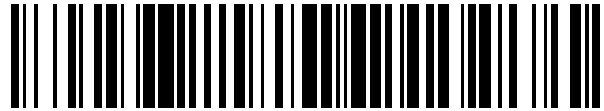


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 208 773**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/32** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**C12N 5/20** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.1996 E 96943576 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **11.06.2014 EP 0865448**

54

Título: **Apoptosis inducida por el anticuerpo monoclonal anti-Her2**

30

Prioridad:

**05.12.1995 US 568072**

45

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:

**14.07.2014**

73

Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)**

**One Amgen Center Drive**

**Thousand Oaks California 91320-1799, US**

72

Inventor/es:

**ARAKAWA, TSUTOMU y**

**KITA, YOSHIKO A.**

74

Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 208 773 T5

## DESCRIPCIÓN

Apoptosis inducida por el anticuerpo monoclonal anti-Her2.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-Her2 o fragmento del mismo que induce apoptosis en células que expresan Her2.

10 **Antecedentes de la invención**

El oncogén Her2 codifica para una glicoproteína asociada a membrana a la que se hace referencia como p185<sup>HER-2</sup> que tiene actividad tirosina kinasa. Her2 es un miembro de la subfamilia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF), que incluye el receptor EGF y los receptores Her3 y Her4 (Kraus y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9193-9197 (1989); Plowman y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90, 1746-1750 (1993)). La secuencia de Her2 fue descrita por Semba y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6497-6501 (1985)); Coussens y col. (Science 230, 974-976 (1985)). Schecter y col. describieron un gen de rata relacionado (Nature 312, 515-516 (1984)).

Se ha descrito una mayor expresión del oncogén Her2 en células y líneas celulares tumorales por parte de varios grupos (Coussens y col., antes citado; King y col., antes citado). La mayor expresión de Her2 se produce como resultado de amplificación génica o de una mayor expresión del gen de copia única. Estas observaciones sugerían que Her2 puede ser sobreexpresado en tejido canceroso humano. Slamon y colaboradores (Slamon y col., Science 235, 177-182 (1987); Slamon y col., Science 244, 707-712 (1989)) examinaron los niveles de expresión de Her2 en tumores tomados de una gran muestra de pacientes de cáncer de mama y de ovario. Se vio que casi un 30% de esas pacientes tenían amplificación y sobreexpresión del gen Her2, lo cual estaba asociado a un pobre desenlace clínico (aumento de las recidivas y baja razón de supervivencia), particularmente en pacientes de cáncer de mama positivo en nódulos. Las correlaciones dadas por Slamon han sido confirmadas en una serie de estudios (véanse, por ejemplo, Ro y col., Cancer Res. 49, 6941-6944 (1989); Walker y col., J. Cancer 60, 426-429 (1989); Wright y col., Cancer Res. 49, 2087-2090 (1989); Berchuck y col., Cancer Res. 50, 4087-4091 (1990); Kallioniemi y col., Int. J. Cancer 49, 650-655 (1991); Rilke y col., Int. J. Cancer 49, 44-49 (1991)).

La presencia de ciertos factores, tales como la sobreexpresión de Her2, que son indicativos de un pobre pronóstico, puede sugerir que es apropiada la terapia adyuvante después de la extirpación quirúrgica. La terapia adyuvante puede incluir quimioterapia a altas dosis y trasplante autólogo de médula ósea. Se ha descrito recientemente (Muss y col., N. Engl. J. Med. 330, 1260-1266 (1994)) que las pacientes de cáncer de mama que tienen tumores que exhiben sobreexpresión de Her2 disfrutaban de beneficios significativos gracias a la terapia adyuvante.

Por analogía con otras proteína tirosina kinasas de receptores, se supone que un ligando para Her2 estimula la fosforilación de los receptores. Se ha descrito que una serie de factores polipeptídicos aumentan la fosforilación de la tirosina de Her2 y se supuso que eran un ligando (Wen y col., Cell 64, 559-572 (1992); Holmes y col., Science 256, 1205-1210; Marchionni y col., Nature 362, 312-318 (1993); Falls y col., Cell 72, 801-815 (1993)). Sin embargo, no existe evidencia de que ninguno de estos factores sea un ligando verdadero que se une directamente a Her2 y estimula la fosforilación de los receptores. Una aproximación para salvar la presencia de ligando es generar un anticuerpo monoclonal ("mAb") de tipo ligando. Varios grupos han generado mAbs anti-Her2 usando un receptor Her2 de la superficie celular o un dominio extracelular purificado del receptor Her2 (Yarden, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2569-2573 (1990); Hanwerth y col., Br. J. Cancer 68, 1140-1145 (1993); Srinivas y col., Cancer Immunol. Immunother. 36, 397-402 (1993); Stancovaski y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8691-8695 (1991)). Estos mAbs estimulaban la fosforilación de la tirosina de Her2 de células con sobreexpresión, pero no fueron totalmente caracterizados en términos de unión a, y fosforilación de, cada uno de Her2, Her3 ó Her4 o en términos de la activación de la kinasa en células transfectadas con Her2.

Se han descrito con anterioridad los efectos inhibitorios del crecimiento de mAbs anti-Her2 sobre células de cáncer de mama (Tagliabue y col., Int. J. Cancer 47, 933-937 (1991); Hudziak y col., Mol. Cell. Biol. 9, 1165-1172 (1989); Drevin y col., Oncogen 2, 387-394 (1988); Fendly y col., Cancer Res. 50, 1550-1558 (1990), Hanwerth y col., antes citado; véase también la revisión de Vitetta y Uhr, Cancer Res. 54, 5301-5309 (1994)), pero estos efectos fueron interpretados como citostáticos, ya que la eliminación del anticuerpo permitía reanudar el crecimiento celular. Xu y col. (Int. J. Cancer 53, 401-408 (1993)) describieron anticuerpos anti-Her2 que eran citotóxicos para el crecimiento de células tumorales independientes de anclaje.

Se describió un mAb anti-receptor de EGF que inducía la apoptosis en la línea celular de carcinoma colorrectal humano, DiFi, que sobreexpresa el receptor de EGF, y que inducía cambios morfológicos a concentraciones de 5 a 20 nM. Estos efectos fueron interpretados en términos de bloqueo de la unión del EGF al receptor afín por el mAb competitivo y de falta de la actividad mitogénica del mAb (Wu y col., J. Clin. Invest. 95, 1897-1905 (1995)).

La apoptosis, o muerte celular programada, es una forma de muerte celular caracterizada por encogimiento de la célula y fragmentación del ADN. El colapso del núcleo celular es aparente, ya que la cromatina se fragmenta en

unidades mononucleosómicas simples o múltiples, un proceso mediado por una endonucleasa endógena. La apoptosis es distinta de la muerte celular necrótica, que da lugar a hinchamiento celular y liberación de los componentes intracelulares (Kerr y col., Br. J. Cancer 26, 239-257 (1972); Wyllie y col., Int. Rev. Cytol. 68, 251-306 (1980); Wyllie, Nature 284, 555-556 (1980)). Las células apoptóticas, sin liberar dichos componentes, son fagocitadas y por tanto degradadas (Savill y col., Nature 343, 170-173 (1990)). Por lo tanto, la apoptosis da lugar a un proceso eficiente para la eliminación de células no viables por los propios mecanismos de defensa del huésped.

Deshane, J. y col. ("Intracellular antibody knockout of the erbB2 oncoprotein achieves targeted eradication of tumor targets by induction of apoptosis", J. Invest. Med., Vol. 32, N° Supl. 2, Abril de 1995, página 328A) se refieren a la supresión por anticuerpos intracelulares de la oncoproteína erbB-2 y a la erradicación dirigida de blancos tumorales por inducción de apoptosis en este proceso. Deshane, J. y col. usan construcciones génicas diseñadas para codificar inmunoglobulinas de cadena sencilla (sFvs) con especificidad anti-ErbB-2 para la expresión intracelular de un anticuerpo anti-erbB-2.

Grim, J. y col. ("Induction of apoptotic cell death in erbB-2 overexpressing tumor cells of diverse histologic subtypes mediated by intracellular localization of an anti-erbB-2 sFv", Cancer Gene Therapy, Vol. 1, N° 4, Diciembre de 1994, páginas 333-334) se refieren a la inducción de muerte celular apoptótica en células tumorales que sobreexpresan erbB-2 de diversos subtipos histológicos mediada por la localización intracelular de un SSV anti-erbB-2. La construcción génica de Grim, J. y col. es administrada a la línea celular de carcinoma de ovario humana SKOV3 por el método del adenovirus-polilisina ("AdpL) y la expresión intracelular de un anticuerpo de cadena sencilla anti-erbB-2 conduce a una regulación decreciente de la expresión de erbB-2 de la superficie celular y a la inducción de apoptosis en las células tumorales.

Curiel, O. ("Strategies to accomplish targeted tumor cell cytotoxicity", Gene Therapy, Vol. 2, N° Supl. 1, Noviembre de 1995, página 520) se refiere a estrategias para conseguir la citotoxicidad de las células tumorales pretendidas. Curiel, O. Describe la expresión intracelular de un anticuerpo de cadena sencilla (sFv) anti-erbB-2 sFvs y la inducción de apoptosis.

WO 94/00136 A (6 de Enero de 1994) se relaciona con el uso de una combinación de anticuerpos monoclonales anti-erbB-2 para la prevención y el tratamiento de malignidades humanas por inducción de apoptosis.

Kita, Y. y col. ("ErbB receptor activation, cell morphology changes and apoptosis induced by anti-Her2 monoclonal antibodies", Bioch. Biophys. Res. Comm., Vol. 226, N° 1, 4 de Septiembre de 1996, páginas 59-69) se refieren a la activación de receptores erbB, a cambios en la morfología celular y a la apoptosis inducida por anticuerpos monoclonales anti-Her2.

WO 96/07321 A (14 de Marzo de 1996) se refiere a métodos para modular la función de proteínas en células usando homólogos de anticuerpos intracelulares.

Es un objeto de la invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para Her2 o fragmento de los mismos que induce apoptosis en células que expresan Her2 y de este modo "marcan" dichas células para su eliminación del huésped. Los anticuerpos son útiles para inducir apoptosis en tumores. Esto representa un perfeccionamiento substancial con respecto a la terapia de anticuerpos actualmente disponible para el cáncer, que conlleva típicamente la muerte de las células tumorales por anticuerpos junto con un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos producen generalmente efectos colaterales no deseados, que, si son graves, pueden dar lugar a una reducción o interrupción del tratamiento. La presente aproximación permite la muerte de las células tumorales por el sistema inmune del huésped, evitando así los efectos de los agentes citotóxicos y la necrosis de las células tumorales inducida por dichos agentes.

**Resumen de la invención**

Una realización de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-Her2 o fragmento del mismo que induce apoptosis en células que expresan Her2 en una cantidad suficiente para inducir la apoptosis en una mezcla con un adyuvante farmacéuticamente aceptable. Se ha visto que un anticuerpo que estimula la fosforilación de los receptores Her2 en líneas celulares tiene también el efecto inesperado de inducir cambios en células que expresan Her2 característicos de la apoptosis. Estos cambios incluyen fragmentación del ADN y pérdida de la viabilidad y se observan en la población de células tratadas en 24 horas. Dicho anticuerpo es útil para marcar células que sobreexpresan Her2 para su eliminación por los mecanismos de defensa del huésped.

En una realización preferida, el anticuerpo antes descrito reconoce un epitopo de un polipéptido Her2 que es reconocido por el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma ATCC N° HB-12078. El epitopo era distinto de los epitopos reconocidos por otros anticuerpos que también se unían a Her2, pero que no inducían apoptosis, lo que sugiere que la región de Her2 que interacciona con el anticuerpo es importante para provocar una respuesta apoptótica. Los anticuerpos que inducen apoptosis pueden existir como anticuerpos de longitud total que tienen regiones variables y constantes intactas o regiones de las mismas que conservan la unión a Her2 y la apoptosis. Los anticuerpos pueden ser producidos por líneas celulares de hibridomas o por métodos de ADN

recombinante.

Preferiblemente, el anticuerpo de la composición antes descrito es un anticuerpo monoclonal y, más preferiblemente, un anticuerpo humanizado. También se prefiere un anticuerpo según se ha descrito anteriormente que es un anticuerpo humano.

Otra realización de la presente invención consiste en una línea de células de hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal anti-Her2 que induce la apoptosis en células que expresan Her-2. También es una realización preferida de la presente invención una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente donde el fragmento es un fragmento F(ab) o Fab'. Preferiblemente, el anticuerpo de la composición es producido por la línea celular de hibridoma ATCC N° HB-12078 según la presente invención.

La presente invención proporciona también la línea celular de hibridoma ATCC N° HB-12078 y un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ATCC N° HB-12078.

Preferiblemente, las células que expresan Her2 son células tumorales. Más preferiblemente, las células tumorales derivan de cánceres mamarios, ováricos, prostáticos, gástricos y colorrectales.

Se predice que una serie de cánceres, incluyendo los cánceres mamarios, ováricos, prostáticos y colorrectales, son más invasivos y, por lo tanto, más letales cuando exhiben sobreexpresión de Her2. La correlación entre la expresión de Her2 y un pronóstico pobre (más recidivas y mayor mortalidad) en ciertos cánceres ha hecho de Her2 un objetivo importante para la terapéutica del cáncer.

una realización de la presente invención es el uso de una composición farmacéutica según se ha indicado como un medicamento para el tratamiento del cáncer. Preferiblemente, el medicamento, que induce apoptosis.

### Descripción de las figuras

Figura 1. Unión de mAb74 a sHer2 glicosilado y desglucosilado por análisis Western blot. (a) Grado de desglucosilación de Her2 por tinción de CHO después de una SDS-PAGE no reductora; (b) unión de mAb74 a Her glicosilado y desglucosilado según se analiza por Western blotting después de una SDS-PAGE no reductora.

Figura 2. Fosforilación de la tirosina de Her2 y Her3 inducida por estimulación de mAb en SKBR3. Se sembraron células SKBR3 en una placa de 48 pocillos durante 5 min. a 37°C durante 18 horas antes de la estimulación con mAb. Se solubilizaron las células con tampón de muestra SDS. Se sometieron las muestras solubilizadas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, seguido de Western blotting y sondaje con anticuerpo anti-fosfotirosina. (a) Todas las concentraciones de mAb eran de 250 nM en DMEM. Se usó un factor de diferenciación -  $\alpha$  2 nM neu (NDF $\alpha$ ) como control positivo. (b) Dependencia de la dosis del mAb de la fosforilación de tirosina.

Figura 3. Inhibición por el receptor Her2 soluble de la fosforilación de la tirosina del receptor inducida por mAb. El ensayo de fosforilación es similar al descrito en la Figura 2. Las células fueron incubadas con 250 nM de mAb con diferentes concentraciones de sHer2.

Figura 4. Fosforilación de la tirosina de receptores de líneas celulares transfectadas, Her2/32D y HEG/32D, inducida por estimulación de mAb. Para el ensayo de fosforilación, se obtuvo una pella celular por centrifugación, se lavó con PBS y se incubó después con 100  $\mu$ l de mAbs 250 nM en RPMI durante 5 min. a 37°C, seguido de finalización por adición de 1 ml de PBS helado y centrifugación a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se añadió tampón de muestra SDS a la pella centrifugada. Se sometió la muestra a SDS 6%-PAGE, seguido de Western blotting y sondaje con anti-PTY. Se usó muestra fosforilada basal A431 como control positivo.

Figura 5. Cambio morfológico celular inducido por mAbs. Se hicieron crecer células (a-d, Her2/MCF7; e,f, MDAMB453) con FBS al 1% en medio de cultivo con o sin mAb. Al cabo de 5 días, se observaron las células y se fotografiaron. (a,e) control (sin mAb). (b) mAb74 250 nM. (c) mAb83 250 nM. (d) mAb42b 250 nM. (f) mAb74 100 nM.

Figura 6. Detección de células apoptóticas con un método TUNEL modificado. Se incubaron células MDAMB453 (a-d) o células Her2/MCF7 (e,f) con o sin mAbs en medio de cultivo con un 1% de FBS durante un día, seguido de un ensayo de apoptosis. (a,e) control (sin mAb). (b) mAb74 50 nM. (c,f) mAb74 500 nM. (d) mAb42b 500 nM.

### Descripción detallada de la invención

Se han generado anticuerpos monoclonales (mAbs) que se unen a Her2 inmunizando ratones con Her2 soluble purificado. Se expresó y purificó el Her2 soluble como se describe en el Ejemplo 1. Se sometieron los mAbs que se unían a Her2 soluble en ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (EIA) a clonación por dilución y nuevo estudio por EIA y BIAcore para unión a Her2 (Ejemplo 2). Se seleccionaron diez clones para posterior análisis. Se vio que los anticuerpos purificados de estos clones se unían preferencialmente al Her2 soluble y muestran poca o ninguna unión al Her3 y Her4 solubles. Los efectos biológicos de anticuerpos seleccionados fueron estudiados en cuanto a la

dimerización de receptores, a la fosforilación de receptores y a los cambios en la fisiología celular. Todos los anticuerpos estudiados formaban complejos 2:1 (receptor:anticuerpo) con Her2 (Ejemplo 4). Tres diferentes anticuerpos estimulaban la fosforilación de los receptores Her2 y Her3 en células SKBR3 y de los receptores Her2, Her3 y Her4 en células MDAMB453. La fosforilación de todos los receptores resultó inhibida por el Her2 soluble, lo que sugiere que los efectos de tipo ligando de los mAbs están mediados directamente a través de Her2.

Un anticuerpo, mAb74, inducía cambios dramáticos en la fisiología de células que expresaban Her2 (Ejemplos 5 y 6). El tratamiento de células MCF7 transfectadas con un gen Her2 de longitud total o el tratamiento de células MDAMB453 que expresan Her2 de forma natural con mAb74 dieron lugar a un marcado cambio en la morfología celular y a muerte celular extensa. Otro anticuerpo, mAb83, mostró un efecto moderado sobre la morfología celular. En células no viables, se había inducido la apoptosis, según se evidenció por una extensa fragmentación del ADN. Sin embargo, una subpoblación de células escapó a la actividad de mAb74 y no eran apoptóticas.

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-Her2 o fragmento del mismo que induce apoptosis en células que expresan Her2 en una cantidad suficiente para inducir la apoptosis en una mezcla con un adyuvante farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa aquí, el término "apoptosis" se refiere a la muerte celular programada caracterizada por colapso nuclear y degradación del ADN. Las células que sufren apoptosis en respuesta a la composición farmacéutica de la invención tendrán al menos Her2 en la superficie celular y eventualmente Her3 y Her4. Se prefiere que las células o tejidos abordados exhiban niveles de expresión de Her2 mayores del nivel basal normal. La sobreexpresión de Her2 puede ser al menos un 10% mayor que el nivel basal normal, o más preferiblemente un 20% mayor, o más preferiblemente un 30% mayor. Tal como se usa aquí, el término "sobreexpresión de Her2" se refiere a cualquier nivel de expresión de Her2 que sea mayor que el nivel basal normal. Según se indica en la sección de Antecedentes, diversos cánceres se caracterizan por sobreexpresión de Her2. Un nivel basal de expresión de Her2 es típicamente el medido en tejidos y células no cancerosas que expresan Her2.

Los anticuerpos en la composición farmacéutica de la invención se unen a un epitopo de Her2, de tal forma que la unión de lugar a dimerización de Her2, fosforilación de Her2 y apoptosis celular. Tal como se usa aquí, el término "epitopo" se refiere a una región de Her2 que se une a un anticuerpo y que está protegida de la unión a un segundo anticuerpo. En una realización preferida, el epitopo se define por la unión de mAb74 a Her2. Este epitopo es distinto a los epitopos reconocidos por otros anticuerpos anti-Her2 (véase la Tabla 1). Es notable que otros anticuerpos anti-Her2 induzcan dimerización y fosforilación de Her2, pero no apoptosis, y que reconozcan epitopos sobre Her2 que son distintos de los reconocidos por mAb74.

Los anticuerpos en la composición farmacéutica de la invención pueden ser policlonales o monoclonales o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos policlonales y monoclonales murinos son producidos por técnicas inmunológicas estándar. Los fragmentos de anticuerpos abarcan aquellos anticuerpos que interactúan específicamente con Her2 e inducen apoptosis en células y tejidos que expresan Her2. Tal como se indica a continuación en los ejemplos, existe una correlación entre la actividad apoptótica del mAb74 y la fosforilación y dimerización de los receptores Her2. Por lo tanto, se prefiere que los fragmentos de anticuerpos en la composición farmacéutica de la invención conserven su estructura bivalente, que es probable que promueva la dimerización y activación de los receptores. También se incluyen anticuerpos producidos por medios recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos (región variable y región constante derivadas de especies diferentes) y anticuerpos injertados con "CDR" (región determinante de complementariedad derivada de una especie diferente), según se describe en las Patentes EE.UU. N° 4.816.567 y 5.225.539. Preferiblemente, los anticuerpos en la composición farmacéutica son al menos en parte de origen humano. Éstos incluyen anticuerpos humanizados, típicamente producidos por métodos recombinantes, donde las secuencias humanas constituyen todo o parte del anticuerpo. También se incluyen anticuerpos totalmente humanos producidos en ratones genéticamente alterados (véase la Solicitud PCT N° 93/12227).

Los anticuerpos en la composición farmacéutica de la invención pueden tener también un marcaje detectable unido a los mismos. El marcaje puede ser un marcaje fluorescente, de afinidad o isotópico. Como ejemplos se incluyen isotiocianato de fluoresceína (FITC) para la detección de fluorescencia, peroxidasa de rábano picante, que permite la detección por escisión de un substrato cromogénico, radioisótopos tales como  $I^{125}$  para la detección por autorradiografía y avidina/biotina para la detección con anticuerpos y la purificación por afinidad de antígenos y células portadoras de antígenos.

También se incluyen en la invención líneas celulares de hibridomas productoras de un anticuerpo monoclonal, donde el anticuerpo induce apoptosis en células y tejidos que expresan Her2. En una realización, hibridoma produce un anticuerpo monoclonal que reconoce un epitopo en Her2, de tal forma que un complejo anticuerpo-Her2 da lugar a inducción de apoptosis. Preferiblemente, el hibridoma produce un anticuerpo que reconoce el epitopo sobre Her2 que es reconocido por mAb74. La línea celular de hibridoma que produce mAb74 ha sido depositada en la American Type Culture Collection, Rockville, MD, el 4 de Abril de 1996 bajo el N° de acceso ATCC N° HB-12078.

Diversos cánceres se caracterizan por elevados niveles de expresión de Her2, incluyendo los cánceres de mama, de ovario, de próstata, gástrico y colorrectal (Press y col., en Effects of Therapy on Biology and Kinetics of The Residual

Tumor, Part A: Preclinical Aspects, pp. 209-221 (1990); Fukushige y col., Mol. Cell. Biol. 6, 955-958 (1986); Bargmann y col., en The Oncogene Handbook, pp. 107-119 (1988)). Se ha descrito una correlación entre un mal pronóstico y la sobreexpresión de Her2 en tejido canceroso. Los pacientes con mal pronóstico tienen típicamente una mayor aparición de recidivas y una mayor incidencia de mortalidad. Con frecuencia, dichos pacientes pueden beneficiarse de un régimen de tratamiento agresivo que incluye altas dosis de quimioterapia. Dicha terapia es cara y puede presentar riesgos para el paciente. Se ha propuesto usar anticuerpos antiHer2 en un régimen de tratamiento del cáncer para inhibir el crecimiento tumoral donde se usan anticuerpos junto con agentes citotóxicos. Una aproximación conlleva combinaciones de anticuerpos antiHer2 y agentes quimioterápicos (tales como cisplatina, 5-fluorouracilo y otros) para aumentar el efecto citotóxico de los fármacos quimioterápicos (se hace referencia a este efecto como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o "ADCC"). Una segunda aproximación emplea inmunotoxinas o conjugados de anticuerpos con agentes citotóxicos, tales como diversas toxinas de cadena A, proteínas inactivadoras de ribosomas y ribonucleasas. Otra aproximación implica el uso de anticuerpos biospecíficos diseñados para inducir mecanismos celulares para la muerte de tumores (véanse, por ejemplo, las Patentes EE.UU. N° 4.676.980 y 4.954.617).

Los anticuerpos en la composición farmacéutica de la presente invención son en sí mismos tóxicos para las células que expresan Her2 por inducción de apoptosis. La composición farmacéutica puede ser usada ventajosamente en el tratamiento del cáncer caracterizado por sobreexpresión de Her2, tal como el cáncer de mama, de ovario, gástrico, de próstata y colorrectal. El uso de la composición farmacéutica tiene ventajas significativas sobre las aproximaciones anteriores, en el sentido de que puede evitarse la administración de agentes citotóxicos, que son deletéreos para todas las células en crecimiento. Se anticipa que el uso de la composición farmacéutica sola para tratar el cáncer reducirá en gran medida los efectos colaterales no deseados asociados a la administración de altas dosis de agentes citotóxicos o de combinaciones de quimioterapia/terapia de combinación de anticuerpos. Alternativamente, si se usa un agente citotóxico, se espera que el uso de la presente composición farmacéutica junto con agentes citotóxicos sea ventajoso en el sentido de que se puede usar menos agente citotóxico para alcanzar el mismo efecto terapéutico. Se puede administrar un anticuerpo tal como mAb74 solo o en combinación con otros anticuerpos anti-Her2 que inducen apoptosis.

Se espera que la vía de administración para la composición farmacéutica de la invención sea parenteral. La administración puede ser por inyección subcutánea, intravenosa o intramuscular y puede ser una inyección en un solo bolo o por infusión continua. La cantidad de anticuerpo usado variará dependiendo de la naturaleza y la gravedad de la condición, pero, en general, variará entre aproximadamente 0,1 µg/kg de peso corporal y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal.

La invención proporciona una composición farmacéutica consistente en una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-Her2 que induce apoptosis con un adyuvante farmacéuticamente aceptable. El adyuvante es seleccionado entre uno o más de un diluyente, vehículo, conservante, emulsor, antioxidante y/o estabilizante. Los adyuvantes farmacéuticamente aceptables son conocidos para un experto en la técnica y se hace una revisión extensa de ellos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., A.R. Gennaro, ed., Mack, Easton, PA (1990). Las composiciones farmacéuticas son estériles, no pirogénicas y adecuadas para inyección. Tal como se usa aquí, una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a aquella cantidad de anticuerpo que proporciona un efecto terapéutico para una condición y régimen de administración dados. En la presente invención, un efecto terapéutico es la inducción de apoptosis en tumores caracterizados por sobreexpresión de Her2. Los anticuerpos usados en la composición son preferiblemente aquellos que no provocan una respuesta inmune cuando se administran a un paciente que necesita tratamiento. En una realización, los anticuerpos son anticuerpos humanos o humanizados que pueden ser preparados usando procedimientos conocidos para un experto en la técnica.

Los siguientes ejemplos son ofrecidos para mayor ilustración de la invención, pero no pretenden ser limitantes de su alcance.

#### **EJEMPLO 1**

Producción de dominios extracelulares Her2, Her3 y Her4

##### Clonación y expresión del dominio extracelular Her2 (Her2 soluble)

Se preparó una construcción de receptores Her2 solubles como sigue. Se digirió un clon de ADNc de longitud completa Her2 en el plásmido pLJ (pLJ está descrito en Korman y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2150-2054 (1987) con AatII, que corta una vez en la posición 2107 de la secuencia de ADN Her2 (numeración según Coussens y col., antes citado). Se cortó el plásmido linealizado con HindIII, que corta el 5' del ATG de iniciación, para liberar un fragmento de aproximadamente 2200 pb. Se clonó este fragmento en pDSRα2 5'-HindIII a 3'-Sall usando un ligante oligonucleotídico (AatII-Sall) que contenía una secuencia FLAG dentro de marco y un codón de finalización de la traducción. El ADNc resultante codifica para el dominio de unión a ligando extracelular Her2, que ocupa los residuos de aminoácidos 1-653, fusionado a la secuencia FLAG (subrayada):

Thr Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys PARADA

Se transfirió esta construcción en células CHO<sup>-</sup>. Se derivaron clones de una sola célula de la población seleccionada y se estudiaron en cuanto a la producción de Her2 soluble por análisis Western blot anti-FLAG y anti-Her2.

#### 5 Clonación y expresión del dominio extracelular Her3 (Her3 soluble)

Se aisló un clon de ADNc que contenía la secuencia completa de Her3 estudiando una librería de ADNc preparada a partir de SKBR3 (American Type Tissue Collection, Bethesda, MD, ATCC HTB 30). Se dividió la librería en 49 pools que contenían cada uno 3.200 clones individuales. Se transfirió el ADN plasmídico de cada pool a un filtro de nitrocelulosa (Schleicher y Schuell, Keene, NH). Se sintetizaron dos sondas oligonucleotídicas correspondientes al extremo 3' de las secuencias de Her3:

5'-CCACCCGGGTTAGAGGAAGA-3' y  
5'-AGTTACGTTCTCTGGGCATTA-3'

15 y se las usó para estudiar los filtros de la librería de ADNc de SKBR3. Se realizó la hibridación en SSC 6X, fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1%, SDS al 0,2%, EDTA 2 mM, solución de Denhardt 2X y 50 mg/ml de ADN de esperma de salmón a 42°C durante 16 horas. Se lavaron entonces los filtros a 42°C con SSC 2X, SDS al 0,2%, EDTA 2 mM durante 30 minutos y se expusieron a películas de rayos X a -80°C durante 2 días.

20 Se caracterizaron además diez pools que dieron señales positivas en la hibridación por análisis de reacción en cadena de polimerasa ("PCR") para determinar si también codificaban para la secuencia 5' de Her3. Se amplificó el ADN plasmídico de cada pool con cebadores oligonucleotídicos correspondientes al extremo 5' de las secuencias de Her3:

25 5'-CATGAGGGCGAACGACGCTCTG-3' y  
5'-CTTGGTCAATGTCTGGCAGTC-3'.

30 Se llevó a cabo la PCR durante 40 ciclos, cada ciclo a 94°C, 30 segundos; 50°C, 30 segundos, y 72°C, 30 segundos. Tres de los diez pools contenían un ADNc Her3 de longitud completa. Se volvieron a estudiar los tres pools por el procedimiento de hibridación de colonias de Lin y col. (Gene 44, 201-209 (1986)) hasta obtener clones únicos de cada pool. La secuenciación del ADNc reveló una secuencia idéntica a la publicada (Kraus y col., antes citado).

35 Se usó el plásmido pJT2-Her3 para la amplificación por PCR del dominio de Her3 soluble usando los siguientes cebadores:

Sentido: 5'-CGCTCTAGACCACCATGAGGGCGAACGACGCTCTGCA-3'  
Antisentido: 5'-CGCGGATCCGTCGACTCACTATGTCAGATGGGTTTTGCCG-AT-3'

40 Después de la digestión con las enzimas de restricción XbaI y Sall, se subclonó el fragmento de PCR de 1,9 kb en pDSR $\alpha$ 2 (Solicitud de Patente PCT N° WO91/05795), que había sido escindido con XbaI y Sall. Se confirmaron las secuencias Her3 en el plásmido resultante por secuenciación de ADN. Se usó el plásmido pDSR $\alpha$ 2/Her3 para transfectar células CHO<sup>-</sup> para la expresión de Her3 soluble.

#### 45 Clonación y expresión del dominio extracelular Her4 (Her4 soluble)

Se obtuvo un clon de ADNc Her4 de longitud completa por estudio de una librería de ADNc de cerebro fetal humano (Stratagene, San Diego, CA). Se prepararon dos sondas de ADNc Her4 por amplificación por PCR de ADNc de cerebro humano (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA). La sonda de ADNc 1 corresponde a las secuencias del extremo 5' de Her4 codificantes de los residuos de aminoácido 32 a 177 y la sonda de ADNc 2 corresponde a las secuencias del extremo 3' de Her4 codificantes de los residuos de aminoácido 1137 a 1254. (Plowman y col., antes citado). Se estudiaron aproximadamente 4 X 10<sup>6</sup> pfu de la librería de ADNc de cerebro fetal humano secuencialmente con la sonda del extremo 5' de Her4 y la sonda del extremo 3' de Her4. La solución de hibridación contenía SSC 6X, fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), SDS al 0,2%, EDTA 2 mM, pirofosfato de sodio al 0,1%, solución de Denhardt 2X, 50 mg/ml de ADN de esperma de salmón y formamida al 50%. Se hizo la hibridación a 42°C durante 16 horas. Se lavaron los filtros a 67°C con SSC 2X, SDS al 0,2%, EDTA 2 mM durante 60 minutos y luego fueron expuestos a películas de rayos X a -80°C durante la noche. La autorradiografía de los filtros mostró que 12 clones se hibridaban con la sonda del extremo 5' y otros 5 clones se hibridaban con la sonda del extremo 3'. Se purificaron los clones simples por nuevo plaqueo, se estudiaron por hibridaciones de sondas como se ha descrito y se secuenciaron los clones positivos.

65 Todos los clones de ADNc positivos secuenciados resultaron ser clones de ADNc Her4 parciales. Las secuencias resultaron ser idénticas a la secuencia de Her4 publicada (Plowman y col., antes citado), excepto por una corta delección/substitución en el dominio extracelular. Los aminoácidos 626 a 648 de la secuencia publicada de Her3 (NGPTSHDCIYYPWGTGHSTLPQHA) fueron substituidos por la secuencia peptídica IGSSIEDCIGLMD. Además, G en la posición de aminoácidos 573 de la secuencia de Plowman quedó substituido por D.

Como ninguno de los 17 clones contenía el ADNc de longitud completa de Her4, se fusionaron entre sí dos clones solapantes para generar un receptor Her4 de longitud completa usando las técnicas descritas por Maniatis y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). Un clon codificaba para los residuos de aminoácido de Her4 1 a 738 y otro codificaba para los residuos de aminoácido 588 a 1298. Estos dos clones solapantes fueron liberados del plásmido pBluescriptSK por digestiones con enzimas de restricción y montados en el plásmido pGEM4 para generar un ADNc Her4 de longitud completa.

Se construyó un receptor Her4 soluble por amplificación por PCR de un fragmento de Her4 de 700 pb codificante de los aminoácidos 409 a 639 del ADNc de longitud completa de Her4. Las secuencias de los dos cebadores usados en esta amplificación eran:

5'-CCAAACATGACTGACTTCAGTG-3' y  
5'-GGCCAATTGCGGCCGCTTACTAATCCATCAGGCCGATGCAG-TCTTC-3' y

se llevó a cabo la PCR durante 25 ciclos, siendo cada ciclo a 94°C, 30 segundos; 55°C, 30 segundos, y 72°C, 30 segundos. Se purificó este producto de PCR de 700 pb por electroforesis en gel de agarosa. Se digirió el plásmido pGEM4/Her4 con Not I y BstE II para producir dos fragmentos: uno de ellos contenía el plásmido pGEM4 y el ADNc del extremo 5' de Her4 codificante del dominio extracelular del receptor desde el aminoácido 1 hasta el 420 y el segundo fragmento se extendía desde el aminoácido 421 de Her4 hasta el extremo de la molécula de Her4. Estos dos fragmentos de ADN fueron separados en gel de agarosa y se recuperó el fragmento del extremo 5' de pGEM4/HER4. Se digirió el fragmento de PCR de 700 pb Her4 con BstE II y Not I y se ligó con el fragmento del extremo 5' de pGEM4/HER4. El ADNc resultante codifica para el dominio extracelular del receptor Her4, que se extiende a lo largo de los residuos de aminoácido 1 a 639. Se secuenció la porción amplificada por PCR para confirmar que no se habían producido errores en la PCR.

Se liberó la construcción de ADNc del Her4 soluble del plásmido pGEM4, se insertó en el plásmido pDSRa2 y se transfeció en células CHO<sup>d</sup> usando técnicas estándar (Maniatis y col., antes citado). Se derivaron clones de una sola célula de la población seleccionada y se estudiaron en cuanto a la producción de Her4 soluble por análisis BIAcore.

#### Purificación de los receptores sHer2, sHer3 y sHer4

Se concentró medio acondicionado de células CHO que expresaban Her2 soluble (sHer2) 12,5 veces con un dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial Pellicon (Amicon) equipado con una cassette de filtro MWCO 50 K (Filtron Technology) y se diafiltró el concentrado con tres volúmenes de fosfato de potasio 20 mM, NaCl 100 mM, pH 6,8. Se mezcló el concentrado diafiltrado con hidroxipatito (Calbiochem) equilibrado en tampón de diafiltración. Se diluyó la fracción no unida con igual volumen de agua y se aplicó después a una columna de Q-Sepharose de flujo rápido (Pharmacia) equilibrada en fosfato de potasio 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. Se eluyó la columna con un gradiente lineal de NaCl 50-600 mM. Se hizo un pool con las fracciones que contenían >95% de sHer2. También se purificaron sHer3 y sHer4 de medios condicionados de células CHO que expresaban estas proteínas de una forma similar al procedimiento antes descrito. Debido a su mayor valor de pI, sHer3 se unió a, y eluyó de, una columna de Q-Sepharose equilibrada en fosfato de potasio 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5.

#### **EJEMPLO 2**

##### Producción de anticuerpos anti-HER2

Los procedimientos para inmunizar animales, preparar fusiones y hacer un estudio selectivo de hibridomas y anticuerpos purificados fueron llevados a cabo como se describe en general en Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Ensayo inmunosorbente ligado a enzimas ("EIA"). Se revistieron placas de 96 pocillos con 2 µg/ml de sHer2, 2 µg/ml de sHer3 ó 2 µg/ml de sHer4 en un tampón de carbonato-bicarbonato. Después de bloquear, se añadió medio condicionado de hibridoma a la placa y se incubó durante 2 horas. Se aspiró el medio y se lavaron las placas antes de la adición de anticuerpo IgG de conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Boehringer Mannheim). Después de una hora de incubación, se aspiraron las placas y se lavaron cinco veces. Se detectó el anticuerpo unido con reactivo de color ABTS (Kirkegaard and Perry Labs., Inc.). Se determinó el grado de unión de anticuerpos monitorizando el aumento de absorbancia a 405 nm.

Clonación y determinación del subtipo de IgG. Se hizo una clonación de células únicas en una placa de 96 pocillos usando un método de dilución limitante. Se estudiaron los medios condicionados de clones de células únicas en cuanto a la producción de anticuerpos usando el EIA antes descrito. Se eligieron los clones mayores productores de anticuerpos para los estudios de expansión del crecimiento celular, determinación de subtipo y competición.

Análisis BIAcore. Se acoplaron covalentemente sHer2, sHer3 o sHer4 purificados a un chip sensor CM5 a través del grupo amina primaria usando 40 µl del receptor en acetato de Na 10 mM, pH 4,0 (10 µg de receptor por ml). Se

5 bloquearon los grupos no reaccionados en el chip sensor con una inyección de 50  $\mu$ l de clorhidrato de etanolamina 1 M (Pharmacia Biosensor AB). Cada ciclo de análisis consistía en una inyección de 40  $\mu$ l de sobrenadante de hibridomas (o mAbs purificados), seguido de inyección de 10  $\mu$ l de HCl 10 mM, para regenerar el chip. Se detectó la unión de los mAbs por el cambio en SPR, medido en unidades de resonancia ("RU"). Para la mayoría de las proteínas, 1.000 RU corresponden a una concentración superficial de aproximadamente 1 ng/mm<sup>2</sup>.

10 Preparación y estudio de líneas celulares de hibridomas. Se inyectó a 7 ratones Balb/c subcutáneamente tres veces a intervalos de tres semanas con 10  $\mu$ g de Her2 soluble. Se emulsionó la proteína con adyuvante RIBI. Se evaluaron los títulos séricos para Her2 a las 8 semanas y se seleccionaron los dos ratones con los títulos más altos y se les dio una inyección final IV de 10  $\mu$ g de Her2 soluble. Tres días después, se sacrificó a los dos ratones y se extirparon los bazo, se rompieron en un desintegrador de tejidos Stomacher y se filtraron y se recuperaron células simples. Después de tres lavados, se contaron las células de bazo, se mezclaron con células de mieloma de ratón (SP2/0) en una proporción de 3:1 (bazo:SP2/0) y se fusionaron en presencia de PEG al 50% (MW -peso molecular- 1.500). Se plaquearon las células fusionadas en un total de 10 placas de 96 pocillos a una concentración de células esplénicas de 1,25 X 10<sup>5</sup> por pocillo en un medio consistente en DMEM:RPMI (1:1), FBS al 10% y ORIGEN al 10%. La selección de células fusionadas fue llevada a cabo en medio de selección HAT. Se estudiaron los medios de cultivo por EIA en cuanto a anticuerpos para Her2 después de que las colonias de células viables ocuparan aproximadamente el 30% del pocillo. Se identificaron 68 positivos en 960 pocillos. Se clonaron las células de 43 pocillos por dilución limitante para producir colonias de una sola célula. Se marcaron los pocillos que contenían colonias únicas y, cuando crecieron al 30% del área del pocillo, se estudiaron en cuanto a anticuerpos anti-Her2 por EIA y BIAcore. El número final de clones de una sola célula era de 26, lo que representa 20 pocillos patrón originales.

25 En base a la unión de los sobrenadantes de hibridomas a sHer2 estudiada por EIA y BIAcore, se seleccionaron 10 clones para posterior estudio. Se inyectaron 5 X 10<sup>6</sup> células de cada uno de los 10 clones en ratones Balb/c imprimados y se recogió el fluido ascítico aproximadamente a los 10 días. Se purificaron las inmunoglobulinas por afinidad sobre una columna de proteína A MAPS II (BioRad). Se estudiaron los anticuerpos IgG purificados por EIA en cuanto a la unión a Her2, Her3 y Her4 como se ha descrito anteriormente. Se evaluó la capacidad de unión a 10 ng/ml ó 100  $\mu$ g/ml de mAbs. La unión de anticuerpos a sHer2 era fácilmente aparente a una concentración de anticuerpo de 10 ng/ml, mientras que la unión a sHer3 y sHer4 era insignificante incluso a una concentración de anticuerpo de 100  $\mu$ g/ml. Los datos demuestran que todos los clones, excepto mab83, se unen fuertemente a sHer2 sin unión detectable a sHer3 y sHer4.

35 Se determinaron los subtipos de IgG en sobrenadantes de hibridoma usando un Ab-Stat-Kit de Isotipos (Sangstate Medical Corp.) y en la Tabla I se muestran los resultados.

40 Unión de mAbs a sHer2, sHer3 y sHer4. Se investigó la unión de mAbs a sHer2 en un chip BIAcore usando 10  $\mu$ g/ml de mAbs y se evaluó como unidades de resonancia (RU). Tal como se muestra en la Tabla I, dos clones (52 y 58) mostraban más de 1.000 RU, 2 clones (35 y 42B) mostraban alrededor de 700 RU, 2 clones (43A y 74) mostraban alrededor de 300 RU, 2 clones (83 y 97) mostraban alrededor de 100 RU y 2 clones (29 y 86) mostraban menos de 100 RU. Los resultados indicaron un amplio rango de afinidad entre los diez clones. No se observó unión detectable de mAbs anti-sHer2 a sHer3 y sHer4. Estos resultados, junto con los datos del EIA, confirman que los mAbs generados frente a sHer2 se unen específicamente a sHER2 con poca o ninguna unión a sHer3 y sHer4.

Tabla I. Propiedades inmunológicas de los mAbs anti-Her2

ANTICUERPO MONOCLONA L ID	SUBTIPO IgG	GRUPO DE EPITOPO POR BIACORE	UNIÓN A sHER2 RU BIACORE DE 10 µg/ml	UNIÓN A sHER3 RU BIACORE DE 10 µg/ml	UNIÓN A sHER4 RU BIACORE DE 10 µg/ml	UNIÓN A sHER2 PLACA EIA D.O. DE 10 ng/ml	UNIÓN A sHER3 PLACA EIA D.O. DE 100 µg/ml	UNIÓN A sHER4 PLACA EIA D.O. DE 100 µg/ml
35	1	G1	781	-5	-15	0,97	0,1	0,11
42B	1	G2	745	-2,3	-15	2,35	0,1	0,09
43A	2A	G2	392	-5	-18	2,25	0,24	0,19
52	2B	G2	1600	-7	-18	2,45	0,25	0,23
58	1	G2	1266	2	-17	2,63	0,09	0,1
74	1	G3	372	15	-13	1,19	0,22	0,19
29	1	G4	76	0	-20	2,28	0,52	0,35
83	1	G4	115	-4	-16	0,09	0,37	0,21
86	1	G4	62	-9	-20	2,31	0,63	0,35
97	1	G4	109	-4	-17	2,36	0,26	0,16
IgG ratón						0,09	1,2	0,9

**Ensayo competitivo de epitopos.** Se determinó la especificidad epitópica de los mAbs anti-sHer2 uniendo parejas de anticuerpos monoclonales simultáneamente a sHer2 inmovilizado sobre un chip BIAcore. Los mAbs dirigidos contra diferentes epitopos deben unirse independientemente unos de otros, mientras que los mAbs dirigidos contra epitopos estrechamente relacionados deben interferir estéricamente en la unión de unos y otros. El primer mAb fue inyectado tres veces en un volumen de 40  $\mu$ l a una concentración de 10  $\mu$ g/ml sobre la superficie del sHer2 inmovilizado. Se inyectaron entonces 40  $\mu$ l del segundo mAb y se evaluó la capacidad para unirse simultáneamente al sHer2. Se regeneró la superficie del biosensor por inyección de 10  $\mu$ l de HCl 50 mM. También se analizó la unión cuando se invirtió la secuencia de inyección de cada pareja de mAbs. Este análisis dividió los mAbs en 4 grupos diferentes de especificidad epitópica, según se muestra en la Tabla I. No había ninguna correlación aparente entre el agrupamiento epitópico y actividad de fosforilación, excepto para mAb74, que parece tener un epitopo único con respecto a los otros mAbs.

### EJEMPLO 3

#### 15 Caracterización del epitopo de mAb74 en Her2

Se determinó el efecto de la glicosilación sobre la interacción de mAb74 con sHer2 como sigue. Se desnaturalizaron 60  $\mu$ g de sHer2 en BTP 20 mM, NaCl 40 mM, pH 7,4, durante cinco minutos en un baño de agua hirviendo en presencia de SDS al 0,4%. Después de la desnaturalización, se añadió NP-40 (Boehringer Mannheim) al 2% v/v y se diluyó la reacción con igual volumen de H<sub>2</sub>O DI antes de añadir 3 unidades de N-glicanasa recombinante (Genzyme). Se dejó que la reacción procediera con agitación suave a 37°C durante 20 h.

Se usó un kit de sistema de detección de glicoproteínas ECL (Amersham Life Science) para determinar el grado de desglicosilación. Se llevaron 0,25  $\mu$ g de cada de sHer2 y de sHer2 desglicosilado a un gel al 4-20% (Novex) en condiciones no reductoras y se depositaron luego en nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) durante 1 hora a 90 voltios en un aparato Bio-Rad mini PROTEAN II (BioRad) con enfriamiento. Después de depositarlos, se trató la membrana con metaperyodato de sodio 10 mM durante 20 minutos y luego biotina hidrazida 300 nM durante 60 minutos, ambos en acetato de sodio 100 mM, pH 5,5, a temperatura ambiente. Después de cada etapa, se lavó la membrana con tres cambios de PBS. Se añadió leche desecada no grasa (Carnation) a PBS a una concentración del 5% (p/v) y se incubó durante la noche a 4°C para bloquear la unión inespecífica. Se incubó la membrana a temperatura ambiente con estreptavidina peroxidasa de rábano picante conjugada con reactivos de detección ECL durante un minuto. Se expuso la mancha a Hyperfilm-ECL (Amersham Life Science). No se observó ninguna banda proteica en la muestra desglicosilada (Figura 1A), lo que indica que se había producido una completa desglicosilación.

Se cargaron sHer2 intacto y desglicosilado (25 ng de cada uno) y se llevaron a un gel al 4-20% (Novex) en condiciones reductoras y no reductoras. Se secó el gel durante 1 h a 90 voltios, se bloqueó con leche desecada no grasa al 5% y se detectó con 0,4  $\mu$ g/ml de mAb74, seguido de 1/5000 de anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante después de tres lavados de 10 minutos en PBS, Tween 20 al 0,1%. Se usó un kit ECL (Amersham Life Science) para la detección. Se observó que mAb74 se unía tanto al sHer2 glicosilado como al desglicosilado en condiciones no reductoras (Figura 1B). No se observó unión de anticuerpo en condiciones reductoras.

### EJEMPLO 4

#### 45 Dimerización de Her2 por anticuerpos anti-Her2

Típicamente, los anticuerpos tienen dos sitios de unión para antígenos, por lo que puede esperarse que los anticuerpos que se unen a receptores puedan promover la dimerización de receptores. Se empleó cromatografía de exclusión por tamaños ("SEC") con detección de la dispersión de luz para determinar la estequiometría de la unión de anticuerpos anti-Her2 a sHer2. El uso de SEC con dispersión de la luz en línea tiene ventajas sobre la SEC sola para determinar el peso molecular o la estequiometría de un complejo proteico. Mientras que la posición de elución de una proteína o complejo es indicativa del peso molecular usando SEC convencional, una medición de la dispersión de la luz es independiente de la posición de elución de una proteína o de un complejo. Además, el peso molecular obtenido de la dispersión de la luz refleja sólo el polipéptido si se usa el coeficiente de extinción del polipéptido solo en el análisis. El sistema de dispersión de la luz en línea/cromatografía de exclusión por tamaños utiliza tres detectores en serie: un detector de la dispersión de la luz (Wyatt Minidawn), un detector del índice de refracción (Polymer Laboratories PL-RI) y un monitor de la absorbancia UV a 280 nm (Knauer A293). Se usaron una columna de SEC Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con solución salina tamponada con fosfatos ("PBS") de Dulbecco y un asa de muestra de 100  $\mu$ l. Se operó el sistema a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Los complejos de mAb anti-sHer2 y sHer2 fueron preparados mezclando 55  $\mu$ l de 1,5 mg/ml de mAb35, 0,8 mg/ml de mAb52, 1,2 mg/ml de mAb58, 1,6 mg/ml de mAb42, 0,84 mg/ml de mAb74 y 0,89 mg/ml de mAb83 con 55  $\mu$ l de 2,0, 2,0, 1,3, 2,0, 2,0 y 2,0 mg/ml de sHer2, respectivamente. Los complejos de los anteriores mAbs y sHer3 fueron preparados de un modo similar. Se inyectaron muestras de 100  $\mu$ l de cada complejo en una columna Superdex 200 y se monitorizó la elución mediante detectores de la dispersión de la luz, del índice de refracción y de la absorbancia UV.

Para un complejo glicoproteico, el peso molecular de su polipéptido es proporcional a  $(uv)(LS)/[e_p(RI)^2]$  (Takagi, J. Chromatogr. 506, 409-446 (1990); Arakawa y col., Arch. Biochem. Biophys. 308, 267-273 (1994); Philo y col., J. Biol. Chem. 269, 27840-27846 (1994)), donde uv, LS y RI son las señales de los detectores de absorbancia, dispersión de la luz e índice de refracción, respectivamente y  $e_p$  es el coeficiente de extinción (la absorbancia de una solución de 1 mg/ml para un trayecto de 1 cm) del polipéptido. Para un complejo con una estequiometría conocida ( $A_mB_n$ ), su coeficiente de extinción puede ser calculado con la ecuación  $E_p = (mxE_AxM_A + nxE_BxM_B)/(mM_A + nM_B)$ , donde  $E_A$ ,  $E_B$ ,  $M_A$  y  $M_B$  son el coeficiente de extinción del polipéptido y el peso molecular de la proteína A o de la B.

Con objeto de obtener el peso molecular y la estequiometría de un complejo glicoproteico, se debe calcular su coeficiente de extinción. Sin embargo, el coeficiente de extinción de un complejo no puede ser calculado a menos que se conozca la estequiometría. Se utiliza un método coherente para resolver este problema, suponiendo varias posibilidades para la estequiometría del complejo. Para cada estequiometría conocida, se calcula un coeficiente de extinción y el correspondiente peso molecular experimental. Finalmente, se selecciona la estequiometría con la mejor consistencia entre el peso molecular experimental y el teórico como estequiometría correcta para el complejo. En la Tabla II se dan los resultados de este método.

Tabla II

Unión de mAb a sHer2 determinada por SEC/dispersión de la luz

Proteínas complejos	E L g.cm	MW experimental x 10 <sup>3</sup>	MW teórico x 10 <sup>3</sup>	¿Suposición de corrección?
SHer2	0,85	69		
mAb35	1,4	139		
mAb52	1,4	151		
mAb58	1,4	142		
mAb42b	1,4	136		
mAb74	1,4	145		
mAb83	1,4	141		
Suposición de la estequiometría del complejo sHer2-mAb35				
1sHer2:1mAb35	1,24	237	208	No
2:1	1,14	261	277	Sí
3:1	1,08	275	346	No
1:2	1,31	226	347	No
1:3	1,41	208	486	No
Suposición de la estequiometría del complejo sHer2-mAb52:				
1sHer2:1mAb52	1,24	252	220	No
2:1	1,14	275	289	Sí
3:1	1,08	289	358	No
1:2	1,31	240	371	No
1:3	1,41	223	522	No
Suposición de la estequiometría del complejo sHer2-mAb58:				
1sHer2:1mAb58	1,24	252	211	No
2:1	1,14	272	280	Sí
3:1	1,08	289	348	No
1:2	1,31	237	353	No
1:3	1,41	220	522	No
Suposición de la estequiometría del complejo sHer2-mAb42b:				
1sHer2:1mAb422:1	1,24	246	205	No
3:1	1,14	266	274	Sí
1:2	1,08	281	343	No
1:3	1,31	232	341	No
	1,41	214	477	No
Suposición de la estequiometría del complejo sHer2-mAb74:				
1sHer2:1mAb74	1,24	258	214	No
2:1	1,14	281	283	Sí
3:1	1,08	298	352	No
1:2	1,31	245	359	No
1:3	1,41	228	504	No

\*Los pesos moleculares (MW) de la tabla reflejan sólo el polipéptido.

Los pesos moleculares experimentales (con exclusión de los carbohidratos) para los complejos son más consistentes con los valores teóricos suponiendo 2 sHer2 por 1 mAb para cada uno de los 5 mAbs estudiados. Esto

demuestra que estos anticuerpos podrían dimerizar el Her2 expresado sobre la superficie celular. Sin embargo, como se mezclaron el sHer2 y los mAbs a 2:1, los resultados observados no excluyen la posibilidad de la formación de un complejo de 1 sHer2:1 mAb cuando el mAb está presente en exceso. No se observó ningún complejo para la mezcla de sHer2 y mAb83. La causa de ello puede ser la débil unión y la disociación del complejo durante el procedimiento cromatográfico. Las muestras que contenían sHer2:mAb en una proporción molar 2:1 eluyeron como un solo pico, lo que sugiere la formación de un complejo de 2 sHer2:1 mAb sin disociación durante el elución.

Para verificar que estos anticuerpos no dimerizan el Her3, se realizaron experimentos similares usando mezclas de mAbs y sHer3. No se detectaron complejos entre sHer3 y cualquiera de los mAbs.

## EJEMPLO 5

Fosforilación de receptores por anticuerpos anti-Her2

Se hicieron crecer células adherentes (SKBR3 o MDAMB453) en placas de 48 pocillos y se lavaron con DMEM 2-3 veces. Se obtuvo una pella de las células en suspensión (32D, Her2/32D, HEG/32D) por centrifugación y se lavó con PBS. HEG/32D es una línea celular transfectada con un receptor quimérico Her2/EGF (HEG) que tiene un dominio extracelular de Her2 que abarca los residuos de aminoácido 1-653 y dominios intracelulares y de transmembrana del receptor EGF que abarcan los residuos de aminoácido 646-1210. Se añadió solución de mAb o de ligando control al pocillo o al tubo de la pella y se incubó durante 5 minutos a 37°C. Se eliminó la solución y se solubilizaron las células con tampón de muestras SDS. Se sometieron las muestras a SDS-PAGE, seguido de Western blotting y sondaje con anti-fosfotirosina.

Se estudiaron doce clones de mAbs anti-sHer2 en cuanto a la estimulación de la fosforilación de la tirosina del receptor en células SKBR3. Tal como se muestra en la Figura 2-a, mAb74, 52 y 83 estimulaban potentemente la fosforilación de la tirosina de proteínas de 180-185 kDa en células SKBR3 en donde se identificaron tanto Her2 como Her3. La fosforilación era dependiente de dosis (Figura 2-b). Tal como se muestra en la Figura 3, la fosforilación de las células SKBR3 por mAb 74, 52 y 83 resultaba inhibida con sHer2. Para determinar qué receptor se fosforila, se inmunoprecipitaron Her2 y Her3 a partir de SKBR3 y se inmunoprecipitaron Her2, Her3 y Her4 a partir de MDAMB453 después de incubar los mAb y se analizaron por Western blots sondados con anti-fosfotirosina. Her2 y Her3 en SKBR3 o Her2, Her3 y Her4 en MDAMB453 fueron todos fosforilados en la tirosina.

Se ha realizado un ensayo similar con líneas celulares transfectadas, Her2/CHO y Her2/32D, para estudiar la interacción directa de mAb y Her2. Los mAbs 52, 74 y 83 no consiguieron estimular la fosforilación de Her2 en células transfectadas Her2/CHO y Her2/32D (la Figura 4 muestra los datos para las células Her2/32D solamente). Por el contrario, el receptor quimérico Her2/EGF se fosforilaba en HEG/32D (Figura 4). Se realizó un experimento posterior usando un transfectante Her2/32D que expresaba Her2 a niveles comparables a los del receptor quimérico HEG mostrado en la Figura 4. En estas condiciones, mAb74 estimula la fosforilación de Her2 en células Her2/32D. Los resultados sugieren que mAb74 activa la Her2 kinasa por homodimerización en células Her2/32D, pero que puede activar por heterodimerización en células SKBR3.

## EJEMPLO 6

Cambio morfológico y apoptosis celular inducidos por anticuerpos anti-Her2

Cambio morfológico celular. Se sembraron células en placas de 5 cm hasta una confluencia de aproximadamente el 20% y se añadieron mAbs después de 18 h. Al cabo de 5 días, se observaron las células con microscopía óptica, se fotografiaron y se contaron.

Se incubaron células Her2/MCF7 con 250 nM de mAb42b, mAb83 y mAb74. Después de 5 días de incubación, mAb74 causó muerte celular extensa y un cambio dramático en la morfología celular, primariamente alargamiento de la célula, como se muestra en la Figura 5. mAb83 causó un cambio moderado en la morfología celular y 42b dio lugar a poco cambio. El número de células viables después de la incubación con mAb74 con células Her2/MCF7 durante cinco días era sólo del 36% del control no sometido a incubación con mAb. mAb74 también indujo cambios morfológicos celulares en células MDAMB43 (Figura 5F).

Apoptosis celular. Se sembraron células en una cámara inclinada de 8 pocillos (Nunc) hasta una confluencia de aproximadamente el 60-70% y, 18 h después, se cambió el medio de cultivo a medio que contenía un 1% de FBS con o sin mAb. El día 1, las células fueron fijadas con formalina tamponada neutra ("NBF") al 4%, seguido de tres lavados con PBS. Después de secar las células, se detectó la apoptosis usando un método TUNEL modificado. TUNEL detecta los extremos de ADN 3'-OH generados por fragmentación del ADN marcando los extremos con dUTP conjugado con digoxigenina usando transferencia de desoxinucleotidilo terminal e incubando luego con anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano picante ("HRP"). Se detectó la HRP unida con el substrato, 3-amino-9-etilcarbazol (Sigma). La mayor parte de los reactivos usados procedían del kit de detección de apoptosis in situ Apop Tag (Oncor). Los anticuerpos conjugados a HRP eran de Boehringer Mannheim.

Vimos que mAb74 tiene el efecto más potente sobre la fosforilación de la tirosina del receptor (Fig. 1A), el cambio en la morfología celular (Fig. 5) y la muerte celular. Para aclarar el mecanismo de la muerte celular causada por mAb74, examinamos la apoptosis por un método TUNEL modificado. Tal como se muestra en la Figura 6, las células incubadas con mAb74 durante un día mostraban apoptosis, según se detectó por el color rojo usando el método TUNEL, mientras que la incubación con mAb42b era escasamente apoptótica en MDAMB453 y Her2/MCF7 (células MCF7 transfectadas con Her2 de longitud completa). El número de células apoptóticas inducidas por mAb74 50 mM era aproximadamente el 10% del número inducido por mAb74 500 nM, lo que indica que la apoptosis por mAb74 es dependiente de dosis (Figura 6). mAb74 también inducía apoptosis en células Her2/MCF7. Después de 5 días de incubación con mAb74, las células vivas aún estaban presentes en cultivo, pero no se pudo detectar apoptosis, lo que sugiere que las células apoptóticas se habían desprendido y las células vivas no estaban sufriendo un proceso apoptótico. Las células supervivientes habían experimentado cambios morfológicos, tales como los que se observan en la Figura 5.

## LISTA DE SECUENCIAS

## 15 (1) INFORMACIÓN GENERAL:

- (i) SOLICITANTE: AMGEN INC.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Apoptosis inducida por anticuerpos
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 9
- 20 (iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:

- (A) DESTINATARIO: Amgen Inc.
- (B) CALLE: 1840 Dehavilland Drive
- (C) CIUDAD: Thousand Oaks
- 25 (D) ESTADO: California
- (E) PAÍS: EE.UU.
- (F) ZIP: 91230-1789

## 30 (v) FORMA LEÍBLE DEL ORDENADOR:

- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flotante
- (B) ORDENADOR: PC IBM compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- 35 (D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30

## 35 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE SOLICITUD:
- 40 (C) CLASIFICACIÓN:

## (viii) INFORMACIÓN SOBRE EL ABOGADO/AGENTE:

- (A) NOMBRE: Winter Ph.D., Robert B.
- 45 (B) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: A-377

## (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 1:

## 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
- 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal

## (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

## (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 1:

60 Thr Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5 10

## 65 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 2:

## (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

	(A) LONGITUD: 20 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE HEBRA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
5	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 2:	
10	CCACCCGGGT TAGAGGAAGA	20
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 3:	
15	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 21 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE HEBRA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
20	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 3:	
25	AGTTACGTTTCTCTGGGCATT A	21
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 4:	
30	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 22 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE HEBRA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
35	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 4:	
40	CATGAGGGCG AACGACGCTC TG	22
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 5:	
45	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 21 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE HEBRA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
50	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 5:	
55	CTTGGTCAAT GTCTGGCAGT C	21
	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 6:	
60	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 37 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE HEBRA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
65	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc	

	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 6:	
	CGCTCTAGAC CACCATGAGG GCGAACGACG CTCTGCA	37
5	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 7:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
10	(A) LONGITUD: 42 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE HEBRA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
15	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 7:	
	CGCGGATCCG TCGACTCACT ATGTCAGATG GGTTTTGCCG AT	42
20	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 8:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
25	(A) LONGITUD: 22 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE HEBRA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
30	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 8:	
	CCAAACATGA CTGACTTCAG TG	22
35	(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 9:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
40	(A) LONGITUD: 46 pares de bases (B) TIPO: ácido nucleico (C) TIPO DE HEBRA: sencilla (D) TOPOLOGÍA: lineal	
45	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 9:	
	GGCCAATTGC GGCCGCTTAC TAATCCATCA GGCCGATGCA GTCTTC	46

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-Her2 o fragmento del mismo que induce apoptosis en células que expresan Her2 en una cantidad suficiente para inducir apoptosis, en una mezcla con un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 10 2. La composición farmacéutica de la Reivindicación 1, donde el anticuerpo reconoce un epítipo sobre un polipéptido Her2 que es reconocido por el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma ATCC N° HB-12078.
3. Una línea celular de hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal anti-Her2 que induce apoptosis en células que expresan Her2
- 15 4. La composición farmacéutica de la Reivindicación 1, donde fragmento es un fragmento F(ab) o Fab'.
5. Un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ATCC N° HB-12078.
6. Línea celular de hibridoma ATCC N° HB-12078.
- 20 7. La composición farmacéutica de la Reivindicación 1, donde las células que expresan Her2 son células tumorales.
8. La composición farmacéutica de la Reivindicación 7, donde las células tumorales derivan de cánceres de pulmón, ovario, próstata, gástrico y colorrectal.
- 25 9. Uso de la composición farmacéutica de la Reivindicación 1 para preparar un medicamento para el tratamiento del cáncer.
10. Uso según la Reivindicación 92, donde el medicamento induce apoptosis.
- 30 11. La composición de la Reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
12. La composición de la Reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 35 13. La composición de la Reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.

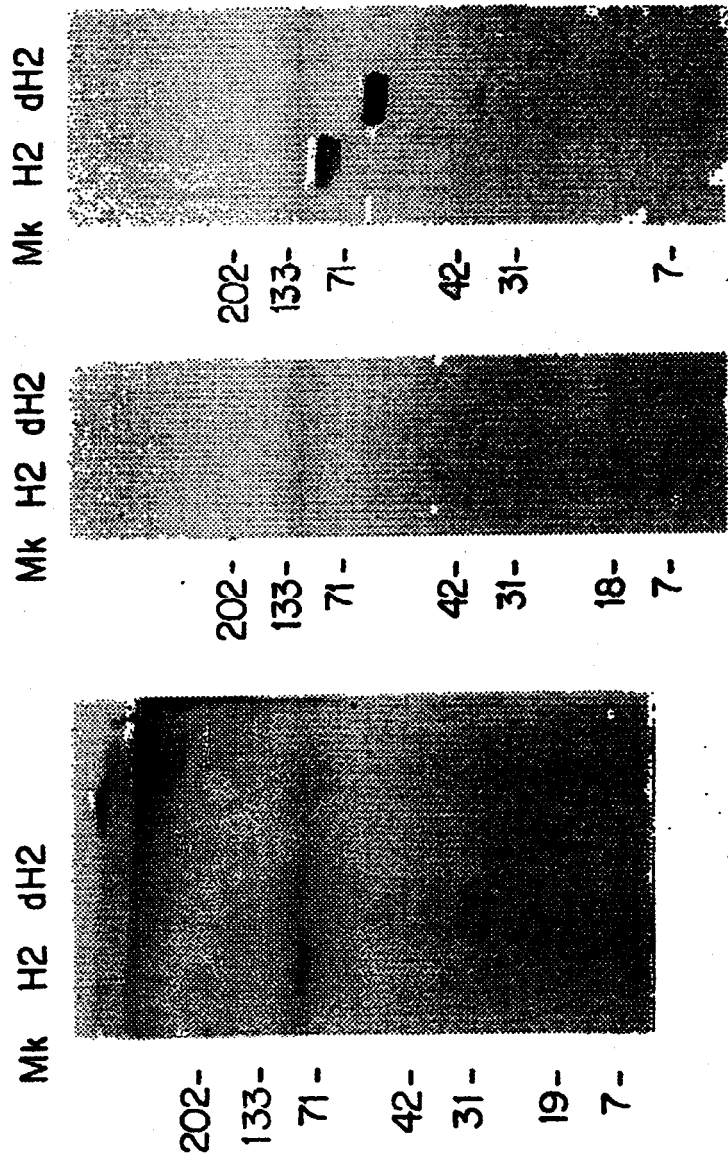
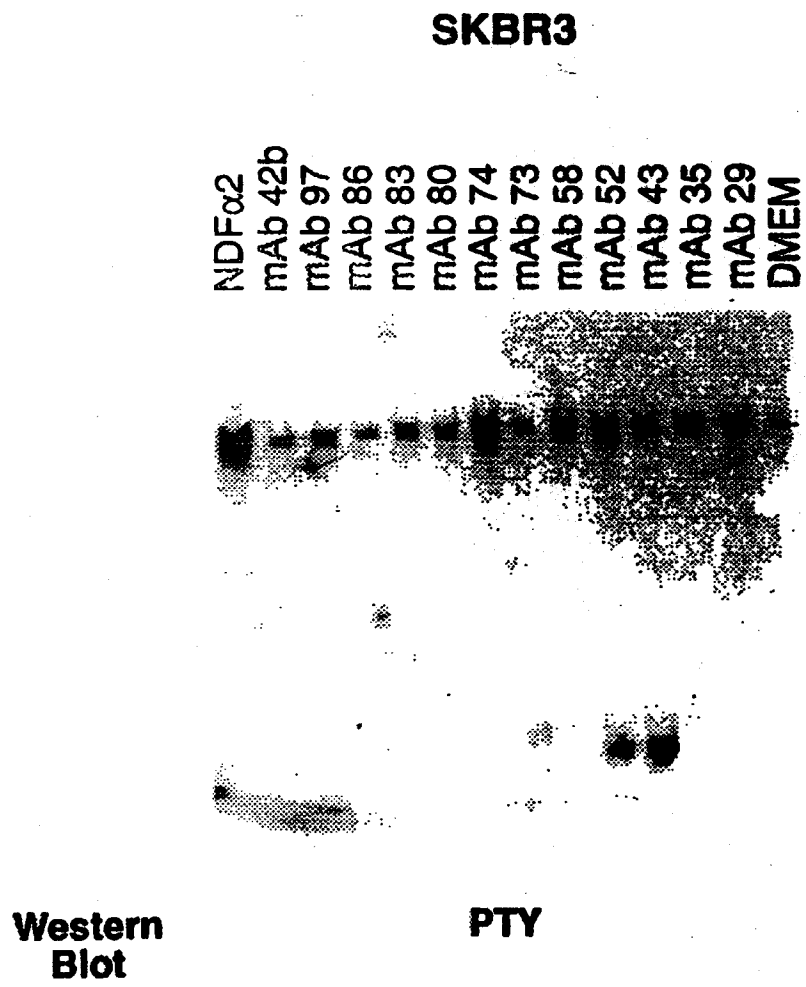


FIG.1B

FIG.1A



**FIG.2A**

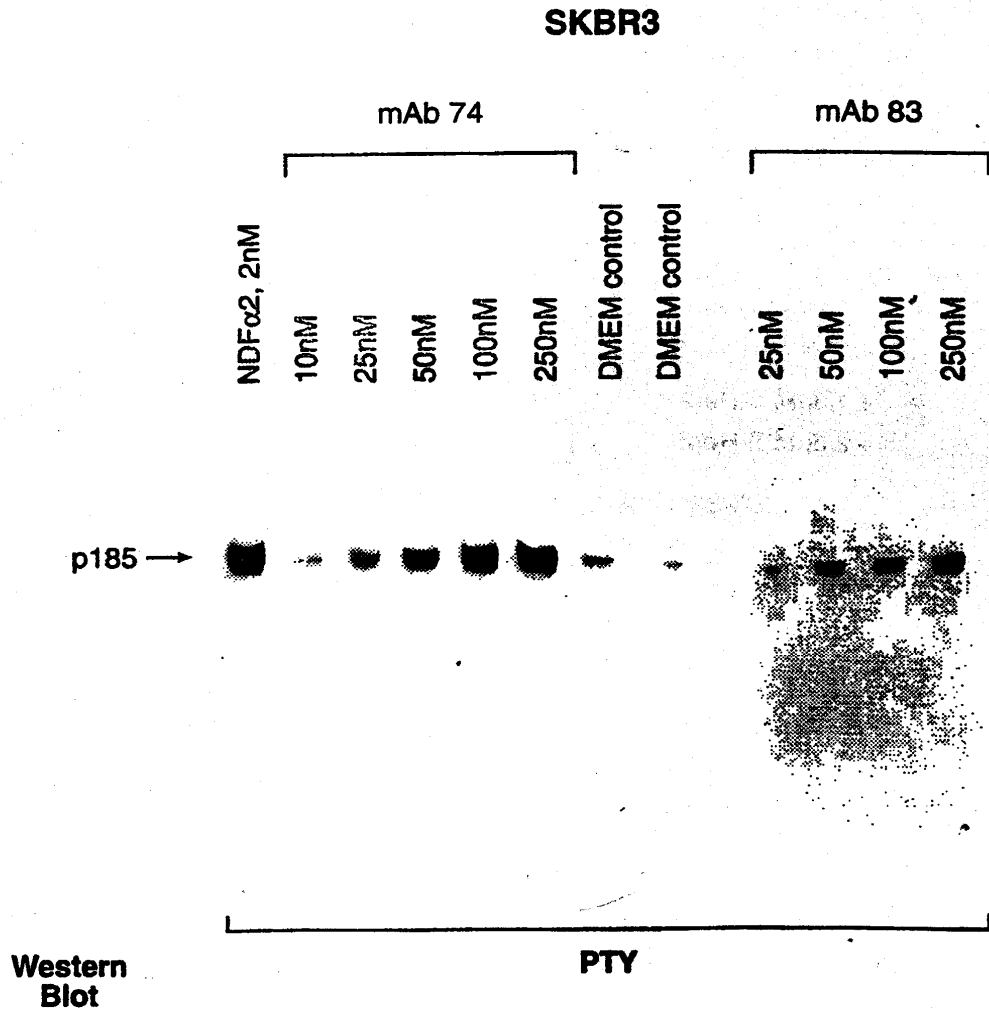
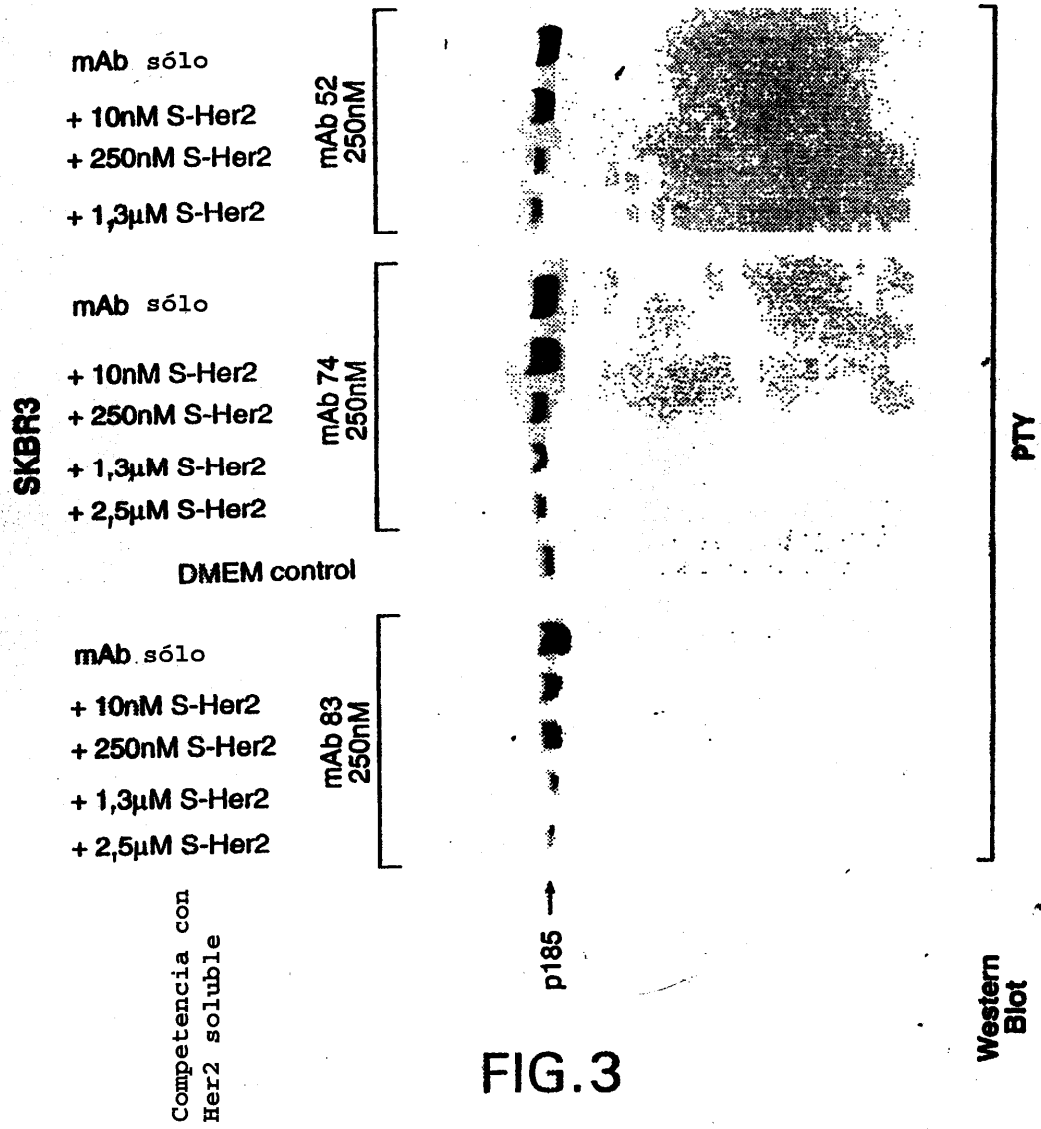
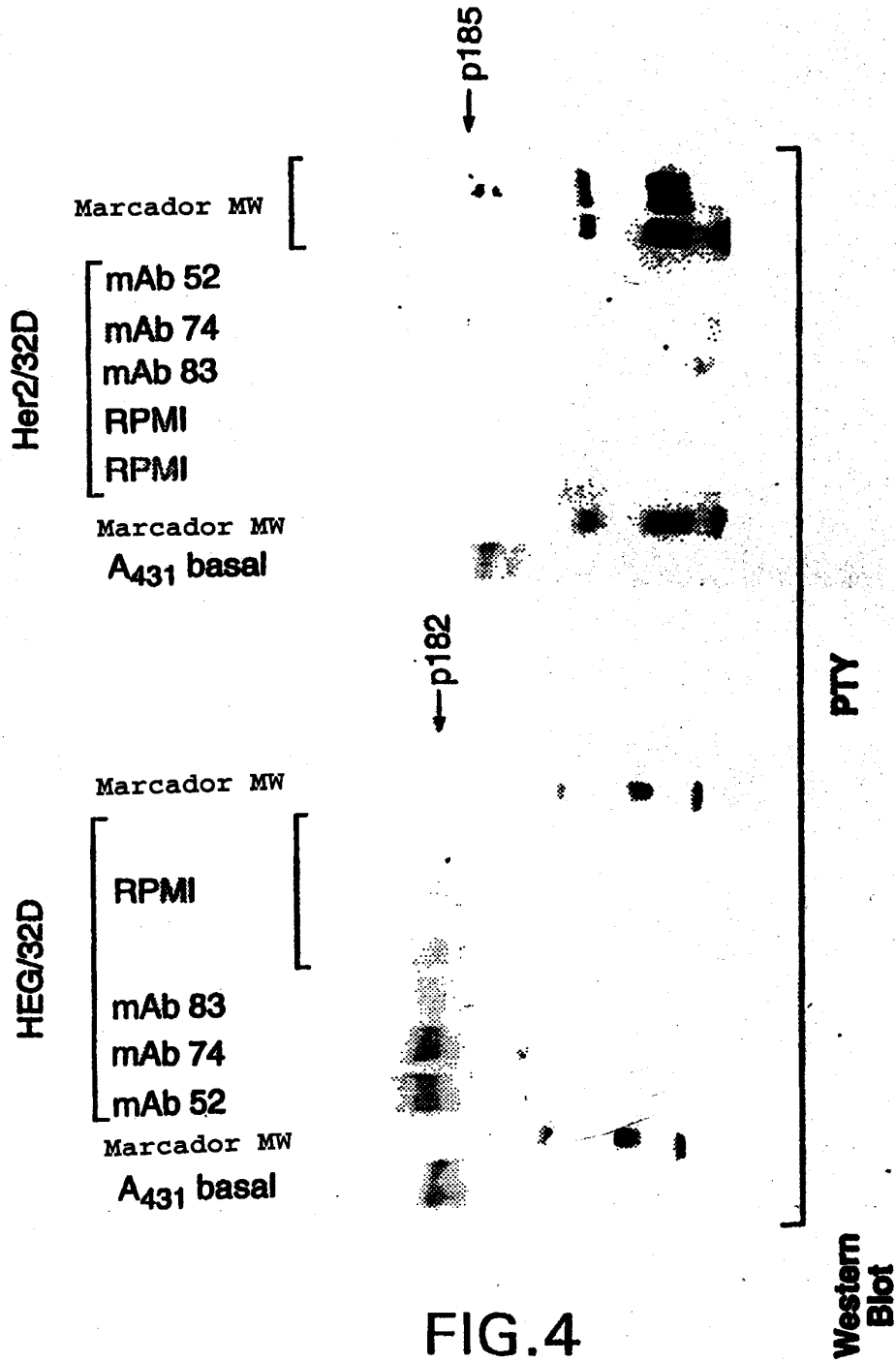
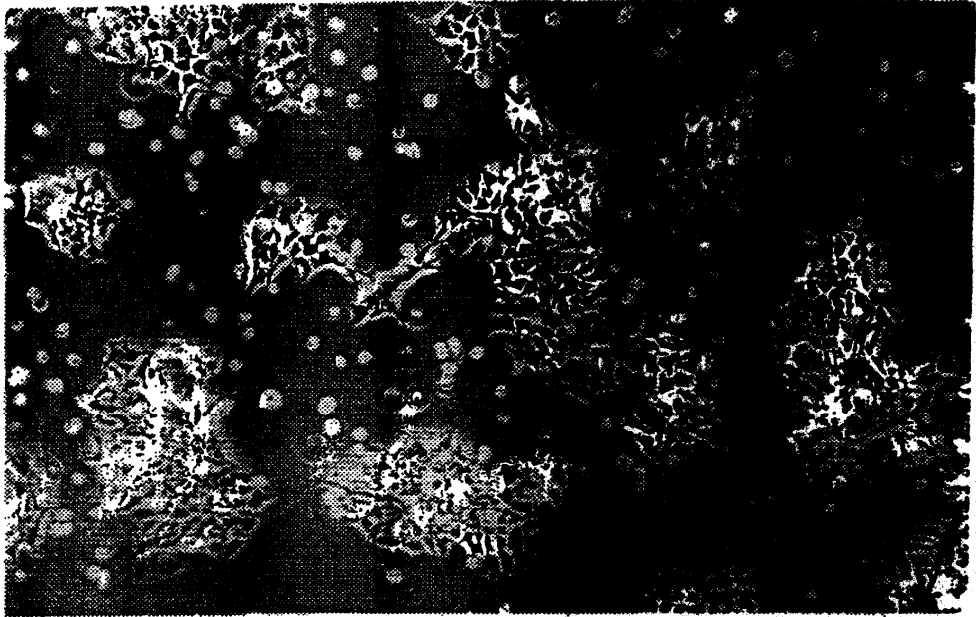


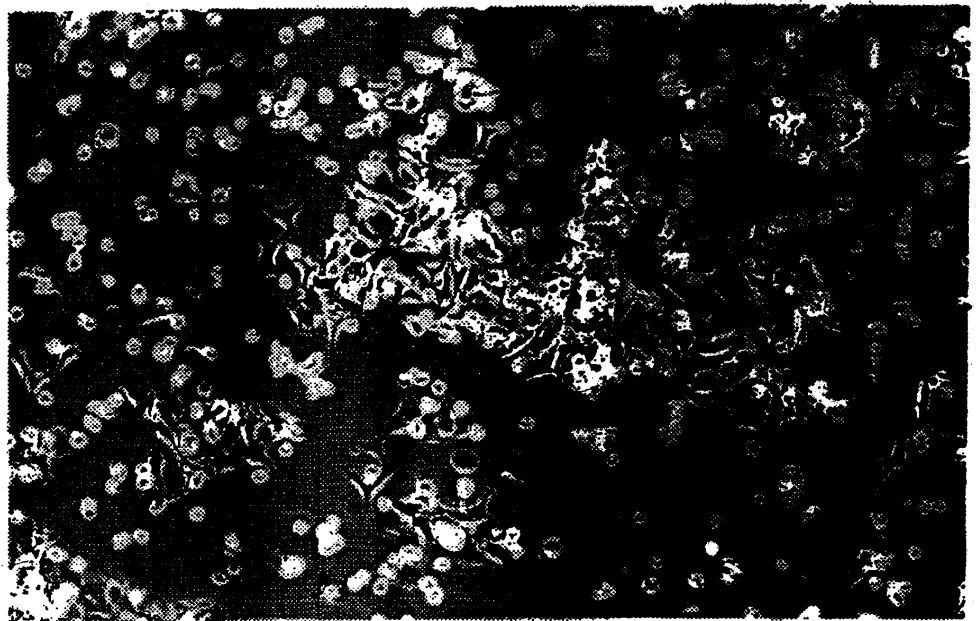
FIG.2B



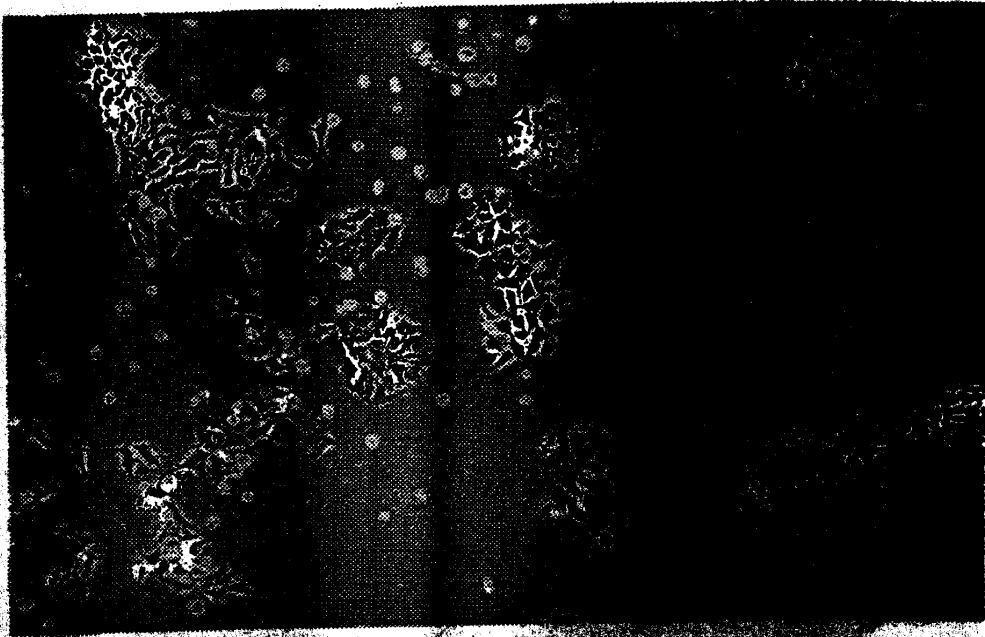




**FIG.5A**



**FIG.5B**



**FIG.5C**



**FIG.5D**

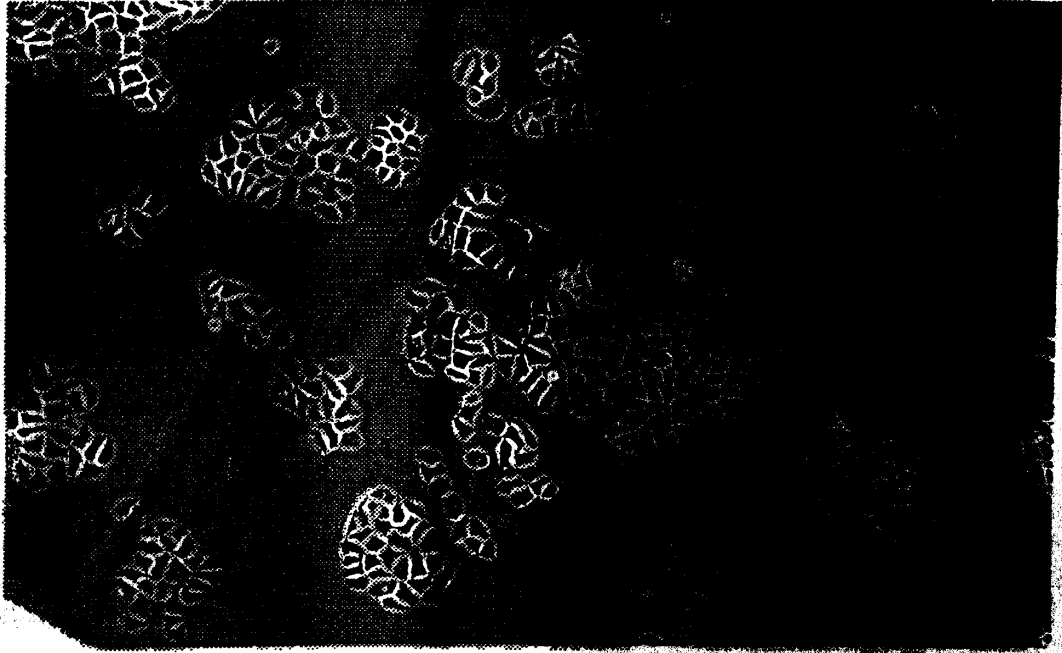


FIG.5E

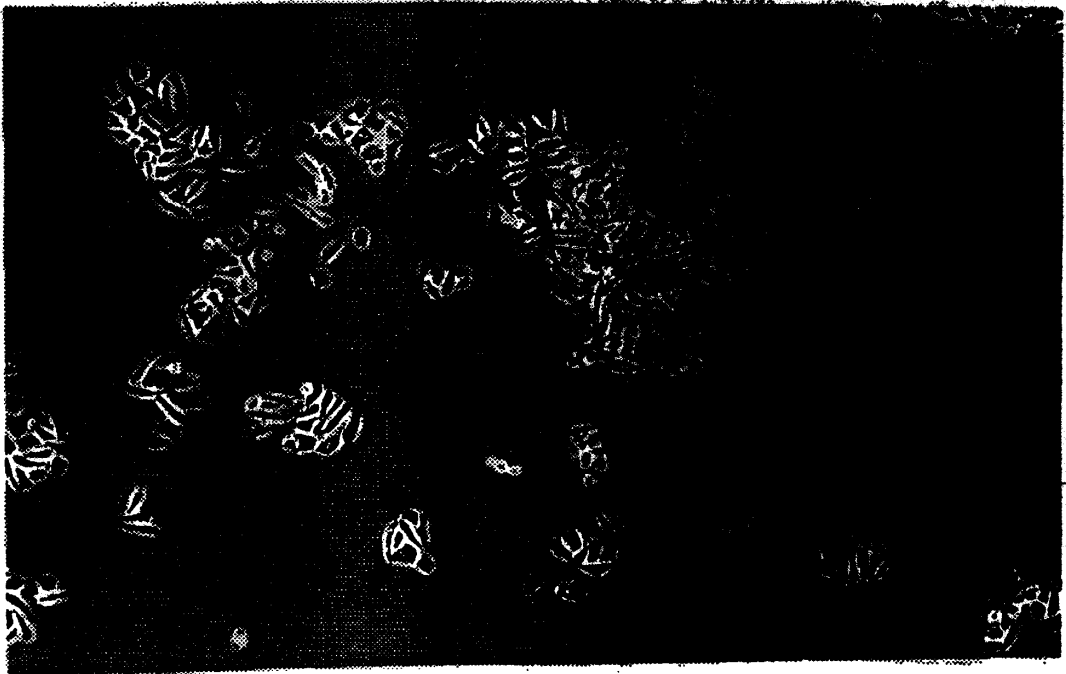
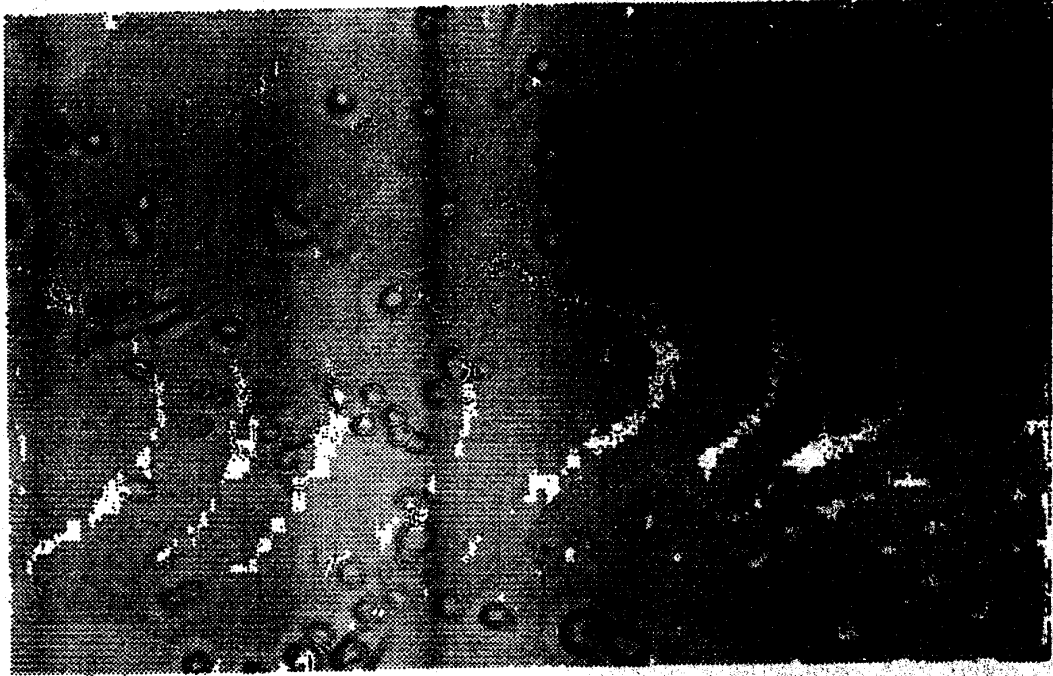


FIG.5F



**FIG.6A**



**FIG.6B**



FIG.6C

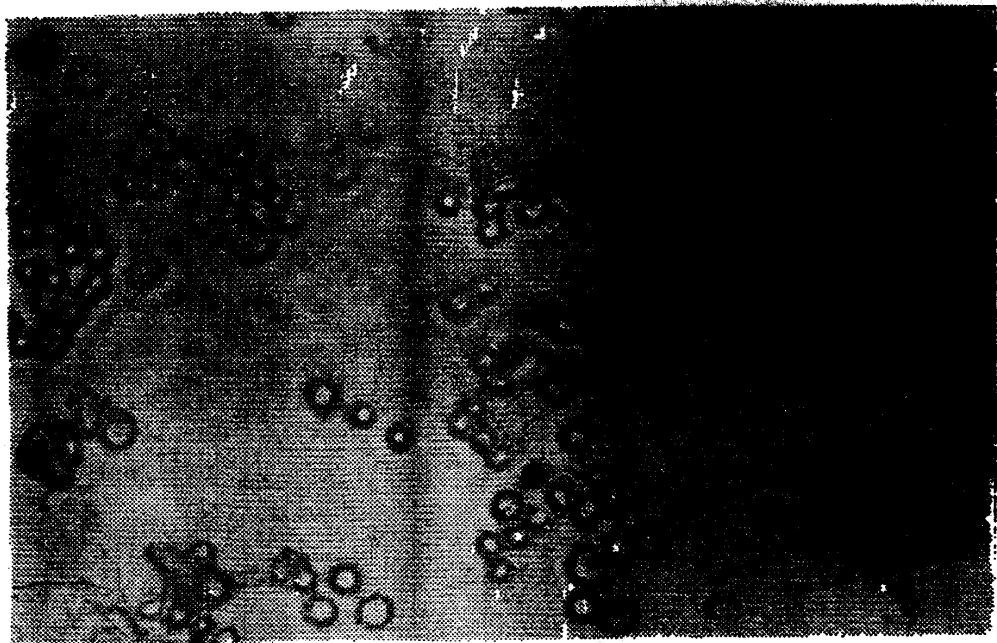
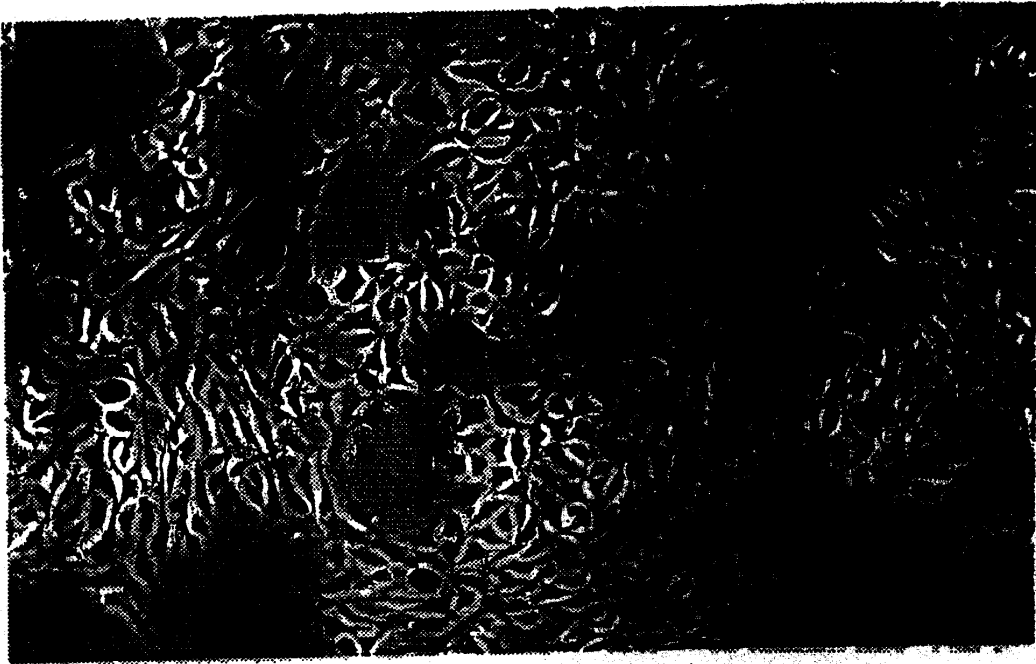


FIG.6D



**FIG.6E**



**FIG.6F**