. La alta carga de fármaco representa el estado en el que 5 a 7 moléculas de fármaco se conjugan con un anticuerpo, y la carga media de fármaco representa el estado donde alrededor de 3 moléculas de fármaco están conjugadas con un anticuerpo. El número promedio de moléculas de fármaco conjugadas con un anticuerpo se midió por el método UV (descrito en otras partes de la presente invención).

El número promedio de moléculas de fármaco conjugado con un anticuerpo:

Alta carga de fármaco <HDL>

Conjugado anticuerpo-fármaco (3): 4.9

Conjugado anticuerpo-fármaco (10): 6.2

Conjugado anticuerpo-fármaco (13): 6.2

Media carga de fármaco <MDL>

Conjugado anticuerpo-fármaco (4): 2.9

Conjugado anticuerpo-fármaco (11): 3.0

Conjugado anticuerpo-fármaco (14): 2.5

La actividad inhibidora de cada conjugado anticuerpo-fármaco HER3 contra señales mitogénicas o de supervivencia se midió en presencia de 10% de FBS. El crecimiento y desarrollo de las células se evaluó mediante la medición de la actividad de trifosfato de adenosina (ATP) en los grupos tratados con conjugados no tratados y anticuerpo-fármaco. La línea celular de cáncer se suspendió en 100 uL de cada medio a una densidad baja (750 células/pocillo para una línea celular humana de cáncer de mama MDA-MB-453 (CLB-22)) a partir de ATCC) y se inocularon a placa blanca de fondo óptico de 96 micropocillos (Thermo Fisher Scientific Inc./Nunc, # 165306). Las células se cultivaron en un medio RPMI1640 (Invitrogen Corp., 31870-025) que contenía 10% de SFB (Invitrogen Corp., 10270-106) y glutamina 2 mM (Invitrogen Corp., 25.030-024). Los pozos de borde de cada

placa se llenaron con 100 uL de un medio.

Las células se cultivaron durante 3 días, y el medio se reemplazó con 95 uL de un medio fresco antes de la adición de conjugado anticuerpo-fármaco. Se usaron el conjugado anticuerpo-fármaco (3), el conjugado anticuerpo-fármaco (10), el conjugado anticuerpo-fármaco (13), el conjugado anticuerpo-fármaco (4), el conjugado anticuerpo-fármaco (11), y el conjugado anticuerpo-fármaco (14). Un grupo no tratado se fijó como control para medir el crecimiento celular normal.

Mediante la adición de 5 ul de cada conjugado anticuerpo-fármaco concentrado en una concentración de 20 veces a 95 uL de un medio de cultivo (10% FBS) contenido en cada pocillo de la placa de 96 pocillos, se estableció la concentración final. Sólo se añadieron 5 ul de un medio a cada pocillo de control. El ensayo se realizó por triplicado por muestra. Con el fin de calcular la concentración del conjugado anticuerpo-fármaco en el que el crecimiento o la supervivencia de las células se redujo en un 50%, las concentraciones del conjugado anticuerpo-fármaco se prepararon por diluciones 4 veces (10 ug/mL a 0.15 ng/mL), y las células se trataron con estas concentraciones del conjugado anticuerpo-fármaco y se compararon con el grupo no tratado en términos de actividad ATP. La evaluación se llevó a cabo mediante el cultivo de 7 días de las células así

suplementadas con el conjugado anticuerpo-fármaco. Se usó el ensayo de viabilidad de células luminiscente CellTiter-Glo (R) para evaluar la actividad del conjugado anticuerpo-fármaco. Este método implica la medición de las células vivas que tienen actividad metabólica sobre la base de la actividad de ATP y, finalmente, la estimación del número de células vivas y empleó CellTiter-Glo (R) Luminiscent Cell (Promega K.K., G7573) en forma de un kit. Cien microlitros de reactivo CellTiter-Glo (R) se añadió a cada pocillo de la placa de 96 pocillos y se almacenó durante 25 minutos a 55 minutos a temperatura ambiente en un cuarto oscuro antes de la medición usando Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter (programa de luminiscencia, tiempo de medición : 0.5 s). Los pocillos que contenían sólo una solución de cultivo sin la inoculación de las células se ensayaron como espacios en blanco. Con el fin de medir la reducción en la actividad de ATP, un valor medio de luminiscencia de 3 pozos se calculó en cada condición (Microsoft Excel 2010). Con el fin de eliminar las señales de células independientes, el valor medio de luminiscencia de los espacios en blanco se resta del valor medio de la luminiscencia de las células tratadas con el conjugado anticuerpo-fármaco (Microsoft Excel 2010). La tasa de reducción (%) en la luminiscencia se calculó por comparación con las células del grupo no tratado (Microsoft Excel 2010). Este valor se interpreta como la tasa de

inhibición (%) del crecimiento celular o la supervivencia.

Los resultados se muestran en las figuras 11 a 13. La figura 11 muestra los resultados de la comparación de la conjugado anticuerpo-fármaco (3) con el conjugado anticuerpo-fármaco (4). La Figura 12 muestra los resultados de la comparación de la conjugado anticuerpo-fármaco (10) con el conjugado anticuerpo-fármaco (11). La Figura 13 muestra los resultados de la comparación de la conjugado anticuerpo-fármaco (13) con el conjugado anticuerpo-fármaco (14). En cada figura, el diagrama de la izquierda muestra la tasa de inhibición del crecimiento celular o la supervivencia derivado del conjugado anticuerpo-fármaco en presencia de 10% de FBS en una de las pruebas por triplicado. La ordenada representa la luminiscencia que indica la actividad ATP de cada muestra. La abscisa representa la concentración de cada conjugado anticuerpo-fármaco. El diagrama de la derecha muestra la comparación de la tasa de reducción de la luminiscencia causada por el tratamiento conjugado anticuerpo-fármaco entre la alta carga de fármaco (HDL) y la carga de fármaco del medio (MDL) cuando la luminiscencia de un grupo no tratado se definió como 100%.

Los conjugados anticuerpo-fármaco de alta carga de fármaco y media carga de fármaco inhibieron el crecimiento o la supervivencia celular a través del tratamiento y 7 días de cultivo de células MDA-MB-453. Como ya se ha mostrado en los

resultados sobre la alta carga de fármaco, el conjugado anticuerpo-fármaco de media carga de fármaco (11) mostró una alta actividad en el mismo nivel que la del conjugado anticuerpo-fármaco (4). En la comparación entre el número de moléculas de fármaco cargado, los conjugados anticuerpo-fármaco que tienen un elevado número de moléculas de fármacos cargadas exhibieron mayor reducción en ATP que la de las carga de fármaco medias. El conjugado anticuerpo-fármaco (3), el conjugado anticuerpo-fármaco (10), y el conjugado anticuerpo-fármaco (13) que tiene un elevado número de moléculas de fármacos cargados exhibieron tasas de inhibición de 68%, 76%, y 56%, respectivamente, a una concentración de 10 ug/mL, mientras que el conjugado anticuerpo-fármaco (4), el conjugado anticuerpo-fármaco (11), y el conjugado anticuerpo-fármaco (14) que tienen un número promedio de moléculas de fármacos cargados exhibieron meramente tasas de inhibición de 44%, 47% y 27%, respectivamente, a esta concentración. Los conjugados anticuerpo-fármaco que tiene un elevado número de moléculas de fármacos cargados eran superiores en la concentración de inhibición del 50% del crecimiento de células de cáncer o la supervivencia a los conjugados anticuerpo-fármaco que tienen un número promedio de moléculas de fármacos cargadas. El conjugado anticuerpo-fármaco (3) o el conjugado anticuerpo-fármaco (10) que tiene un elevado número de moléculas de fármacos cargadas requieren

15 ng/mL (1 nM) del conjugado anticuerpo-fármaco para reducir el valor de actividad de ATP por 50%. El conjugado anticuerpo-fármaco (13) redujo la actividad de ATP por 50% por lo menos en la concentración más alta probada. Por el contrario, la reducción de la actividad ATP correspondiente a esto no se observó a 1000 ng/mL (67 nM) o inferior dentro de la gama de concentraciones de los conjugados anticuerpo-fármaco evaluados que tienen un número promedio de moléculas de fármacos cargados. La comparación *in vitro* entre el elevado número de moléculas de fármaco cargadas y el número promedio de moléculas de fármaco cargadas sugirió que un conjugado de anticuerpo-fármaco que tiene un elevado número de moléculas de fármacos cargados también es superior en la actividad inhibidora *in vivo* contra el crecimiento de células cancerosas.

Ejemplo de prueba 6 Conjugados anticuerpo-fármaco (3), (10) y (13) exhiben efecto antitumoral en la prueba antitumoral *in vivo* usando cáncer de mama humano

Se usaron ratones desnudos BALB/C hembra de cinco semanas de edad que tienen un peso corporal de 15 a 20 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 4 ratones al máximo por jaula), que se mantuvo a temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los

comportamientos de los animales se registraron cada día. $5x10^6$ células de una línea celular de cáncer de mama humano HCC1569 (CRL-2330) a partir de ATCC se suspendieron en una solución preparada a partir de 50 uL de PBS y Matrigel (PBS: PAA # H21-002, Matrigel: BD # 354230) mezclado en una relación de 1:1, y fueron trasplantados por vía subcutánea a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo BALB/C usando una aguja de 29 G.

Los pesos corporales se midieron usando una báscula (Mettler Toledo PB602-L). El eje mayor y eje menor del tumor se midieron dos veces a la semana usando un calibrador electrónico digital (calibrador manual, OMC Fontana), y se calculó el volumen del tumor (mm^3). El cálculo se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente expresión (lo mismo es cierto para los ejemplos de ensayo descritos a continuación).

Volumen del tumor (mm^3) = 1/2 x eje mayor (mm) x [Eje menor (mm)]^2

En el día 19 cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 150 mm^3, 70 animales se dividieron aleatoriamente en 7 grupos sobre la base de sus tamaños tumorales. Al mismo día, el conjugado anticuerpo-fármaco (3), (10), o (13) o PBS para un grupo de control se administraron a la vena de la cola de cada animal a las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se inyectó por vía

intravenosa una vez a la semana a la misma dosis que el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (3) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 3 ó 10 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (10) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 3 ó 10 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (13) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 3 ó 10 mg/kg.

Todos los datos se indican mediante media +/- SEM. Los tamaños de los tumores y los pesos corporales fueron evaluados por media +/- SEM. Todos los datos fueron analizados usando Microsoft Excel 2009 (lo mismo es cierto para los ejemplos de ensayo descritos a continuación).

Los resultados se muestran en la Figura 14. El grupo de administración de PBS fue sacrificado en el día 53 después del transplante, debido a que los tamaños de los tumores excedieron el nivel máximo aceptable. Se observó la inhibición del crecimiento tumoral de la línea celular de cáncer de mama humano en todos los grupos de administración conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con el grupo control. No se observó pérdida de peso en los ratones de los grupos tratados.

Ejemplo de prueba 7 Conjugados anticuerpo-fármaco (3), (10) y (13) exhiben efecto antitumoral en la prueba antitumoral usando melanoma humano

Se usaron ratones desnudos NMRI hembra 5 a 6 semanas de edad con un peso corporal de 22 a 26 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 4 ratones al máximo por jaula), que se mantuvo a temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los comportamientos de los animales se registraron cada día.

$5x10^6$ células de una línea humana de células de melanoma HT-144 (HTB-63) a partir de ATCC se suspendieron en una solución preparada a partir de 50 uL de PBS y Matrigel (PBS: PAA # H21-002, Matrigel: BD # 354230) se mezcló a una proporción de 1:1, y fueron trasplantados por vía subcutánea a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo NMRI usando una aguja de 29 G.

La medición de los pesos corporales y los tamaños de los tumores y la medición y el cálculo de los volúmenes de los tumores se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo de prueba 6.

En el día 22 cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 150 mm^3, 80 animales se dividieron al azar en 8 grupos sobre la base de sus tamaños tumorales. Al mismo día,

U1-59 o el conjugado anticuerpo-fármaco (3), (10), o (13) o PBS para un grupo de control se administraron a la vena de la cola de cada animal a las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a la misma dosis que el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: U1-59 se inyectó por vía subcutánea dos veces a la semana a 25 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (3) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 3 o 10 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (10) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 3 o 10 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (13) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 3 o 10 mg/kg.

Los resultados se muestran en la Figura 15. Los grupos de administración de U1-59 y PBS se sacrificaron en los Días 48 y 52, respectivamente, después del transplante, debido a que los tamaños de los tumores excedieron el nivel máximo aceptable. Se observó la inhibición del crecimiento tumoral de la línea celular de melanoma humano en todos los grupos de administración conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con el grupo control y el grupo de administración

U1-59.

Ejemplo de prueba 8 Conjugados anticuerpo-fármaco (3), (10) y (13) exhiben efecto antitumoral en la prueba antitumoral usando la línea de cáncer de mama humano

Se usaron ratones SCID desnudos hembra de 16 semanas de edad con un peso corporal de entre 17 y 25.5 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente que se mantuvieron a temperatura ambiente y una humedad constante.

Para los tumores sólidos derivados de una línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-453 (CLB-22) a partir de ATCC, MDA-MB-453 en el primer pasaje (Lote 1089) fue trasplantado a 3 ratones (dos áreas por ratón: las áreas derecha e izquierda del cuerpo). Después de 13 a 17 semanas, los cortes de los tumores fueron recuperados y criopreservados. Para el segundo paso, la sección de tumor (2 x 2 x 2 mm) del primer paso fue más trasplantada por vía subcutánea (10 ratones, dos áreas por ratón: áreas derecha e izquierda del cuerpo) y se dejó crecer durante la formación del tumor para 7 semanas. El tumor formado de este modo se preparó en una sección de tumor (2 x 2 x 2 mm, segundo paso) y se trasplanta a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo SCID.

Los pesos corporales se midieron usando una báscula. El eje mayor (longitud) y el diámetro del tumor se

midió usando un calibrador digital electrónico (Pro-Max 150 mm pinzas de mano, Fred V. Fowler Co., Inc.), y se calculó el volumen del tumor (mm^3). El cálculo se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente expresión.

Volumen del tumor (mm^3) = pi/6 x eje mayor (mm) x [Diámetro (mm)]^2

En el día 40 cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 143 mm^3, 72 animales se dividieron al azar en 8 grupos sobre la base de sus tamaños tumorales. Al mismo día, U1-59 o el conjugado anticuerpo-fármaco (3), (10), o (13) o PBS para un grupo de control se administraron a la vena de la cola de cada animal a las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a la misma dosis que el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: U1-59 se inyectó por vía subcutánea dos veces a la semana a 25 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (3) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 3 ó 10 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (10) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 3 ó 10 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (13) se inyectó por vía intravenosa una vez a la

semana a 3 ó 10 mg/kg.

Los resultados se muestran en la Figura 16. La inhibición del crecimiento tumoral de la línea celular de cáncer de mama humano se observó en todos los grupos de administración conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con el grupo control y el grupo de administración U1-59. No se observó pérdida de peso en los ratones de los grupos tratados. Además, en otra prueba antitumoral usando línea celular de cáncer de mama humano HCC1954 o JIMT1-PR10 (trastzumab-, pertuzumab- y T-DM1- resistente), la inhibición del crecimiento del tumor se observó también en el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) grupo de administración en comparación con el grupo control.

Ejemplo de prueba 9 Conjugados anticuerpo-fármaco (3), (10) y (13) exhiben efecto antitumoral en la prueba antitumoral usando la línea de cáncer colorrectal humano

Se usaron ratones desnudos NMRI hembra de 5 a 6 semanas de edad con un peso corporal de 15 a 20 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 4 ratones al máximo por jaula), que se mantuvo a temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los comportamientos de los animales se registraron cada día.

$4x10^6$ células de una línea celular de cáncer

colorrectal humano HT-29 (CPQ-57) a partir de ProQinase GmbH se suspendieron en una solución preparada a partir de PBS y Matrigel (PBS: PAA # H21-002, Matrigel: BD # 354230) mezclado en una relación de 1:1, y fueron trasplantados por vía subcutánea a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo NMRI usando una aguja de 29 G.

La medición de los pesos corporales y los tamaños de los tumores y la medición y el cálculo de los volúmenes de los tumores se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo de prueba 6.

En el día 8, cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 150 mm^3, 70 animales se dividieron aleatoriamente en 7 grupos sobre la base de sus tamaños tumorales. Al mismo día, el conjugado anticuerpo-fármaco (3), (10), o (13) o PBS para un grupo de control se administraron a la vena de la cola de cada animal a las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a la misma dosis que el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (3) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 3 ó 10 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (10) se inyectó por vía intravenosa una vez a la

semana a 3 ó 10 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (13) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 3 ó 10 mg/kg.

Los resultados se muestran en la Figura 17. El grupo de administración de PBS (6 de los 10 ratones), los grupos administrados con el conjugado anticuerpo-fármaco (3) a 3 mg/kg (3 fuera de la 10 ratones) y a 10 mg/kg (4 de los 10 ratones), los grupos que recibieron el conjugado anticuerpo-fármaco (10) a 3 mg/kg (2 de los 10 ratones) y a 10 mg/kg (2 de los 10 ratones), y el grupo que recibió el conjugado anticuerpo-fármaco (13) a 3 mg/kg (2 de los 10 ratones) fueron sacrificados en el día 50 después del trasplante, debido a que los tamaños de los tumores superaron el nivel máximo aceptable o se formó úlcera. Se observó la inhibición del crecimiento tumoral de la línea celular de cáncer colorrectal humano en todos los grupos de administración conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con el grupo control. El conjugado anticuerpo-fármaco (13) exhibió una actividad antitumoral más fuerte que la del conjugado anticuerpo-fármaco (3) o el conjugado anticuerpo-fármaco (10). No se observó pérdida de peso en los ratones de los grupos tratados.

Ejemplo de prueba 10 Conjugados anticuerpo-fármaco (3), (10) y (13) exhiben efecto antitumoral en la prueba

antitumoral usando la línea de cáncer de pulmón humano

Se usaron ratones desnudos CD1 hembra de 5 a 6 semanas de edad con un peso corporal de 24 a 28 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 4 ratones al máximo por jaula), que se mantuvo a temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los comportamientos de los animales se registraron cada día.

$5x10^6$ células de una línea celular A549 de cáncer de pulmón humano (CRS-300114) de Cell Line Service se suspendieron en una solución preparada a partir de 200 uL de PBS y Matrigel (PBS: PAA # H21-002, Matrigel: BD # 354230) mezclados en una proporción de 1:1, y se trasplantaron por vía subcutánea a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo CD1 usando una aguja de 29 G.

La medición de los pesos corporales y los tamaños de los tumores y la medición y el cálculo de los volúmenes de los tumores se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo de prueba 6.

En el día 38 cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 200 mm^3, 70 animales se dividieron aleatoriamente en 7 grupos sobre la base de sus tamaños tumorales. Al mismo día, el conjugado anticuerpo-fármaco (3), (10), o (13) o PBS para un grupo de control se

administraron a la vena de la cola de cada animal a las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a la misma dosis que el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (3) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 3 ó 10 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (10) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 3 ó 10 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (13) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 3 ó 10 mg/kg.

Los resultados se muestran en la Figura 18. La inhibición del crecimiento tumoral de la línea celular de cáncer de pulmón humano se observó en todos los grupos de administración conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con el grupo control. No se observó pérdida de peso en los ratones de los grupos tratados.

Ejemplo de prueba 11 Conjugado anticuerpo-fármaco (13) mostró un efecto antitumoral en la prueba antitumoral in vivo usando la línea de cáncer de mama triple negativo humano

El cáncer de mama triple negativo se refiere a un cáncer de mama que no expresa receptores de hormonas

(receptores de estrógenos y progesterona), ni expresa receptores de HER2. Dado que estos receptores no se expresan, el tratamiento hormonal (tamoxifeno, etc.) o tratamiento anti-HER2 (trastuzumab, emtansina trastuzumab, o pertuzumab) no se pueden aplicar al cáncer. Por lo tanto, este tipo de cáncer de mama conduce a bajas tasas de supervivencia, y muchos agentes terapéuticos están todavía en ensayo clínico. Como la expresión de HER3 se confirmó en una línea de cáncer de mama triple negativo humano MDA-MB-468 (datos no mostrados), se evaluó la actividad antitumoral del conjugado anticuerpo-fármaco.

Se usaron ratones desnudos hembra CAnN.Cg-Foxn1 [nu]/CrlCrlj 〔Foxn1nu/Foxn1nu〕 de 5 a 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) que tenían un peso corporal de 15 a 20 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 4 ratones máximo por jaula), que se mantuvo a temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los comportamientos de los animales se registraron cada día.

$5x10^6$ células de una línea celular de cáncer de mama triple negativo humano MDA-MB-468 (CRL-2322) a partir de ATCC se suspendieron en una solución preparada a partir de 200 uL de PBS y Matrigel (PBS: PAA # 10010-023, Matrigel: BD

354234) mezclado en una proporción de 1:1, y fueron trasplantados por vía subcutánea a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo usando una aguja de 29 G. Los pesos corporales se midieron usando una báscula (Mettler Toledo PB602-L).

El eje mayor y eje menor del tumor se midieron usando un calibrador digital electrónico (CD-15CX, Mitsutoyo Corp), y se calculó el volumen del tumor (mm^3). El cálculo se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente expresión.

Volumen del tumor (mm^3) = 1/2 x eje mayor (mm) x [Eje menor (mm)]^2

En el día 20 cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 170 mm^3, 18 animales se dividieron al azar en 3 grupos sobre la base de sus tamaños tumorales. Al mismo día, U1-59 o el conjugado anticuerpo-fármaco (13) o PBS para un grupo de control se administraron a la vena de la cola de cada animal a las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a la misma dosis que el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: U1-59 se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 10 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (13) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 10 mg/kg.

Los resultados se muestran en la Figura 19. La inhibición del crecimiento tumoral de la línea de cáncer de mama triple negativo humano se observó en el grupo de administración de conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con el grupo control y el grupo de administración U1-59. No se observó pérdida de peso en los ratones de los grupos tratados.

Ejemplo de prueba 12 Conjugado anticuerpo-fármaco (16a) mostró efecto antitumoral en la prueba antitumoral *in vivo* usando la línea de cáncer de mama luminal humano

El cáncer de mama luminal humano se refiere a un cáncer de mama que expresa los receptores de hormonas (receptores de estrógenos), pero no expresa HER2. Dado que estos receptores no se expresan, el tratamiento con anti-HER2 (trastuzumab, emtansina trastuzumab, pertuzumab) no se pueden aplicar al cáncer. Por lo tanto, este tipo de cáncer de mama conduce a bajas tasas de supervivencia, y muchos agentes terapéuticos están todavía en ensayo clínico. Como la expresión de HER3 se confirmó en una línea de cáncer de mama humano luminal MCF-7 (datos no presentados), se evaluó la actividad antitumoral del conjugado anticuerpo-fármaco.

Se usaron ratones desnudos atímicos hembra Nude-Foxn1nu (ProQinase GmbH) de 5 a 6 semanas de edad, con un peso corporal de 15 a 20 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente

(IVC, 4 ratones al máximo por jaula), que se mantuvo a temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los comportamientos de los animales se registraron cada día.

$5x10^6$ células de una línea celular de cáncer de mama humano luminal MCF-7 (CRQ- # 327) se suspendieron en una solución preparada a partir de 200 uL de PBS y Matrigel (PBS: PAA # 10010-023, Matrigel: BD # 354234) mezclado en una proporción de 1:1, y fueron trasplantados por vía subcutánea a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo usando una aguja de 29 G. Los pesos corporales se midieron usando una báscula (Mettler Toledo PB602-L).

El eje mayor y eje menor del tumor se midieron usando un calibrador digital electrónico (CD-15CX, Mitsutoyo Corp), y se calculó el volumen del tumor (mm^3). El cálculo se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente expresión.

Volumen del tumor (mm^3) = 1/2 x eje mayor (mm) x [Eje menor (mm)]^2

En el día 11 cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 250 mm^3, 20 animales fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos sobre la base de sus tamaños tumorales. Al mismo día, el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) o PBS para un grupo de control se administraron en las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se inyectó intravenosamente a la misma dosis única como el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se inyectó por vía intravenosa a una dosis única de 10 mg/kg.

Los resultados se muestran en la Figura 20. La inhibición del crecimiento tumoral de la línea de cáncer de mama luminal humana se observó en el grupo de administración de conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con el grupo control. No se observó pérdida de peso en los ratones de los grupos tratados.

Ejemplo de prueba 13 Conjugado anticuerpo-fármaco (16a) mostró efecto antitumoral en la prueba antitumoral *in vivo* usando la línea de melanoma humano

Se usaron ratones desnudos hembra CAnN.Cg-Foxn1 [nu]/CrlCrlj 〔Foxn1nu/Foxn1nu〕de 5 a 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.), que tienen un peso corporal de 15 a 20 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 4 ratones al máximo por jaula), que se mantuvo a temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los comportamientos de los animales se registraron cada día.

$3x10^6$ células de una línea celular de melanoma humano WM-266-4 (CRL-1676) a partir de ATCC se mezclaron y suspendieron en Matrigel (BD # 354234) y fueron trasplantados por vía subcutánea a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo usando una aguja 29 G. Los pesos corporales se midieron usando una báscula (Mettler Toledo PB602-L).

El eje mayor y eje menor del tumor se midieron usando un calibrador digital electrónico (CD-15CX, Mitsutoyo Corp), y se calculó el volumen del tumor (mm^3). El cálculo se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente expresión.

Volumen del tumor (mm^3) = 1/2 x eje mayor (mm) x [Eje menor (mm)]^2

En el día 19 cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 220 mm^3, 8 animales se dividieron aleatoriamente en 2 grupos sobre la base de sus tamaños tumorales. Al mismo día, el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) o PBS para un grupo de control se administraron en las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se inyectó intravenosamente a la misma dosis única como el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se inyectó por vía intravenosa a una dosis única de 10 mg/kg.

Los resultados se muestran en la Figura 21. La

inhibición del crecimiento tumoral de la línea de melanoma humano se observó en el grupo de administración de conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con el grupo control. No se observó pérdida de peso en los ratones de los grupos tratados. En otro modelo de melanoma humano C32, la inhibición de crecimiento del tumor también se observó en el grupo de administración de conjugado anticuerpo-fármaco (16a) en comparación con el grupo control.

Ejemplo de prueba 14 Conjugado anticuerpo-fármaco (16a) mostró efecto antitumoral en la prueba antitumoral *in vivo* usando la línea de cáncer de ovario humano

Se usaron ratones desnudos hembra CAnN.Cg-Foxn1 [nu]/CrlCrlj 〔Foxn1nu/Foxn1nu〕 de 5 a 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) que tienen un peso corporal de 15 a 20 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 4 ratones al máximo por jaula), que se mantuvo a temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los comportamientos de los animales se registraron cada día.

$5x10^6$ células de una línea celular de cáncer de ovario humano OVCAR-8 (HTB-161) a partir de ATCC se mezclaron y suspendieron en Matrigel (BD # 354234) y se trasplantaron por vía subcutánea a la zona lateral derecha del cuerpo de

cada ratón desnudo usando una aguja 29 G. Los pesos corporales se midieron usando una báscula (Mettler Toledo PB602-L).

El eje mayor y eje menor del tumor se midieron usando un calibrador digital electrónico (CD-15CX, Mitsutoyo Corp), y se calculó el volumen del tumor (mm^3). El cálculo se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente expresión.

Volumen del tumor (mm^3) = 1/2 x eje mayor (mm) x [Eje menor (mm)]^2

En el día 21 cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 140 mm^3, 8 animales se dividieron aleatoriamente en 2 grupos sobre la base de sus tamaños tumorales. Al mismo día, el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) o PBS para un grupo de control se administraron en las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se inyectó intravenosamente a la misma dosis única como el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se inyectó por vía intravenosa a una dosis única de 10 mg/kg.

Los resultados se muestran en la Figura 22. La inhibición del crecimiento tumoral de la línea de cáncer de ovario humano se observó en el grupo de administración de conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con el grupo control. No se observó pérdida de peso en los ratones de los

grupos tratados.

Ejemplo de prueba 15 Conjugado anticuerpo-fármaco (16a) mostró efecto antitumoral en la prueba antitumoral *in vivo* usando la línea de cáncer de vejiga humano

Se usaron ratones desnudos hembra CAnN.Cg-Foxn1 [nu]/CrlCrlj 〔Foxn1nu/Foxn1nu〕 de 5 a 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) que tienen un peso corporal de 15 a 20 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 4 ratones al máximo por jaula), que se mantuvo a temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los comportamientos de los animales se registraron cada día.

$8x10^6$ células de una línea celular de cáncer de vejiga humano SW-780 (CRL-2169) a partir de ATCC se mezclaron y se suspendieron en Matrigel (BD # 354234) y se trasplantaron por vía subcutánea a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo usando una aguja 29 G. Los pesos corporales se midieron usando una báscula (Mettler Toledo PB602-L).

El eje mayor y eje menor del tumor se midieron usando un calibrador digital electrónico (CD-15CX, Mitsutoyo Corp), y se calculó el volumen del tumor (mm^3). El cálculo se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente expresión.

Volumen del tumor (mm^3) = 1/2 x eje mayor (mm) x [Eje menor (mm)]^2

En el día 7, cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 190 mm^3, 10 animales fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos sobre la base de sus tamaños tumorales. Al mismo día, el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) o PBS para un grupo de control se administraron en las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se inyectó intravenosamente a la misma dosis única como el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se inyectó por vía intravenosa a una dosis única de 10 mg/kg.

Los resultados se muestran en la Figura 23. La inhibición del crecimiento tumoral de la línea de cáncer de vejiga humana se observó en el grupo de administración de conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con el grupo control. No se observó pérdida de peso en los ratones de los grupos tratados.

Ejemplo de prueba 16 Conjugado anticuerpo-fármaco (16a) mostró efecto antitumoral HER3-dependiente en la prueba antitumoral *in vivo* usando la línea de cáncer de mama humano

La línea de cáncer de mama humano MDA-MB-453 expresa HER3 y responde al conjugado anticuerpo-fármaco (13)

como se describe en el Ejemplo de Ensayo 8. Sin embargo, ya que no se había demostrado que este efecto farmacéutico fuera mediado por HER3 tampoco, HER3 fue velado mediante la administración de U1-59 de antemano, y se evaluó si reducía o no el efecto farmacéutico.

Se usaron ratones desnudos hembra CAnN.Cg-Foxn1 [nu]/CrlCrlj 〔Foxn1nu/Foxn1nu〕 de 5 a 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) que tienen un peso corporal de 15 a 20 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 4 ratones al máximo por jaula), que se mantuvo a temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los comportamientos de los animales se registraron cada día.

$1x10^7$ células de una línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-453 (CLB-22) a partir de ATCC se mezclaron y se suspendieron en Matrigel (BD # 354234) y se trasplantaron por vía subcutánea a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo usando una aguja 29 G. Los pesos corporales se midieron usando una báscula (Mettler Toledo PB602-L).

El eje mayor y eje menor del tumor se midieron usando un calibrador digital electrónico (CD-15CX, Mitsutoyo Corp), y se calculó el volumen del tumor (mm^3). El cálculo

se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente expresión.

Volumen del tumor (mm^3) = 1/2 x eje mayor (mm) x [Eje menor (mm)]^2

En el día 11 cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 130 mm^3, 16 animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos en función de sus tamaños tumorales. Al mismo día, el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) y/o U1-59 o PBS para un grupo de control se administraron en las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se inyectó intravenosamente a la misma dosis única como el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: U1-59 se inyectó por vía intravenosa a una dosis única de 30 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se inyectó por vía intravenosa a una dosis única de 3 mg/kg.

Grupo de administración: 30 minutos después de la administración (inyección intravenosa a una dosis única) de U1-59, el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se inyectó por vía intravenosa a una dosis única de 3 mg/kg.

Los resultados se muestran en la Figura 24. La inhibición del crecimiento tumoral de la línea de cáncer de mama humano se observó en el grupo de administración de conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con el grupo

control, mientras que este efecto inhibidor del tumor fue atenuado por la administración de U1-59 de antemano. Estos resultados demostraron que el efecto inhibidor del tumor del conjugado anticuerpo-fármaco es un efecto farmacéutico mediada por HER3. No se observó pérdida de peso en los ratones de los grupos tratados.

Ejemplo de prueba 17 Conjugado anticuerpo-fármaco (16a) exhibió un efecto antitumoral en uso combinado con trastuzumab en prueba antitumoral *in vivo* usando la línea del cáncer de mama humano

Trastuzumab ha sido aprobado como un agente terapéutico para el cáncer de mama positivo para HER2 humano. Sin embargo, se conoce la resistencia trastuzumab, y una mutación en PIK3CA <H1047R o H420R> se ha informado para participar en uno de los mecanismos que subyacen a esta resistencia. En esta prueba, ya sea o no el uso combinado de trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco era eficaz para se evaluó una línea de cáncer de mama resistente a trastuzumab.

Se usaron ratones desnudos hembra CAnN.Cg-Foxn1 [nu]/CrlCrlj 〔Foxn1nu/Foxn1nu〕 de 5 a 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) que tienen un peso corporal de 15 a 20 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 4 ratones al máximo por jaula), que se mantuvo a

temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los comportamientos de los animales se registraron cada día.

$1x10^7$ células de una línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-453 (CLB-22, la mutación en PIK3CA H1047R) a partir de ATCC se mezclaron y suspendieron en Matrigel (PBS: PAA # 10010-023, Matrigel: BD # 354234) y se trasplantaron por vía subcutánea a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo usando una aguja de 29 G. Los pesos corporales se midieron usando una báscula (Mettler Toledo PB602-L).

El eje mayor y eje menor del tumor se midieron usando un calibrador digital electrónico (CD-15CX, Mitsutoyo Corp), y se calculó el volumen del tumor (mm^3). El cálculo se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente expresión.

Volumen del tumor (mm^3) = 1/2 x eje mayor (mm) x [Eje menor (mm)]^2

En el día 11 cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 130 mm^3, 16 animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos en función de sus tamaños tumorales. En el mismo día, el conjugado anticuerpo-fármaco (16a), el trastuzumab, el uso combinado del conjugado y trastuzumab, o PBS para un grupo de control se les administró a las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se inyectó intravenosamente a la misma dosis única como el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: Trastuzumab (Roche Diagnostics, Inc.) se inyectó por vía intravenosa a una dosis única de 1 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se inyectó por vía intravenosa a una dosis única de 3 mg/kg.

Grupo de administración: 30 minutos después de la administración (inyección intravenosa a una dosis única) de trastuzumab (Roche Diagnostics, Inc.), el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se inyectó por vía intravenosa a una dosis única de 3 mg/kg.

Los resultados se muestran en la Figura 25. Se observó el efecto antitumoral provocado por uso combinado en la línea de cáncer de mama humano (PIK3CA H1047R) en la administración de trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con la administración de cada medicamento solo. Estos resultados demostraron que el efecto farmacéutico del conjugado anticuerpo-fármaco es potenciado por el uso combinado de los mismos con trastuzumab. No se observó pérdida de peso en los ratones de los grupos tratados. En otra prueba antitumoral ucing una línea celular de cáncer de mama humano HCC1954 (PIK3CA H1047R), el efecto

antitumoral combinada también se observó en la administración de trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco (16a), en comparación con la administración de cada medicamento por sí solo.

Ejemplo de prueba 18 Conjugado anticuerpo-fármaco (15) mostró un efecto antitumoral en uso combinado con trastuzumab en prueba *in vivo* antitumoral usando la línea del cáncer de mama humano

Trastuzumab ha sido aprobado como un agente terapéutico para el cáncer de mama positivo para HER2 humano. Sin embargo, se conoce la resistencia trastuzumab, y una mutación en PIK3CA <H1047R o H420R> se ha informado que participa en uno de los mecanismos que subyacen a esta resistencia. En esta prueba, ya sea o no el uso combinado de trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco era eficaz se evaluó una línea de cáncer de mama resistente a trastuzumab.

Se usaron ratones desnudos hembra CAnN.Cg-Foxn1 [nu]/CrlCrlj 〔Foxn1nu/Foxn1nu〕 de 5 a 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) que tienen un peso corporal de 15 a 20 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 4 ratones al máximo por jaula), que se mantuvo a temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los comportamientos de los animales

se registraron cada día.

$5x10^6$ células de una línea celular de cáncer de mama humano JIMT-1 (ACC-589, H420R mutación en PIK3CA) a partir de ATCC se suspendieron en PBS (PAA # 10010-023) y se trasplantaron por vía subcutánea a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo usando una aguja de 29 G. Los pesos corporales se midieron usando una báscula (Mettler Toledo PB602-L).

El eje mayor y eje menor del tumor se midieron usando un calibrador digital electrónico (CD-15CX, Mitsutoyo Corp), y se calculó el volumen del tumor (mm^3). El cálculo se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente expresión.

Volumen del tumor (mm^3) = 1/2 x eje mayor (mm) x [Eje menor (mm)]^2

En el día 10 cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 200 mm^3, 24 animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos en función de sus tamaños tumorales. Al mismo día, el conjugado anticuerpo-fármaco (15), trastuzumab, uso combinado del conjugado y trastuzumab, o PBS para un grupo de control se administraron en las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a la misma dosis que el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: Trastuzumab (Roche

Diagnostics, Inc.) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 10 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (15) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 10 mg/kg.

Grupo de administración: 30 minutos después de la administración (inyección intravenosa una vez a la semana) de trastuzumab (Roche Diagnostics, Inc.), el conjugado anticuerpo-fármaco (15) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 10 mg/kg.

Los resultados se muestran en la Figura 26. Se observó el efecto antitumoral provocado por uso combinado en la línea de cáncer de mama humano (PIK3CA H420R) en la administración de trastuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con la administración de cada medicamento solo. Estos resultados demostraron que el efecto farmacéutico del conjugado anticuerpo-fármaco es potenciado por el uso combinado de los mismos con trastuzumab. No se observó pérdida de peso en los ratones de los grupos tratados.

Ejemplo de prueba 19 Conjugado anticuerpo-fármaco (16a) mostró efecto antitumoral en uso combinado con gefitinib en la prueba antitumoral *in vivo* usando la línea de cáncer de pulmón humano

Gefitinib ha sido aprobado como un agente

terapéutico para el cáncer de pulmón humano. En esta prueba, se evaluó si el uso combinado de gefitinib y el conjugado anticuerpo-fármaco era eficaz o no.

Se usaron ratones desnudos hembra CAnN.Cg-Foxn1 [nu]/CrlCrlj 〔Foxn1nu/Foxn1nu〕 de 5 a 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) que tienen un peso corporal de 15 a 20 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 4 ratones al máximo por jaula), que se mantuvo a temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los comportamientos de los animales se registraron cada día.

$3x10^6$ células de una línea celular de cáncer de pulmón humano PC-9 (RCB0446) de la ATCC se suspendieron en PBS (PAA # 10010-023) y se trasplantaron por vía subcutánea a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo usando una aguja de 29 G. Los pesos corporales se midieron usando una báscula (Mettler Toledo PB602-L).

El eje mayor y eje menor del tumor se midieron usando un calibrador digital electrónico (CD-15CX, Mitsutoyo Corp), y se calculó el volumen del tumor (mm^3). El cálculo se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente expresión.

Volumen del tumor (mm^3) = 1/2 x eje mayor (mm) x [Eje menor (mm)]^2

En el día 14 cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 270 mm^3, 16 animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos en función de sus tamaños tumorales. Al mismo día, el conjugado anticuerpo-fármaco (16a), gefitinib, uso combinado del conjugado y gefitinib, o PBS para un grupo de control se administraron en las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a la misma dosis que el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: gefitinib (AstraZeneca) se administró por vía oral una vez al día a las 6 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 10 mg/kg.

Grupo de administración: 30 minutos después de la administración (la administración oral una vez al día) de gefitinib (AstraZeneca), el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se inyectó por vía intravenosa una vez a la semana a 10 mg/kg.

Los resultados se muestran en la Figura 27. Se observó el efecto antitumoral provocado por uso combinado en la línea de cáncer de pulmón humano en la administración de gefitinib y el conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con la administración de cada medicamento solo. Estos

resultados demostraron que el efecto farmacéutico del conjugado anticuerpo-fármaco es potenciado por el uso combinado de los mismos con gefitinib. No se observó pérdida de peso en los ratones de los grupos tratados.

Ejemplo de prueba 20 Conjugado anticuerpo-fármaco (16a) exhibió un efecto antitumoral en el uso combinado con cetuximab o panitumumab en la prueba antitumoral *in vivo* usando la línea de cáncer de mama triple negativo humano

Un anticuerpo anti-EGFR cetuximab o panitumumab está bajo ensayo clínico contra el cáncer de mama triple negativo humano. En esta prueba, se evaluó si el uso combinado de cetuximab o panitumumab y el conjugado anticuerpo-fármaco era eficaz o no.

Se usaron ratones desnudos hembra CAnN.Cg-Foxn1 [nu]/CrlCrlj 〔Foxn1nu/Foxn1nu〕de 5 a 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) que tienen un peso corporal de 15 a 20 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 4 ratones al máximo por jaula), que se mantuvo a temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los comportamientos de los animales se registraron cada día.

$5x10^6$ células de una línea celular de cáncer de mama triple negativo humano MDA-MB-468 (CRL-2322) a partir de

ATCC se suspendieron en una solución preparada a partir de 200 uL de PBS y Matrigel (PBS: PAA # 10010-023, Matrigel: BD # 354234) mezclado en una proporción de 1:1, y fueron trasplantadas por vía subcutánea a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo usando una aguja de 29 G. Los pesos corporales se midieron usando una báscula (Mettler Toledo PB602-L).

El eje mayor y eje menor del tumor se midieron usando un calibrador digital electrónico (CD-15CX, Mitsutoyo Corp), y se calculó el volumen del tumor (mm^3). El cálculo se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente expresión.

Volumen del tumor (mm^3) = 1/2 x eje mayor (mm) x [Eje menor (mm)]^2

En el día 21 cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 160 mm^3, 30 animales fueron divididos aleatoriamente en 6 grupos sobre la base de sus tamaños tumorales. En el mismo día, el conjugado anticuerpo-fármaco (16a), cetuximab o panitumumab, el uso combinado del conjugado y cetuximab o panitumumab, o PBS para un grupo de control se administraron a las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se administró a la misma dosis única que el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: Cetuximab (Bristol-Myers Squibb Company) se administró en una dosis única de 10 mg/kg.

Grupo de administración: Panitumumab (Amgen Inc.)

se administró en una dosis única de 10 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se administró en una dosis única de 10 mg/kg.

Grupo de administración: 30 minutos después de la administración (administración de una dosis única) de cetuximab (Bristol-Myers Squibb Company), el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se administró en una dosis única de 10 mg/kg.

Grupo de administración: 30 minutos después de la administración (administración de una dosis única) de panitumumab (Amgen Inc.), el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se administró en una dosis única de 10 mg/kg.

Los resultados se muestran en las Figuras 28A-28B. Se observó el efecto antitumoral provocado por uso combinado en la línea de cáncer de mama triple negativo humano en la administración de cetuximab (Figura 28A) o panitumumab (Figura 28B) y el conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con la administración de cada medicamento por sí solo. Estos resultados demostraron que el efecto farmacéutico del conjugado anticuerpo-fármaco es potenciado por el uso combinado de los mismos con cetuximab o panitumumab. No se observó pérdida de peso en los ratones de los grupos tratados. El efecto antitumoral provocado por uso combinado en la otra línea de cáncer de mama triple negativo humano en MDA-MB-231 también se observó en la administración de

cetuximab o panitumumab y el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) en comparación con la administración de cada medicamento solo.

Ejemplo de prueba 21 Conjugado anticuerpo-fármaco (16a) exhibió un efecto antitumoral en el uso combinado con cetuximab o panitumumab en la prueba antitumoral *in vivo* usando la línea de cáncer de cuello y cabeza humano

Un anticuerpo anti-EGFR cetuximab ha sido aprobado contra el cáncer de cabeza y cuello humana, mientras panitumumab está bajo ensayo clínico contra este cáncer. En esta prueba, se evaluó si el uso combinado de cetuximab o panitumumab y el conjugado anticuerpo-fármaco era eficaz o no.

Se usaron ratones desnudos hembra CAnN.Cg-Foxn1 [nu]/CrlCrlj 〔Foxn1nu/Foxn1nu〕 de 5 a 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) que tienen un peso corporal de 15 a 20 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 4 ratones al máximo por jaula), que se mantuvo a temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los comportamientos de los animales se registraron cada día.

$4x10^6$ células de una línea de células de cáncer de cabeza y cuello humano Fadu (HTB-43) a partir de ATCC se

suspendieron en 200 uL de PBS (PAA # 10010-023) y se trasplantaron por vía subcutánea a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo usando una aguja de 29 G. Los pesos corporales se midieron usando una báscula (Mettler Toledo PB602-L).

El eje mayor y eje menor del tumor se midieron usando un calibrador digital electrónico (CD-15CX, Mitsutoyo Corp), y se calculó el volumen del tumor (mm^3). El cálculo se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente expresión.

Volumen del tumor (mm^3) = 1/2 x eje mayor (mm) x [Eje menor (mm)]^2

En el día 6 cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 330 mm^3, 30 animales fueron divididos aleatoriamente en 6 grupos sobre la base de sus tamaños tumorales. En el mismo día, el conjugado anticuerpo-fármaco (16a), cetuximab o panitumumab, el uso combinado del conjugado y cetuximab o panitumumab, o PBS para un grupo de control se les administró a las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se administró a la misma dosis única que el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: Cetuximab (Bristol-Myers Squibb Company) se administró en una dosis única de 5 mg/kg.

Grupo de administración: Panitumumab (Amgen Inc.) se administró en una dosis única de 5 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-

fármaco (16a) se administró en una dosis única de 10 mg/kg.

Grupo de administración: 30 minutos después de la administración (administración de una dosis única) de cetuximab (Bristol-Myers Squibb Company), el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se administró en una dosis única de 10 mg/kg.

Grupo de administración: 30 minutos después de la administración (administración de una dosis única) de panitumumab (Amgen Inc.), el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se administró en una dosis única de 10 mg/kg.

Los resultados se muestran en las Figuras 29A-29B. Se observó el efecto antitumoral provocada por uso combinado en la línea de cáncer de cabeza y cuello humano en la administración de cetuximab (Figura 29A) o panitumumab (Figura 29B) y el conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con el administración de cada medicamento por sí solo. Estos resultados demostraron que el efecto farmacéutico del conjugado anticuerpo-fármaco es potenciado por el uso combinado de los mismos con cetuximab o panitumumab. No se observó pérdida de peso en los ratones de los grupos tratados.

Ejemplo de prueba 22 Conjugado anticuerpo-fármaco (16a) mostró efecto antitumoral en uso combinado con cetuximab o pertuzumab en la prueba antitumoral *in vivo* mediante trasplante de tumor de paciente con cáncer de

estómago

Un anticuerpo anti-EGFR cetuximab y un anticuerpo anti-HER2 pertuzumab están bajo ensayo clínico contra el cáncer de estómago humano. En esta prueba, se evaluó si el uso combinado de cetuximab o pertuzumab y el conjugado anticuerpo-fármaco era eficaz o no. La evaluación se llevó a cabo al llevar a cabo una prueba antitumoral cerca de la condición clínica que implica el estroma de un paciente usando los tumores derivados del paciente trasplantados en ratones en lugar del sistema de evaluación general usando una línea de cáncer humano.

Se usaron ratones desnudos hembra CAnN.Cg-Foxn1 [nu]/CrlCrlj 〔Foxn1nu/Foxn1nu〕 de 5 a 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) que tiene un peso corporal de 15 a 20 g después de la aclimatación. Los ratones se colocaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 4 ratones al máximo por jaula), que se mantuvo a temperatura ambiente y una humedad constante. Después de la aleatorización, los pesos corporales de los ratones se midieron cada dos días, y los comportamientos de los animales se registraron cada día.

Un tumor derivado del paciente de cáncer de estómago NIBIO-G016 del Instituto Nacional de la innovación biomédica se transplantó subcutáneamente a la zona lateral derecha del cuerpo de cada ratón desnudo. Los pesos

corporales se midieron usando una báscula (Mettler Toledo PB602-L).

El eje mayor y eje menor del tumor se midieron usando un calibrador digital electrónico (CD-15CX, Mitsutoyo Corp), y se calculó el volumen del tumor (mm^3). El cálculo se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente expresión.

Volumen del tumor (mm^3) = 1/2 x eje mayor (mm) x [Eje menor (mm)]^2

En el día 56 cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 220 mm^3, 30 animales fueron divididos aleatoriamente en 6 grupos sobre la base de sus tamaños tumorales. En el mismo día, el conjugado anticuerpo-fármaco (16a), cetuximab o pertuzumab, el uso combinado del conjugado y cetuximab o pertuzumab, o PBS para un grupo de control se les administraron a las siguientes dosis.

Grupo de administración: PBS se administró a la misma dosis única que el conjugado anticuerpo-fármaco.

Grupo de administración: Cetuximab (Bristol-Myers Squibb Company) se administró en una dosis única de 10 mg/kg.

Grupo de administración: Pertuzumab (Roche Diagnostics, Inc.) se administró en una dosis única de 10 mg/kg.

Grupo de administración: El conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se administró en una dosis única de 10 mg/kg.

Grupo de administración: 30 minutos después de la

administración (administración de una dosis única) de cetuximab (Bristol-Myers Squibb Company), el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se administró en una dosis única de 10 mg/kg.

Grupo de administración: 30 minutos después de la administración (administración de una dosis única) de pertuzumab (Roche Diagnostics, Inc.), el conjugado anticuerpo-fármaco (16a) se administró en una dosis única de 10 mg/kg.

Los resultados se muestran en las Figuras 30A-30B. Se observó el efecto antitumoral provocada por el uso combinado en el modelo de tumor derivado del paciente de cáncer de estómago en la administración de cetuximab (Figura 30A) o pertuzumab (Figura 30B) y el conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con la administración de cada medicamento por sí solo. Estos resultados demostraron que el efecto farmacéutico del conjugado anticuerpo-fármaco es potenciado por el uso combinado de los mismos con cetuximab o panitumumab en el modelo de tumor derivado del paciente de cáncer. No se observó pérdida de peso en los ratones de los grupos tratados. Además, en una prueba antitumoral usando una línea celular de cáncer pancreático humano BxPC3, el conjugado anticuerpo-fármaco (13) exhibió un efecto antitumoral más fuerte en comparación con el grupo de administración de PBS o el grupo de administración U1-59. El

conjugado anticuerpo-fármaco también mostró un efecto antitumoral en el modelo fuerte en antitumoral *in vivo* usando una línea celular de cáncer de mama HER2 positivo JIMT1 que había adquirido resistencia al uso combinado de trastuzumab y pertuzumab o para emtansina trastuzumab.

Ejemplo de prueba 23 Seguridad de conjugado anticuerpo-fármaco para animal no humano

El conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco de la presente invención y la composición farmacéutica que contenía este conjugado anticuerpo anti-HER3-fármaco tienen una excelente seguridad como un agente terapéutico o profiláctico para una enfermedad. Por ejemplo, cuando el conjugado anticuerpo-fármaco (5), (10) o (13) se administró hasta 30 mg/kg a una rata de raza cruzada, dos veces en total con un intervalo de una vez por semana, no se observaron hallazgos de toxicidad seria a partir de cualquiera de los conjugados anticuerpo-fármaco como resultado de la observación hasta el día 7 después de la administración final. Además, cuando el conjugado anticuerpo-fármaco (5), (10), o (13) se administró hasta 30 mg/kg a un mono de raza cruzada, no se observaron hallazgos de toxicidad notables de cualquiera de los conjugados anticuerpo-fármaco como resultado de la observación durante 7 días.

Además, cuando el conjugado anticuerpo-fármaco (5), (10), o (13) se administró en una pluralidad de dosis a un

mono (intervalos de 3 semanas), no se observaron hallazgos de toxicidad notables de cualquiera de los conjugados anticuerpo-fármaco como resultado de la observación. De acuerdo con ello, el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención tiene excelente seguridad como una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de una enfermedad.

Texto libre del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-39

SEQ ID NO: 2 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-39

SEQ ID NO: 3 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-39

SEQ ID NO: 4 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-39

SEQ ID NO: 5 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano

U1-40

SEQ ID NO: 6 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-40

SEQ ID NO: 7 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-40

SEQ ID NO: 8 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-40

SEQ ID NO: 9 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-38

SEQ ID NO: 10 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-38

SEQ ID NO: 11 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-38

SEQ ID NO: 12 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-38

SEQ ID NO: 13 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-41

SEQ ID NO: 14 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-41

SEQ ID NO: 15 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-41

SEQ ID NO: 16 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-41

SEQ ID NO: 17 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-42

SEQ ID NO: 18 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-42

SEQ ID NO: 19 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-42

SEQ ID NO: 20 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-42

SEQ ID NO: 21 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-43

SEQ ID NO: 22 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-43

SEQ ID NO: 23 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-43

SEQ ID NO: 24 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-43

SEQ ID NO: 25 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-44

SEQ ID NO: 26 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-44

SEQ ID NO: 27 - Secuencia de nucleótidos que

codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-44

SEQ ID NO: 28 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-44

SEQ ID NO: 29 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-45

SEQ ID NO: 30 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-45

SEQ ID NO: 31 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-45

SEQ ID NO: 32 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-45

SEQ ID NO: 33 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-46

SEQ ID NO: 34 - Secuencia de aminoácidos de la

región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-46

SEQ ID NO: 35 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-47

SEQ ID NO: 36 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-47

SEQ ID NO: 37 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-47

SEQ ID NO: 38 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-47

SEQ ID NO: 39 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-48

SEQ ID NO: 40 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-48

SEQ ID NO: 41 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región

variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-49

SEQ ID NO: 42 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-49

SEQ ID NO: 43 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-49

SEQ ID NO: 44 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-49

SEQ ID NO: 45 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-50

SEQ ID NO: 46 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-50

SEQ ID NO: 47 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-50

SEQ ID NO: 48 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3

humano U1-50

SEQ ID NO: 49 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-51

SEQ ID NO: 50 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-51

SEQ ID NO: 51 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-51

SEQ ID NO: 52 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-51

SEQ ID NO: 53 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-53

SEQ ID NO: 54 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-53

SEQ ID NO: 55 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano

U1-53

SEQ ID NO: 56 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-53

SEQ ID NO: 57 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-55

SEQ ID NO: 58 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-55

SEQ ID NO: 59 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-55.1

SEQ ID NO: 60 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-55.1

SEQ ID NO: 61 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-57

SEQ ID NO: 62 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-57

SEQ ID NO: 63 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-57.1

SEQ ID NO: 64 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-57.1

SEQ ID NO: 65 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-58

SEQ ID NO: 66 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-58

SEQ ID NO: 67 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-58

SEQ ID NO: 68 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-58

SEQ ID NO: 69 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-59

SEQ ID NO: 70 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-59

SEQ ID NO: 71 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-59

SEQ ID NO: 72 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-59

SEQ ID NO: 73 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-52

SEQ ID NO: 74 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-52

SEQ ID NO: 75 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-52

SEQ ID NO: 76 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-52

SEQ ID NO: 77 - Secuencia de nucleótidos que

codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-61

SEQ ID NO: 78 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-61

SEQ ID NO: 79 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-61.1

SEQ ID NO: 80 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-61.1

SEQ ID NO: 81 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-61.1

SEQ ID NO: 82 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-61.1

SEQ ID NO: 83 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-62

SEQ ID NO: 84 - Secuencia de aminoácidos de la

región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-62

SEQ ID NO: 85 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-62

SEQ ID NO: 86 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-62

SEQ ID NO: 87 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-2

SEQ ID NO: 88 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-2

SEQ ID NO: 89 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-2

SEQ ID NO: 90 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-2

SEQ ID NO: 91 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región

variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-7

SEQ ID NO: 92 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-7

SEQ ID NO: 93 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-7

SEQ ID NO: 94 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-7

SEQ ID NO: 95 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-9

SEQ ID NO: 96 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-9

SEQ ID NO: 97 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-9

SEQ ID NO: 98 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3

humano U1-9

SEQ ID NO: 99 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-10

SEQ ID NO: 100 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-10

SEQ ID NO: 101 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-10

SEQ ID NO: 102 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-10

SEQ ID NO: 103 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-12

SEQ ID NO: 104 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-12

SEQ ID NO: 105 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano

U1-12

SEQ ID NO: 106 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-12

SEQ ID NO: 107 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-13

SEQ ID NO: 108 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-13

SEQ ID NO: 109 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-13

SEQ ID NO: 110 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-13

SEQ ID NO: 111 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-14

SEQ ID NO: 112 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-14

SEQ ID NO: 113 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-14

SEQ ID NO: 114 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-14

SEQ ID NO: 115 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-15

SEQ ID NO: 116 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-15

SEQ ID NO: 117 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-15

SEQ ID NO: 118 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-15

SEQ ID NO: 119 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-19

SEQ ID NO: 120 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-19

SEQ ID NO: 121 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-20

SEQ ID NO: 122 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-20

SEQ ID NO: 123 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-20

SEQ ID NO: 124 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-20

SEQ ID NO: 125 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-21

SEQ ID NO: 126 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-21

SEQ ID NO: 127 - Secuencia de nucleótidos que

codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-21

SEQ ID NO: 128 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-21

SEQ ID NO: 129 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-22

SEQ ID NO: 130 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-22

SEQ ID NO: 131 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-22

SEQ ID NO: 132 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-22

SEQ ID NO: 133 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-23

SEQ ID NO: 134 - Secuencia de aminoácidos de la

región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-23

SEQ ID NO: 135 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-23

SEQ ID NO: 136 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-23

SEQ ID NO: 137 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-24

SEQ ID NO: 138 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-24

SEQ ID NO: 139 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-24

SEQ ID NO: 140 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-24

SEQ ID NO: 141 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región

variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-25

SEQ ID NO: 142 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-25

SEQ ID NO: 143 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-25

SEQ ID NO: 144 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-25

SEQ ID NO: 145 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-26

SEQ ID NO: 146 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-26

SEQ ID NO: 147 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-26

SEQ ID NO: 148 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3

humano U1-26

SEQ ID NO: 149 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-27

SEQ ID NO: 150 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-27

SEQ ID NO: 151 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-27

SEQ ID NO: 152 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-27

SEQ ID NO: 153 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-28

SEQ ID NO: 154 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-28

SEQ ID NO: 155 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano

U1-28

SEQ ID NO: 156 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-28

SEQ ID NO: 157 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-31

SEQ ID NO: 158 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-31

SEQ ID NO: 159 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-31

SEQ ID NO: 160 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-31

SEQ ID NO: 161 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-32

SEQ ID NO: 162 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-32

SEQ ID NO: 163 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-32

SEQ ID NO: 164 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-32

SEQ ID NO: 165 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-35

SEQ ID NO: 166 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-35

SEQ ID NO: 167 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-35

SEQ ID NO: 168 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-35

SEQ ID NO: 169 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-36

SEQ ID NO: 170 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-36

SEQ ID NO: 171 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-36

SEQ ID NO: 172 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-36

SEQ ID NO: 173 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-37

SEQ ID NO: 174 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-37

SEQ ID NO: 175 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-37

SEQ ID NO: 176 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-37

SEQ ID NO: 177 - Secuencia de nucleótidos que

codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-34

SEQ ID NO: 178 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-34

SEQ ID NO: 179 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-34

SEQ ID NO: 180 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-34

SEQ ID NO: 181 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-1

SEQ ID NO: 182 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-1

SEQ ID NO: 183 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-1

SEQ ID NO: 184 - Secuencia de aminoácidos de la

región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-1

SEQ ID NO: 185 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-3

SEQ ID NO: 186 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-3

SEQ ID NO: 187 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-3

SEQ ID NO: 188 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-3

SEQ ID NO: 189 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-4

SEQ ID NO: 190 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-4

SEQ ID NO: 191 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región

variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-4

SEQ ID NO: 192 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-4

SEQ ID NO: 193 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-5

SEQ ID NO: 194 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-5

SEQ ID NO: 195 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-5

SEQ ID NO: 196 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-5

SEQ ID NO: 197 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-6

SEQ ID NO: 198 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3

humano U1-6

SEQ ID NO: 199 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-6

SEQ ID NO: 200 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-6

SEQ ID NO: 201 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-8

SEQ ID NO: 202 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-8

SEQ ID NO: 203 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-8

SEQ ID NO: 204 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-8

SEQ ID NO: 205 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano

U1-11

SEQ ID NO: 206 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-11

SEQ ID NO: 207 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-11

SEQ ID NO: 208 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-11

SEQ ID NO: 209 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-16

SEQ ID NO: 210 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-16

SEQ ID NO: 211 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-16

SEQ ID NO: 212 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-16

SEQ ID NO: 213 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-17

SEQ ID NO: 214 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-17

SEQ ID NO: 215 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-17

SEQ ID NO: 216 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-17

SEQ ID NO: 217 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-18

SEQ ID NO: 218 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-18

SEQ ID NO: 219 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-18

SEQ ID NO: 220 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-18

SEQ ID NO: 221 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-33

SEQ ID NO: 222 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-33

SEQ ID NO: 223 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-33

SEQ ID NO: 224 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-33

SEQ ID NO: 225 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-29

SEQ ID NO: 226 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-29

SEQ ID NO: 227 - Secuencia de nucleótidos que

codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-29

SEQ ID NO: 228 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-29

SEQ ID NO: 229 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-30

SEQ ID NO: 230 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuepo anti-HER3 humano U1-30

SEQ ID NO: 231 - Secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-30

SEQ ID NO: 232 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuepo anti-HER3 humano U1-30

SEQ ID NO: 233 - Cebador

SEQ ID NO: 234 - Cebador

SEQ ID NO: 235 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-1

SEQ ID NO: 236 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-1

SEQ ID NO: 237 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-1

SEQ ID NO: 238 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-1

SEQ ID NO: 239 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-1

SEQ ID NO: 240 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-1

SEQ ID NO: 241 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-2

SEQ ID NO: 242 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-2

SEQ ID NO: 243 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-2

SEQ ID NO: 244 - Secuencia de aminoácidos de la

CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-2

SEQ ID NO: 245 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-2

SEQ ID NO: 246 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-2

SEQ ID NO: 247 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-3

SEQ ID NO: 248 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-3

SEQ ID NO: 249 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-3

SEQ ID NO: 250 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-3

SEQ ID NO: 251 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-3

SEQ ID NO: 252 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-

3

SEQ ID NO: 253 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-4

SEQ ID NO: 254 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-4

SEQ ID NO: 255 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-4

SEQ ID NO: 256 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-4

SEQ ID NO: 257 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-4

SEQ ID NO: 258 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-4

SEQ ID NO: 259 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-5

SEQ ID NO: 260 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-5

SEQ ID NO: 261 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-5

SEQ ID NO: 262 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-5

SEQ ID NO: 263 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-5

SEQ ID NO: 264 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-5

SEQ ID NO: 265 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-6

SEQ ID NO: 266 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-6

SEQ ID NO: 267 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-6

SEQ ID NO: 268 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-6

SEQ ID NO: 269 - Secuencia de aminoácidos de la

CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-6

SEQ ID NO: 270 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-6

SEQ ID NO: 271 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-7

SEQ ID NO: 272 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-7

SEQ ID NO: 273 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-7

SEQ ID NO: 274 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-7

SEQ ID NO: 275 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-7

SEQ ID NO: 276 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-7

SEQ ID NO: 277 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-

8

SEQ ID NO: 278 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-8

SEQ ID NO: 279 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-8

SEQ ID NO: 280 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-8

SEQ ID NO: 281 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-8

SEQ ID NO: 282 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-8

SEQ ID NO: 283 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-9

SEQ ID NO: 284 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-9

SEQ ID NO: 285 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-9

SEQ ID NO: 286 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-9

SEQ ID NO: 287 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-9

SEQ ID NO: 288 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-9

SEQ ID NO: 289 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-10

SEQ ID NO: 290 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-10

SEQ ID NO: 291 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-10

SEQ ID NO: 292 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-10

SEQ ID NO: 293 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-10

SEQ ID NO: 294 - Secuencia de aminoácidos de la

CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-10

SEQ ID NO: 295 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-11

SEQ ID NO: 296 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-11

SEQ ID NO: 297 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-11

SEQ ID NO: 298 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-11

SEQ ID NO: 299 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-11

SEQ ID NO: 300 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-11

SEQ ID NO: 301 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-12

SEQ ID NO: 302 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-

12

SEQ ID NO: 303 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-12

SEQ ID NO: 304 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-12

SEQ ID NO: 305 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-12

SEQ ID NO: 306 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-12

SEQ ID NO: 307 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-13

SEQ ID NO: 308 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-13

SEQ ID NO: 309 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-13

SEQ ID NO: 310 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-13

SEQ ID NO: 311 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-13

SEQ ID NO: 312 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-13

SEQ ID NO: 313 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-14

SEQ ID NO: 314 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-14

SEQ ID NO: 315 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-14

SEQ ID NO: 316 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-14

SEQ ID NO: 317 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-14

SEQ ID NO: 318 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-14

SEQ ID NO: 319 - Secuencia de aminoácidos de la

CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-15

SEQ ID NO: 320 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-15

SEQ ID NO: 321 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-15

SEQ ID NO: 322 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-15

SEQ ID NO: 323 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-15

SEQ ID NO: 324 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-15

SEQ ID NO: 325 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-16

SEQ ID NO: 326 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-16

SEQ ID NO: 327 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-

16

SEQ ID NO: 328 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-16

SEQ ID NO: 329 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-16

SEQ ID NO: 330 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-16

SEQ ID NO: 331 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-17

SEQ ID NO: 332 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-17

SEQ ID NO: 333 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-17

SEQ ID NO: 334 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-17

SEQ ID NO: 335 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-17

SEQ ID NO: 336 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-17

SEQ ID NO: 337 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-18

SEQ ID NO: 338 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-18

SEQ ID NO: 339 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-18

SEQ ID NO: 340 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-18

SEQ ID NO: 341 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-18

SEQ ID NO: 342 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-18

SEQ ID NO: 343 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-19

SEQ ID NO: 344 - Secuencia de aminoácidos de la

CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-19

SEQ ID NO: 345 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-19

SEQ ID NO: 346 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-20

SEQ ID NO: 347 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-20

SEQ ID NO: 348 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-20

SEQ ID NO: 349 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-20

SEQ ID NO: 350 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-20

SEQ ID NO: 351 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-20

SEQ ID NO: 352 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-

21

SEQ ID NO: 353 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-21

SEQ ID NO: 354 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-21

SEQ ID NO: 355 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-21

SEQ ID NO: 356 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-21

SEQ ID NO: 357 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-21

SEQ ID NO: 358 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-22

SEQ ID NO: 359 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-22

SEQ ID NO: 360 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-22

SEQ ID NO: 361-ight chain CDRL1 amino acid sequence of the anti-HER3 human antibody U1-22

SEQ ID NO: 362 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-22

SEQ ID NO: 363 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-22

SEQ ID NO: 364 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-23

SEQ ID NO: 365 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-23

SEQ ID NO: 366 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-23

SEQ ID NO: 367 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-23

SEQ ID NO: 368 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-23

SEQ ID NO: 369 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-

23

SEQ ID NO: 370 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-24

SEQ ID NO: 371 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-24

SEQ ID NO: 372 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-24

SEQ ID NO: 373 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-24

SEQ ID NO: 374 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-24

SEQ ID NO: 375 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-24

SEQ ID NO: 376 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-25

SEQ ID NO: 377 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-25

SEQ ID NO: 378 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-25

SEQ ID NO: 379 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-25

SEQ ID NO: 380 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-25

SEQ ID NO: 381 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-25

SEQ ID NO: 382 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-26

SEQ ID NO: 383 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-26

SEQ ID NO: 384 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-26

SEQ ID NO: 385 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-26

SEQ ID NO: 386 - Secuencia de aminoácidos de la

CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-26

SEQ ID NO: 387 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-26

SEQ ID NO: 388 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-27

SEQ ID NO: 389 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-27

SEQ ID NO: 390 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-27

SEQ ID NO: 391 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-27

SEQ ID NO: 392 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-27

SEQ ID NO: 393 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-27

SEQ ID NO: 394 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-

28

SEQ ID NO: 395 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-28

SEQ ID NO: 396 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-28

SEQ ID NO: 397 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-28

SEQ ID NO: 398 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-28

SEQ ID NO: 399 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-28

SEQ ID NO: 400 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-29

SEQ ID NO: 401 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-29

SEQ ID NO: 402 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-29

SEQ ID NO: 403 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-29

SEQ ID NO: 404 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-29

SEQ ID NO: 405 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-29

SEQ ID NO: 406 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-30

SEQ ID NO: 407 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-30

SEQ ID NO: 408 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-30

SEQ ID NO: 409 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-30

SEQ ID NO: 410 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-30

SEQ ID NO: 411 - Secuencia de aminoácidos de la

CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-30

SEQ ID NO: 412 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-31

SEQ ID NO: 413 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-31

SEQ ID NO: 414 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-31

SEQ ID NO: 415 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-31

SEQ ID NO: 416 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-31

SEQ ID NO: 417 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-31

SEQ ID NO: 418 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-32

SEQ ID NO: 419 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-

32

SEQ ID NO: 420 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-32

SEQ ID NO: 421 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-32

SEQ ID NO: 422 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-32

SEQ ID NO: 423 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-32

SEQ ID NO: 424 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-33

SEQ ID NO: 425 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-33

SEQ ID NO: 426 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-33

SEQ ID NO: 427 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-33

SEQ ID NO: 428 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-33

SEQ ID NO: 429 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-33

SEQ ID NO: 430 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-34

SEQ ID NO: 431 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-34

SEQ ID NO: 432 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-34

SEQ ID NO: 433 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-34

SEQ ID NO: 434 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-34

SEQ ID NO: 435 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-34

SEQ ID NO: 436 - Secuencia de aminoácidos de la

CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-35

SEQ ID NO: 437 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-35

SEQ ID NO: 438 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-35

SEQ ID NO: 439 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-35

SEQ ID NO: 440 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-35

SEQ ID NO: 441 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-35

SEQ ID NO: 442 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-36

SEQ ID NO: 443 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-36

SEQ ID NO: 444 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-

36

SEQ ID NO: 445 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-36

SEQ ID NO: 446 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-36

SEQ ID NO: 447 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-36

SEQ ID NO: 448 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-37

SEQ ID NO: 449 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-37

SEQ ID NO: 450 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-37

SEQ ID NO: 451 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-37

SEQ ID NO: 452 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-37

SEQ ID NO: 453 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-37

SEQ ID NO: 454 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-38

SEQ ID NO: 455 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-38

SEQ ID NO: 456 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-38

SEQ ID NO: 457 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-38

SEQ ID NO: 458 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-38

SEQ ID NO: 459 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-38

SEQ ID NO: 460 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-39

SEQ ID NO: 461 - Secuencia de aminoácidos de la

CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-39

SEQ ID NO: 462 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-39

SEQ ID NO: 463 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-39

SEQ ID NO: 464 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-39

SEQ ID NO: 465 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-39

SEQ ID NO: 466 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-40

SEQ ID NO: 467 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-40

SEQ ID NO: 468 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-40

SEQ ID NO: 469 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-

40

SEQ ID NO: 470 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-40

SEQ ID NO: 471 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-40

SEQ ID NO: 472 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-41

SEQ ID NO: 473 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-41

SEQ ID NO: 474 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-41

SEQ ID NO: 475 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-41

SEQ ID NO: 476 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-41

SEQ ID NO: 477 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-41

SEQ ID NO: 478 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-42

SEQ ID NO: 479 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-42

SEQ ID NO: 480 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-42

SEQ ID NO: 481 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-42

SEQ ID NO: 482 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-42

SEQ ID NO: 483 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-42

SEQ ID NO: 484 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-43

SEQ ID NO: 485 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-43

SEQ ID NO: 486 - Secuencia de aminoácidos de la

CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-43

SEQ ID NO: 487 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-43

SEQ ID NO: 488 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-43

SEQ ID NO: 489 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-43

SEQ ID NO: 490 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-44

SEQ ID NO: 491 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-44

SEQ ID NO: 492 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-44

SEQ ID NO: 493 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-44

SEQ ID NO: 494 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-

44

SEQ ID NO: 495 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-44

SEQ ID NO: 496 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-45

SEQ ID NO: 497 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-45

SEQ ID NO: 498 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-45

SEQ ID NO: 499 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-45

SEQ ID NO: 500 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-45

SEQ ID NO: 501 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-45

SEQ ID NO: 502 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-46

SEQ ID NO: 503 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-46

SEQ ID NO: 504 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-46

SEQ ID NO: 505 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-47

SEQ ID NO: 506 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-47

SEQ ID NO: 507 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-47

SEQ ID NO: 508 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-47

SEQ ID NO: 509 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-47

SEQ ID NO: 510 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-47

SEQ ID NO: 511 - Secuencia de aminoácidos de la

CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-48

SEQ ID NO: 512 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-48

SEQ ID NO: 513 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-48

SEQ ID NO: 514 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-49

SEQ ID NO: 515 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-49

SEQ ID NO: 516 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-49

SEQ ID NO: 517 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-49

SEQ ID NO: 518 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-49

SEQ ID NO: 519 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-

49

SEQ ID NO: 520 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-50

SEQ ID NO: 521 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-50

SEQ ID NO: 522 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-50

SEQ ID NO: 523 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-50

SEQ ID NO: 524 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-50

SEQ ID NO: 525 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-50

SEQ ID NO: 526 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-51

SEQ ID NO: 527 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-51

SEQ ID NO: 528 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-51

SEQ ID NO: 529 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-51

SEQ ID NO: 530 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-51

SEQ ID NO: 531 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-51

SEQ ID NO: 532 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-52

SEQ ID NO: 533 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-52

SEQ ID NO: 534 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-52

SEQ ID NO: 535 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-52

SEQ ID NO: 536 - Secuencia de aminoácidos de la

CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-52

SEQ ID NO: 537 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-52

SEQ ID NO: 538 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-53

SEQ ID NO: 539 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-53

SEQ ID NO: 540 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-53

SEQ ID NO: 541 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-53

SEQ ID NO: 542 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-53

SEQ ID NO: 543 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-53

SEQ ID NO: 544 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-

55.1

SEQ ID NO: 545 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-55.1

SEQ ID NO: 546 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-55.1

SEQ ID NO: 547 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-55

SEQ ID NO: 548 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-55

SEQ ID NO: 549 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-55

SEQ ID NO: 550 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-57.1

SEQ ID NO: 551 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-57.1

SEQ ID NO: 552 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-57.1

SEQ ID NO: 553 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-57

SEQ ID NO: 554 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-57

SEQ ID NO: 555 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-57

SEQ ID NO: 556 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-58

SEQ ID NO: 557 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-58

SEQ ID NO: 558 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-58

SEQ ID NO: 559 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-58

SEQ ID NO: 560 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-58

SEQ ID NO: 561 - Secuencia de aminoácidos de la

CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-58

SEQ ID NO: 562 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-59

SEQ ID NO: 563 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-59

SEQ ID NO: 564 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-59

SEQ ID NO: 565 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-59

SEQ ID NO: 566 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-59

SEQ ID NO: 567 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-59

SEQ ID NO: 568 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-61.1

SEQ ID NO: 569 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-

61.1

SEQ ID NO: 570 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-61.1

SEQ ID NO: 571 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-61.1

SEQ ID NO: 572 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-61.1

SEQ ID NO: 573 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-61.1

SEQ ID NO: 574 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-61

SEQ ID NO: 575 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-61

SEQ ID NO: 576 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-61

SEQ ID NO: 577 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-62

SEQ ID NO: 578 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-62

SEQ ID NO: 579 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-62

SEQ ID NO: 580 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH1 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-62

SEQ ID NO: 581 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH2 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-62

SEQ ID NO: 582 - Secuencia de aminoácidos de la CDRH3 de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-62

SEQ ID NO: 583 - Secuencia de aminoácidos de ongitud completa de una cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 humano U1-59

SEQ ID NO: 584 - Secuencia de aminoácidos de ongitud completa de una cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 humano U1-59

Se hace constar que, con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la presente invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.