



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 320 311**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

⑫

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **00928916 .6**

⑯ Fecha de presentación : **09.05.2000**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1187632**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **20.03.2002**

⑭ Título: **Tratamiento con anticuerpos anti-ErbB2.**

⑩ Prioridad: **14.05.1999 US 134085 P**

⑬ Titular/es: **Genentech, Inc.**  
**1 DNA Way**  
**South San Francisco, California 94080-4990, US**

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.05.2009**

⑭ Inventor/es: **Cohen, Robert, L.**

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.05.2009**

⑭ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

**ES 2 320 311 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento con anticuerpos anti-ErbB2.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer con anticuerpos anti-ErbB2.

10 **Antecedentes de la invención**

Se ha identificado que los proto-oncogenes que codifican factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento juegan papeles importantes en la patogénesis de varios tumores humanos, incluyendo cáncer de mama. Se ha observado que el gen *erbB2* humano (también conocido como *HER2* o *c-erbB-2*), que codifica un receptor 15 glicoproteína transmembrana de 185 kD (p185<sup>HER2</sup>) relacionado con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se sobreexpresa en aproximadamente de un 25% a un 30% del cáncer de mama humano (Slamon *et al.*, *Science* 235: 177-182 [1987]; Slamon *et al.*, *Science* 244: 707-712 [1989]).

Varias líneas de evidencia respaldan un papel directo para ErbB2 en la patogénesis y agresividad clínica de los 20 tumores que sobreexpresan ErbB2. Se ha observado que la introducción de ErbB2 en células no neoplásicas provoca su transformación en tumor (Hudziak *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7159-7163 [1987]; DiFiore *et al.*, *science* 237: 78-182 [1987]. Se observó que los ratones transgénicos que expresan HER2 desarrollaban tumores mamarios (Guy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10578-10582 [1992]).

25 Se han descrito anticuerpos dirigidos contra la proteína ErbB2 humana y la proteína codificada por el equivalente en la rata del gen *erbB2* (*neu*). Drebin *et al.*, *Cell* 41: 695-706 (1985) se refiere a un anticuerpo monoclonal IgG2a que está dirigido contra el producto génico *neu* de rata. Este anticuerpo llamado 7.16.4 provoca la submodulación de la expresión de p185 de la superficie celular en células B104-1-1 (células NIH-3T3 transfectadas con el protooncogén *neu*) e inhibe la formación de colonias de estas células. En Drebin *et al.* *PNAS (USA)* 83: 9129-9133 (1986), se observó que el anticuerpo 7.16.4 inhibía el crecimiento tumorigénico de las células NIH-3T3 transformadas por *neu*, así como células de neuroblastoma de rata (de las que se aisló inicialmente el oncogén *neu*) implantadas en ratones desnudos. Drebin *et al.* en *Oncogene* 3:387-394 (1988) describen la producción de una panel de anticuerpos contra el producto génico *neu* de rata. Se observó que todos los anticuerpos ejercían un efecto citostático en el crecimiento de 30 células transformadas por *neu* suspendidas en agar suave. Los anticuerpos de los isotipos IgM, IgG2a e IgG2b eran capaces de mediar en la lisis *in vitro* significativa de células transformadas por *neu* en presencia de complemento, mientras que ninguno de los anticuerpos era capaz de mediar los niveles elevados de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de las células transformadas por *neu*. Drebin *et al.* *Oncogene* 2: 273-277 (1988) describen que las mezclas de anticuerpos reactivos con dos regiones diferentes en la molécula p185 dan lugar a efectos antitumorales 35 sinérgicos en células NIH-3T3 transformadas por *neu*, implantadas en ratones desnudos. Los efectos biológicos de los anticuerpos anti-*neu* se describen en Myers *et al.*, *Meth. Enzym.* 198: 277-290 (1991). Véase también WO 94/22478 40 publicada el 13 de octubre de 1994.

Hudziak *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 9(3): 1165-1172 (1989) describen la generación de un panel de anticuerpos anti-ErbB2 que se caracterizaron utilizando la línea de células de tumor de mama humana SKBR3. La proliferación celular 45 relativa de las células SKBR3 tras la exposición a los anticuerpos se determinó mediante tinción con violeta cristal de las monocapas después de 72 horas. Utilizando este ensayo, se obtuvo la máxima inhibición con el anticuerpo llamado 4D5 que inhibió la proliferación celular en un 56%. Otros anticuerpos en el panel, incluyendo 7C2 y 7F3, redujeron la proliferación celular en menor grado en este ensayo. Hudziak *et al.*, concluyen que el efecto del anticuerpo 4D5 sobre las células SKBR3 era citostático en lugar de citotóxico, ya que las células SKBR3 retornaban el crecimiento 50 a un valor casi normal después de la extracción del anticuerpo del medio. También se observó que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba las líneas de células de tumor de mama que sobreexpresan p185<sup>erbB2</sup> a los efectos citotóxicos de TNF- $\alpha$ . Véase también WO89/06692 publicada el 27 de julio de 1989. Los anticuerpos anti-ErbB2 descritos en Hudziak *et al.*, se caracterizan adicionalmente en Fendly *et al.* *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts *et al.* *In Vitro* 26(3):59A (1990); Sarup *et al.* *Growth Regulation* 1:72-82 (1991); Shepard *et al.* *J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127 (1991); Kumar 55 *et al.* *Mol. Cell. Biol.* 11 (2):979-986 (1991); Lewis *et al.* *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras *et al.* *Oncogene* 9: 1829-1838 (1994); Vitetta *et al.* *Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski *et al.* *J. Biol. Chem.* 269(20): 14661-14665 (1994); Scott *et al.* *J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991); y D'souza *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 7202-7206 (1994).

60 Tagliabue *et al.*, *Int. Cancer* 47: 933-937 (1991) describen dos anticuerpos que se seleccionaron por su reactividad en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón (Calu-3) que sobreexpresa ErbB2. Se observó que uno de los anticuerpos, denominado MGR3, se internalizaba, inducía la fosforilación de ErbB2 e inhibía el crecimiento de células tumorales *in vitro*.

65 McKenzie *et al.* *Oncogene* 4: 543-548 (1989) generaron un panel de anticuerpos anti-ErbB2 con especificidades de epítopo variantes, incluyendo el anticuerpo designado como TA1. Se observó que este anticuerpo TA1 inducía una endocitosis acelerada de ErbB2 (véase Maier *et al.* *Cancer Res.* 51: 5361-5369 (1991)). Bacus *et al.* *Molecular Carcinogenesis* 3: 350-362 (1990) describieron que el anticuerpo TA1 inducía la maduración de las líneas celulares

de cáncer de mama AU-565 (que sobreexpresa el gen *erbB2*) y MCF-7 (que no lo hace). Se observó que la inhibición del crecimiento y la adquisición de un fenotipo maduro en estas células estaban asociadas con niveles reducidos de receptor ErbB2 en la superficie celular y niveles aumentados transitorios en el citoplasma.

5 Stancovski *et al.* PNAS(USA) 88: 86091-8695 (1991) generaron un panel de anticuerpos anti-ErbB2, se inyectaron i.p. en ratones desnudos y se evaluó su efecto en el crecimiento de tumores de fibroblastos murinos transformados mediante la sobreexpresión del gen *erbB2*. Se detectaron varios niveles de inhibición del tumor para cuatro de los anticuerpos, pero uno de los anticuerpos (N28) estimulaba sistemáticamente el crecimiento del tumor. El anticuerpo monoclonal N28 indujo la fosforilación significativa del receptor ErbB2, mientras que los otros cuatro anticuerpos 10 mostraron en general una actividad inductora de la fosforilación baja o nula. También se valoró el efecto de los anticuerpos anti-ErbB2 en la proliferación de células SKBR3. En este ensayo de proliferación de células SKBR3, dos de los anticuerpos (N12 y N29) provocaron una reducción en la proliferación celular en relación con el control. Se evaluó la capacidad de los diversos anticuerpos para inducir la lisis *in vitro* celular a través de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), con la conclusión 15 de los autores de este documento de que la función inhibidora de los anticuerpos no se atribuía de manera significativa a CDC o ADCC.

Bacus *et al.* Cancer Research 52: 2580-2589 (1992) caracterizaron adicionalmente los anticuerpos descritos en Bacus *et al.* (1990) y Stancovski *et al.* de los párrafos precedentes. Ampliando los estudios i.p. de Stancovski *et al.*, 20 se evaluó el efecto de los anticuerpos después de la inyección i.v. en ratones desnudos que albergan fibroblastos de ratón que sobreexpresan ErbB3 humano. Tal como se ha observado en un trabajo previo, N28 aceleraba el crecimiento tumoral, mientras que N12 y N29 inhibían significativamente el crecimiento de las células que expresan ErbB2. La inhibición parcial del tumor también se observó con el anticuerpo N24. Bacus *et al.* también ensayaron la capacidad de los anticuerpos para inducir un fenotipo maduro en las líneas celulares de cáncer de mama humano AU-565 y MDS- 25 MB453 (que sobreexpresa ErbB2), así como MCF-7 (que contiene niveles bajos del receptor). Bacus *et al.* observaron una correlación entre la inhibición tumoral *in vivo* y la diferenciación celular; el anticuerpo estimulador de tumores N28 no presentaba un efecto sobre la diferenciación, y la acción inhibidora del tumor de los anticuerpos N12, N29 y N24 se correlacionaba con el grado de diferenciación que inducían.

30 Xu *et al.* Int. J. Cancer 53: 401-408 (1993) evaluaron un panel de anticuerpos anti-ErbB2 por sus especificidades de unión a epítopo, así como sus capacidades para inhibir el crecimiento independiente de anclaje y dependiente de anclaje de células SKBR3 (por anticuerpos individuales y en combinaciones), modular ErbB2 de la superficie celular e inhibir el crecimiento independiente del anclaje estimulado por ligando. Véase también WO 94/0036 publicada el 6 de enero de 1994 y Kasprzyk *et al.* Cancer Research 52: 2771-2776 (1992) que se refieren a combinaciones de anticuerpos 35 anti-ErbB2. Otros anticuerpos anti-ErbB2 se describen en Hancock *et al.* Cancer Res. 51:4575-4580 (1991); Shawver *et al.* Cancer Res. 54:1367-1373 (1994); Arteaga *et al.* Cancer Res. 54: 3758-3765 (1994); y Harwerth *et al.* J. Biol. Chem. 267:15160-15167 (1992).

40 Un anticuerpo monoclonal anti-ErbB2 humanizado recombinante (una versión humanizada del anticuerpo anti-ErbB2 murino 4D5, al que se hace referencia como rhuMAb HER2 o HERCEPTIN®) era clínicamente activo en pacientes con cánceres de mama metastáticos que sobreexpresan ErbB2 que habían recibido una extensa terapia anticancerígena anterior. (Baselga *et al.*, J. Clin. Oncol. 14: 737-744 [1996]).

45 La sobreexpresión de ErbB2 se considera habitualmente como un factor de pronóstico pobre para un pronóstico, especialmente en pacientes con enfermedad primaria que implica nódulos linfáticos auxiliares (Slamon *et al.*, [1987] y [1989], *supra*; Ravdin y Chamness, *Gene* 159: 19-27 [1995]; y Hynes y Stem, *Biochim. Biophys. Acta* 1198: 165-184 [1994]) y se ha relacionado con la sensibilidad y/o resistencia a la terapia con hormonas y pautas quimioterapéuticas, incluyendo CMF (ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo) y antraciclinas (Baselga *et al.*, *Oncology* 11 (3 Suppl 1): 43-48 [1997]). Sin embargo, a pesar de la asociación de la sobreexpresión de ErbB2 con 50 un pronóstico pobre, las probabilidades de pacientes con respuesta positiva a HER2 que respondían clínicamente al tratamiento con taxanos eran más de tres veces superiores a aquellas de pacientes con respuesta negativa a HER2 (*Ibid*). Se observó que rhuMAb HER2 aumentaba la actividad de paclitaxel (TAXOL®) y doxorrubicina contra xenoinjertos de cáncer de mama en ratones desnudos inyectados con células de adenocarcinoma de mama humana BT-474, que expresan niveles elevados de HER2 (Baselga *et al.*, *Breast Cancer, Proceedings de ASCO*, Vol. 13, Resumen 53 [1994]).

55 Goldenberg, Clinical Therapeutics Vol. 21, No. 2, 1999 y Dees y Kennedy, Current Opinion in Oncology, Nov. 1998, 10(6), 517-522 describen el uso del anticuerpo anti-HER2 (ErbB2) Trastuzumab con quimioterapia con paclitaxel o antraciclina-más-ciclofosfamida en el tratamiento de cáncer metastático de mama.

60 Esteva y Horobagyi (1988) The Oncologist 3: 300-313 hacen una revisión de la integración de la quimioterapia sistemática en el tratamiento del cáncer de mama primario, describiendo la quimioterapia adyuvante y neoadyuvante. Se describe una prueba clínica en fase II utilizando anticuerpo anti-ErbB2, en la que los pacientes que recibieron anticuerpo eran resistentes a quimioterapia múltiples y manipulaciones hormonales.

65 Kuerer *et al.* (Febrero 1999) J. Clin. Oncology 17: 460-469 describe quimioterapia neoadyuvante utilizando doxorrubicina y ciclofosfamida. Se menciona HER2/c-erbB2 como uno de los potenciales marcadores biológicos que se pueden utilizar en la predicción de respuestas a la quimioterapia neoadyuvante. McMasters y Hunt (Febrero 1999) J.

Clin. Oncology 17: 441-444 es una editorial que describe el documento de Kuerer *et al.* y temas sobre la calidad de vida en relación con la mastectomía y la quimioterapia proliferativa en el tratamiento del cáncer de mama.

## Descripción resumida de la invención

La presente invención da a conocer el uso de un anticuerpo anti-ErbB2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente humano susceptible o diagnosticado con un tumor en el que se expresa la proteína ErbB2, en la que el medicamento es para el tratamiento del paciente antes de las etapas de extirpación quirúrgica del tumor y el tratamiento del paciente después de la extirpación quirúrgica del tumor con anticuerpo anti-ErbB2 y/o un agente quimioterapéutico.

Preferiblemente, el tumor se selecciona del grupo que consiste en tumor de mama, tumor de células escamosas, tumor de células pequeñas de pulmón, tumor de células no pequeñas de pulmón, tumor gastrointestinal, tumor pancreático, glioblastoma, tumor cervical, tumor de ovario, tumor de hígado, tumor de vejiga, hepatoma, tumor de colon, tumor colorrectal, tumor endometrial, tumor de las glándulas salivares, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor de vulva, tumor de tiroides, tumor hepático, tumor de cabeza y tumor de cuello.

## Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el mapeo epítópico del dominio extracelular de ErbB2 determinado mediante el análisis de mutantes por truncamiento y mutagénesis dirigida de sitio (Nakamura *et al.* J. of Virology 67(10):6179-6191 [Oct 1993]; Renz *et al.* J. Cell Biol. 125 (6):1395-1406 [Jun 1994]). Los MAbs antiproliferativos 4D5 y 3H4 se unen de forma adyacente al dominio transmembrana. Los diversos truncamientos o mutaciones puntuales de ECD de ErbB2 se prepararon a partir de ADNc utilizando la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa. Los mutantes de ErbB2 se expresaron como proteínas de fusión de gD en un plásmido de expresión de mamífero. Este plásmido de expresión utiliza el promotor/potenciador de citomegalovirus con terminación e SV40 y señales de poliadenilación situadas en dirección 3' del ADNc insertado. El ADN plásmido se transfirió en células 293S. Un día después de la transfección, las células se marcaron metabólicamente durante toda la noche en DMEM bajo en glucosa y sin metionina o cisteína que contenía suero bovino fetal dializado al 1% y 25  $\mu$ Ci de cada uno de  $^{35}$ S metionina y  $^{35}$ S cisteína. Los sobrenadantes se recogieron y se añadieron MAbs de ErbB2 o anticuerpos de control al sobrenadante y se incubaron 2-4 horas a 4°C. Los complejos se precipitaron, se aplicaron a un gel en gradiente de Tricina SDS al 10-20% y se les realizó electroforesis a 100 V. El gel se electrotransfirió sobre una membrana y se analizó mediante autorradiografía. Las SEC ID Nos. 3 y 4 representan representan los epítopos 3H4 y 4D5, respectivamente.

La figura 2 representa con subrayado la secuencia de aminoácidos del Dominio 1 de ErbB2 (SEC ID No. 1). Los aminoácidos en negrita indican la localización del epítopo reconocido por los MAbs 7C2 y 7F3 determinados mediante el mapeo de eliminación, es decir, el “epítopo 7C2/7C3” (SEC ID No. 2).

## Descripción detallada de las realizaciones preferidas

**I. Definiciones**

Los términos “HER2”, “ErbB2” y “c-Erb-B2” se utilizan indistintamente. A menos que se indica lo contrario, los términos “ErbB2”, “c-Erb-B2” y “HER2” se refieren a la proteína humana, y “Her2”, “erbB2” y “c-Erb-B2” se refieren al gen humano. El gen erbB2 humano y la proteína ErbB2 se describen, por ejemplo, en Semba *et al.*, PNAS (USA) 82: 6497-6501 (1985) y Yamamoto *et al.*, Nature 319: 230-234 (1986) (Número de acceso del Banco de Genes X03363). ErbB2 comprende cuatro dominios (Dominios 1-4).

El “epítopo 4D5” es la región en el dominio extracelular de ErbB2 a la que se une el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463). El epítopo está próximo a la región transmembrana de ErbB2. Para cribar anticuerpos que se unen al epítopo 4D5, se puede realizar un ensayo de cruzado (“cross-blocking assay”) de rutina, tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, se puede realizar un mapeo epítópico (véase la figura 1) para evaluar si el anticuerpo se une al epítopo 4D5 de ErbB2 (es decir, alguno o más residuos en la región desde aproximadamente el residuo 529, por ejemplo, aproximadamente el residuo 561 hasta aproximadamente el residuo 625, ambos inclusive; SEC ID NO. 4).

El “epítopo 3H4” es la región en el dominio extracelular de ErbB2 a la que se une el anticuerpo 3H4. Este epítopo se muestra en la figura 1 e incluye residuos desde aproximadamente 541 hasta aproximadamente 599, ambos inclusive, en la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de ErbB2 (SEC ID NO. 3).

El epítopo “7C2/7F3” es la región en el extremo N terminal del dominio extracelular de ErbB2 a la que se unen los anticuerpos 7C2 y/o 7F3 (cada uno depositado con la ATCC, véase a continuación). Para cribar anticuerpos que se unen al epítopo 7C2/7F3, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado (“cross-blocking assay”) de rutina, tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, se puede realizar un mapeo epítópico para establecer si el anticuerpo se une al epítopo 7C2/7F3 en ErbB2 (es decir, alguno o más residuos en la región desde aproximadamente el residuo 22 hasta aproximadamente el residuo 53 de ErbB2 [SEC ID NO. 2]).

El término “induce la muerte celular” o “capaz de inducir la muerte celular” se refiere a la capacidad del anticuerpo para hacer que una célula viable se vuelva no viable. La “célula” aquí es aquella que expresa el receptor de ErbB2, especialmente cuando la célula sobreexpresa el receptor de ErbB2. Una célula que “sobreexpresa” ErbB2 tienen niveles de ErbB2 significativamente más elevados que los normales en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Preferiblemente, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas o vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SKBR3, BT474, Calu3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. La muerte celular *in vitro* se puede determinar en ausencia de complemento y células efectoras inmunes para distinguir la muerte celular inducida por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). De este modo, el ensayo para la muerte celular se puede realizar utilizando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunes. Para determinar si el anticuerpo es capaz de inducir la muerte celular, la pérdida de integridad de la membrana evaluada mediante la captación de yoduro de propicio (PI), azul de tripano (véase Moore *et al.*, *Cytotechnology* 17: 1-11 [1995]) o 7AAD se puede valorar en relación a células no tratadas. Los anticuerpos inductores de muerte celular preferidos son aquellos que inducen la captación de PI en el “ensayo de captación de PI en células BT474”.

La frase “induce la apoptosis” o “capaz de inducir la apoptosis” se refiere a la capacidad del anticuerpo para inducir la muerte celular programada determinada mediante la unión de annexina V, la fragmentación de ADN, el encogimiento celular, la dilatación del retículo endoplasmático, la fragmentación celular y/o la formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). La célula es aquella que sobreexpresa el receptor de ErbB2. Preferiblemente, la “célula” es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas o vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SKBR3, BT474, Calu3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. Están disponibles varios métodos para evaluar los sucesos celulares asociados a la apoptosis. Por ejemplo, se puede medir la translocación de la fosfatidil serina (PS) mediante la unión de annexina; la fragmentación de ADN se puede evaluar a través del encadenamiento de ADN tal como se describe en el ejemplo de la presente invención; y condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación de ADN se puede evaluar mediante cualquier incremento en células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo que induce apoptosis es aquel que da lugar a aproximadamente 2 a 50 veces, preferiblemente 5 a 50 veces, y más preferiblemente aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de la unión a annexina en relación a células no tratadas en un “ensayo de unión a annexina utilizando células BT474” (ver a continuación).

Algunas veces, el anticuerpo proapoptótico será aquel que bloquea la unión/activación por HRG del complejo ErbB2/ErbB3 (por ejemplo, el anticuerpo 7F3). En otras situaciones, el anticuerpo es aquel que no bloquea significativamente la activación del complejo receptor de ErbB2/ErbB3 por HRG (por ejemplo, 7C2). Además, el anticuerpo puede ser uno como 7C2 que, aunque induce la apoptosis, no induce una gran reducción en el porcentaje de células en fase S (por ejemplo, uno que sólo induce aproximadamente una reducción del 0-10% en el porcentaje de estas células en relación con el control).

El anticuerpo de interés puede ser uno como 7C2 que se une específicamente a ErbB2 humana y que no reacciona significativamente de forma cruzada con otras proteínas, tales como aquellas codificadas por los genes *erbB1*, *erbB3* y/o *erbB4*. Algunas veces, el anticuerpo puede no reaccionar significativamente de forma cruzada con la proteína *neu* de rata, por ejemplo, tal como se describe en Schecter *et al.* *Nature* 312: 513 (1984) y Drebin *et al.* *Nature* 312: 545-548 (1984). En dichas realizaciones, el grado de unión del anticuerpo a estas proteínas (por ejemplo, la unión de la superficie celular a receptor endógeno) será inferior a aproximadamente un 10% determinada mediante análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA).

“Heregulina” (HRG) cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un polipéptido que activa el complejo de proteínas ErbB2-ErbB3 y ErbB2-ErbB4 (es decir, induce la fosforilación de residuos de tirosina en el complejo tras la unión al mismo). Varios polipéptidos de heregulina comprendidos por este término se describen en Holmes *et al.*, *Science* 256: 1205-1210 (1992); WO92/20798; Wen *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 14(3): 1909-1919 (1994); y Marchionni *et al.*, *Nature*, 362: 312-318 (1993), por ejemplo. El término incluye fragmentos y/o variantes biológicamente activos de un polipéptido HRG natural, tal como un fragmento del dominio de tipo EGF del mismo (por ejemplo,  $HRG\beta 1_{177-244}$ ).

El “complejo de proteínas ErbB2-ErbB3” y el “complejo de proteínas ErbB2-ErbB4” son oligómeros asociados no covalentemente del receptor ErbB2 y el receptor ErbB3 o el receptor ErbB4, respectivamente. Los complejos se forman cuando una célula que expresa ambos receptores se expone a HRG y se puede aislar mediante inmunoprecipitación y analizar mediante SDS-PAGE tal como se describe en Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269 (20): 14661-14665 (1994).

“Anticuerpos” (Abs) e “inmunoglobulinas” (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos muestran un especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto los anticuerpos como moléculas parecidas a anticuerpos que carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos de este último tipo se producen, por ejemplo, a niveles bajos por el sistema linfático y a niveles elevados por los mielomas.

“Anticuerpos nativos” e “inmunoglobulinas nativas” son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligera (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante una enlace covalente disulfuro, mientras que el número

de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera puede tener también puentes disulfuro entre cadenas espaciadas de manera regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable ( $V_H$ ) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo ( $V_L$ ) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada.

El término “variación” se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDRs) o regiones hipervariables, ambas en los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. Las partes más altamente conservada de los dominios variables se denomina la región armazón (“framework”) (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que mayoritariamente ampliamente una configuración de lámina  $\beta$ , conectadas por tres CDRs, que forman bucles que conectan, y en algunos casos conforman, la estructura de lámina  $\beta$ . Las CDRs en cada cadena se mantienen juntas de manera próxima por las regiones FR y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación de sitios de unión a antígeno de anticuerpos (véase Kabat *et al.*, NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, páginas 647-669 [1991]). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un sitio único de unión a antígeno y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento  $F(ab')_2$  que tiene dos sitios de combinación a antígeno y aún es capaz de reticular el antígeno.

“Fv” es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero  $V_H$ - $V_L$ . Colectivamente, las seis CDRs confieren al anticuerpo una especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres CDRs específicas de antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una menor afinidad 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. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab por la adición de una serie de residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente invención para Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos  $F(ab')_2$  se produjeron originalmente como parejas de fragmentos de Fab' que tienen cisteínas bisagras entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente diferentes, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ . Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada.

“Fragmentos de anticuerpos” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen Fab, Fab',  $F(ab')_2$  y fragmentos Fv; diabodies; anticuerpos lineales (Zapata *et al.* Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término “anticuerpo monoclonal” tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico

único. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen habitualmente diferentes anticuerpos dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se sintetizan mediante el cultivo de hibridomas, sin estar contaminados por otras inmunoglobulinas. El 5 modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo por obtenerse a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar según la presente invención, se pueden 10 fabricar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos en fagos 15 utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Entre los anticuerpos monoclonales de la presente invención se incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "químéricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias 15 correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como 20 fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas químéricas, 25 cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos 30 de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que presenta la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región armazón ("framework") (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o armazón importadas. 35 Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente y optimizar la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de, como mínimo, uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. 40 El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo Primatizado<sup>TM</sup> en el que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido mediante la inmunización de monos macaco con el antígeno de interés.

45 Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "sFv" comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término "diabodies" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos 50 fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) en la misma cadena de polipéptido (V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diabodies se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

55 Un anticuerpo "aislado" es el que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con las utilizaciones de diagnóstico o terapéuticas del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95% en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante 60 la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

65 Tal y como se utiliza en la presente invención, el término "epítopo de unión del receptor de rescate" se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, o IgG<sub>4</sub>) que es responsable para aumentar la vida media de suero *in vivo* de la molécula IgG.

## ES 2 320 311 T3

El “tratamiento” se refiere al tratamiento terapéutico y a medidas profilácticas o preventivas. Entre los que necesiten el tratamiento se incluyen los que ya padecen el trastorno, así como aquellos en los que se previene el trastorno.

“Mamífero” para los objetivos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, animales de zoo, deportes o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es humano.

Un “trastorno” es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo anti-ErbB2. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Entre los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en la presente invención se incluyen tumores benignos y malignos; leucemias y tumores de linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocoélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células de cáncer; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la infiltración de células de cáncer en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la metástasis del tumor; inhibir, en cierto grado, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en cierto grado los síntomas asociados con el trastorno. En la medida en que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o matar las células de cáncer existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, mediante la evaluación del tiempo hasta la progresión del tumor (TTP), la determinación de la velocidad de respuesta (RR) y/o la evaluación de la supervivencia global.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores linfoides. Entre los ejemplos más particulares de dichos cánceres se incluyen cáncer de células escamosas, el cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroidal, carcinoma testicular, así como cáncer de cabeza y cuello.

El término “agente citotóxico” tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo  $I^{131}$ ,  $I^{123}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $At^{211}$ ,  $Cu^{67}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $Pd^{109}$ ,  $Re^{188}$  y  $Re^{186}$ ), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, micótico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes, tales como, tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN<sup>TM</sup>); sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carboquone, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenitosforamida y trimetilolmelamina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloroetamina, clorhidrato de óxido de mecloroetamina, melfalán, novembiquin, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirrubicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potifromicina, puromicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracil (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamicrina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; rellenos de ácido fólico, tales como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico: amsacrina; bestrabucil: bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxuirea; lentinano; Ionidamina; mitoguazona; mitoxantrona; 30 moidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etylhidrazida; procarbazina; PSK<sup>®</sup>; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptoperina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; carminomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO);

ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables. También se incluyen en esta definición agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, tales como anti-estrógenos incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, aromatasa que inhibe 4(5)-imidazolas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona; y anti-andrógenos, tales como flutamida y nilutamida; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que sobreexpresa ErbB2 *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan ErbB2 en la fase S. Algunos ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Algunos bloqueadores clásicos de fase M incluyen los vincas (vincristina y vinblastina), taxol e inhibidores topo II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que interrumpen G1 también afectan a la interrupción de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como por ejemplo tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloroetamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn y Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs” por Murakami *et al.*, (WB Saunders: filadelfia, 1995), especialmente la página 13. El anticuerpo 4D5 (y los equivalentes funcionales de los mismos) también se pueden utilizar para este propósito.

“Doxorubicina” es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- $\alpha$ -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona

El término “citoquina” es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Algunos ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas del crecimiento, tales como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo, y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidal; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y hormona luteínica (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor  $\alpha$  y  $\beta$  de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGFs), tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factor de crecimiento I y II de tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones, tales como interferón- $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ; factores estimulantes de colonias (CSFs), tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (ILs), tales como IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ , y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y ligando kit (LK). Tal y como se utiliza en la presente invención, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

El término “profármaco”, tal como se utiliza en esta solicitud, hace referencia a un precursor o derivado de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco parental y es capaz de ser activado enzimáticamente o convertido en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Willman, Prodrugs in Cancer Chemotherapy, Biochemical Society Transactions, 14:375-382, 615th Meeting, Belfast (1986), y Stella *et al.*, Prodrugs: A Chemical approach to targeted drug delivery, Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.) pág. 147-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiosfosfato, profármacos que contienen sulfato, o profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados por D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen  $\beta$ -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamidas opcionalmente sustituidas o profármacos que contienen fenilacetamidas opcionalmente sustituidas, profármacos de 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en un fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivarse en profármacos para su utilización en la presente invención incluyen, pero sin limitación, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como los anticuerpos anti-ErbB2 descritos en la presente invención y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de las membranas biológicas.

El término “prospecto” se utiliza para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de los productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, utilización, dosis, administración, contraindicaciones y/o avisos con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

Un “cardioprotector” es un compuesto o composición que previene o reduce la disfunción cardiaca (es decir, cardiomiopatía y/o fallo cardiaco congestivo) asociada con la administración de un fármaco, tal como un antibiótico

antraciclina y/o un anticuerpo anti-ErbB2, a un paciente. El cardioprotector puede, por ejemplo, bloquear o reducir un efecto cardiotóxico mediado por radicales libres y/o evita o reduce el daño por estrés oxidativo. Entre los ejemplos de cardioprotectores comprendidos por la presente definición se incluyen el agente quelante de hierro dexrazoxano (ICRF-187) (Seifert *et al.* *The Annals of Pharmacotherapy* 28:1063-1072); un agente reductor de lípidos y/o antioxidante, tales como probucol (Singal *et al.* *J. Mol. Cell Cardiol.* 27:1055-1063 [1995]); amifostina (aminotiol 2-[(3-aminopropil)amino]etanotiol-dihidrógeno fosfato éster, también denominado WR-2721, y la forma desfosforilada de captación celular del mismo denominada WR-1065) y ácido S-3-(3-metilaminopropilamino)propilfosforotioico (WR-151327), véase Green *et al.* *Cancer Research* 54:738-741 (1994); digoxina (Bristow, M.R. In: Bristow MR, ed. *Drug-Induced Heart Disease*. New York: Elsevier 191-215 [1980]); beta-bloqueantes, tales como metoprolol (Hjalmarson *et al.* *Drugs* 47:Suppl 4:31-9 [1994]; y Shaddy *et al.* *Am. Heart J.* 129: 197-9 [1995]); vitamina E; ácido ascórbico (vitamina C); capturadores de radicales libres, tales como ácido oleanólico, ácido ursólico y N-acetilcisteína (NAC); compuestos para "spin trapping", tales como alfa-fenil-tert-butil nitrona (PBN); (Paracchini *et al.*, *Anticancer Res.* 13:1607-1612 [1993]); compuestos selenoorgánicos, tales como P251 (Elbesen); y similares.

15

## II. Producción de anticuerpos anti-ErbB2

A continuación se realiza una descripción de técnicas de ejemplos para la producción de los anticuerpos utilizados según la presente invención. El antígeno ErbB2 a utilizar para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de ErbB2 o una parte del mismo, que contiene el epítopo deseado. Alternativamente, para generar anticuerpos se pueden utilizar células que sobreexpresan ErbB2 en su superficie celular [por ejemplo, células NIH-3T3 transformadas para sobreexpresar ErbB2; o una línea celular de carcinoma, tal como células SKBR3, véase Stancovski *et al.* *PNAS (USA)* 88: 8691-8695 (1991)]. Otras formas de ErbB2 útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia.

25

### (i) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se desarrollan preferiblemente en animales mediante inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente a una proteína que es inmunogénica en las especies a inmunizar, por ejemplo, la hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico,  $\text{SOCl}_2$ , o  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , donde R y  $\text{R}^1$  son grupos alquilo diferentes.

35

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación de, por ejemplo, 100  $\mu\text{g}$  o 5  $\mu\text{g}$  de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y la inyección intradérmica de la solución en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días más tarde los animales sangran y el suero se ensaya para el título de anticuerpo. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Preferiblemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden producir en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, los agentes de agregación, tales como el alumbre, se utilizan de forma adecuada para potenciar la respuesta inmune.

### (ii) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. De este modo, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975) o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567).

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmunizan como se ha descrito anteriormente para conseguir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (*Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press. 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen del enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo de los hibridomas incluirán habitualmente

hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, contribuyen a una producción estable a un nivel elevado de anticuerpo por las células productoras de los anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio, tal como medio HAT. Entre éstas, las líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

Se ensaya el medio de cultivo en el que las células de hibridoma están en crecimiento para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante la inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se pueden determinar, por ejemplo, mediante análisis Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press, 1986)). Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aisla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfecan en células huésped, tales como células *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de ningún otro modo producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Entre los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo se incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinión in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos generados utilizando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Las posteriores publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (rango de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks *et al.*, *Biol. Technology*, 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas convencionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison *et al.* *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o mediante unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es inmunoglobulina.

Habitualmente, dichos polipéptidos que no son inmunoglobulinas se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo divalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

### (iii) *Anticuerpos humanizados y humanos*

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos “importados”,

que habitualmente se sacan de un dominio variable “importado”. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de CDRs o secuencias de CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos químéricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

10 La elección de dominios variables humanos, tanto de cadena ligera como pesada, para utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado “mejor-ajuste”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. A continuación, la secuencia humana que está más próxima a la del roedor 15 se acepta como el armazón humano para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método utiliza un armazón particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo armazón 20 se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

25 Es también importante que los anticuerpos se humanicen manteniendo una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptuales 30 humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles normalmente y son familiares para los expertos en la materia. Existen 35 programas informáticos disponibles que muestran y visualizan probables estructuras conformaciones tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La observación de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. 40 De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar del receptor e importar secuencias, de manera que se consigue la característica del anticuerpo deseado, tal como una mayor afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la 45 unión al antígeno.

50 Alternativamente, actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo ( $J_H$ ) en ratones químéricos y mutantes en la línea germinal da lugar a una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes humanos de inmunoglobulinas de la línea germinal en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación de los antígenos. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.* *Nature*, 362:255-258 (1993); Brugermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993). Los anticuerpos humanos también se pueden derivar de bibliotecas de expresión de fagos (Hoogenboom *et al.* *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)).

#### 45 (iv) Fragmentos de anticuerpos

50 Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Habitualmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir actualmente directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos en fagos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otra aproximación, 55 los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el técnico de la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es una fragmento Fv de cadena única (scFv). Véase WO 93/16185.

#### 60 (v) Anticuerpos biespecíficos

65 Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión con por lo menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes de la proteína ErbB2. Por ejemplo, un brazo se puede unir a un epítopo en el Dominio 1 de ErbB2, tal como el epítopo 7C2/7F3, el otro puede unirse a un epítopo ErbB2 diferente, por ejemplo, el epítopo 4D5. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a ErbB2 con sitio o sitios de unión para EGFR, ErbB3 y/o ErbB4. Alternativamente, un brazo anti-ErbB2 puede combinarse con un brazo que se une a una molécula inductora en un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2 o CD3) o receptores Fc para IgG (FCyR), tales como FCyRI (CD64), FCyRII (CD32) y FCyRIII (CD16) con el fin de centrar los mecanismos de defensa celulares en la célula que expresa ErbB2. Los

anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan ErbB2. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a ErbB2 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón- $\alpha$ , alcaloide vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>).

Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción habitual de anticuerpos específicos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cاعدromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda y los rendimientos de producto son bajos. En WO 93/08829 y en Truanecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) se describen procesos similares.

Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se produce preferiblemente con una dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para la unión a cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen particular importancia.

En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una vía sencilla de separación. Esta estrategia se describe en WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

Según otra estrategia descrita en WO 96/27011, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivos de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte del dominio C<sub>H</sub>3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes se crean en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales de aminoácidos grandes por pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjunto se puede acoplar a avidina, y el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980 junto con un grupo de técnicas de reticulación.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se pueden descomponer proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditióles vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico F(ab')<sub>2</sub> completamente humanizado. Cada fragmento de Fab'

se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor HER2 y células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

5 Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diabody" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios  $V_L$  y  $V_H$  complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

10 20 Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147:60 (1991).

25 (vi) *Cribado ("screening") de anticuerpos con las propiedades deseadas*

30 Las técnicas para generar anticuerpos se han descrito anteriormente. Se seleccionan anticuerpos que tienen las características descritas en la presente invención.

35 Para seleccionar anticuerpos que inducen la muerte celular, la pérdida de integridad de la membrana tal como se indica mediante, por ejemplo, la captación de PI, azul de tripano o 7AAD se evalúa en relación al control. El ensayo preferido es el "ensayo de captación de PI utilizando células BT474". Según este ensayo, las células BT474 (que se pueden obtener de la American Type Culture Collection (Rockville, MD)) se cultivan en un Medio Eagle Modificado por Dulbecco (D-MEM); F-12 de Ham (50:50) complementado con FBS (Hyclone) inactivado por calor al 10% y 2 mM de L-glutamina. (Por tanto, el ensayo se realiza en ausencia de complemento y células efectoras inmunes). Las células BT474 se siembran a una densidad de  $3 \times 10^6$  células por plato en platos de 100 x 20 mm y se dejan unirse durante toda la noche. A continuación, se extrae el medio y se sustituye por medio nuevo solo o medio que contiene 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  del MAb apropiado. Las células se incuban durante un periodo de tres días. Despues de cada tratamiento, se lavan las monocapas con PBS y se separan por tripsinización. A continuación, las células se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C, se resuspende el residuo celular en 3 ml de tampón de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  enfriado con hielo (10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) y se pone en alícuotas en tubos de 12 x 75 taponados con un colador (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la extracción de las aglomeraciones de células. A continuación, se añade PI (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a los tubos. Las muestras se pueden analizar utilizando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Se seleccionan los anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de la muerte celular determinada mediante la captación de PI.

45 50 55 Con el fin de seleccionar anticuerpos que inducen la apoptosis, está disponible un "ensayo de unión a annexina utilizando células BT474". Las células BT474 se cultivan y siembran en platos tal como se describe en el párrafo anterior. A continuación, se extrae el medio y se sustituye con un medio nuevo solo o un medio que contiene 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  del Mab. Despues de un periodo de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se separan mediante tripsinización. A continuación, las células se centrifugan, se resuspenden en tampón de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y se ponen en alícuotas en tubos descritos anteriormente para el ensayo de la muerte celular. A continuación, se introduce annexina marcada (por ejemplo, annexina V-FTIC) (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Las muestras se pueden analizar utilizando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Se seleccionan los anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativas de unión a annexina en relación con el control como anticuerpos inductores de la apoptosis.

60 65 Además del ensayo de unión a annexina, está disponible un "ensayo de tinción de ADN utilizando células BT474". Con el fin de realizar este ensayo, las células BT474 que se han tratado con el anticuerpo de interés descrito en los párrafos anteriores se incuban con 9  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de HOECHST 33342™ durante 2 horas a 37°C, a continuación se analiza en un citómetro de flujo EPOICS ELITÉ™ (Coulter Corporation) utilizando software MODFIT LT™ (Verity Software House). Se pueden seleccionar los anticuerpos que inducen un cambio en el porcentaje de células apoptóticas que es dos veces o superior (y preferiblemente 3 veces o superior) que las células no tratadas (hasta un 100% de células apoptóticas) como anticuerpos proapoptóticos utilizando este ensayo.

65 Para cribar anticuerpos que se unen a un epítopo en ErbB2 unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado ("cross-blocking assay") de rutina, tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, se puede realizar un mapeo epítópico mediante métodos conocidos en el sector.

Para identificar anticuerpos anti-ErbB2 que inhiben el crecimiento de células SKBR3 en un cultivo celular en un 50-100%, se puede realizar el ensayo descrito en WO 89/06692. Según este ensayo, se desarrollan células SKBR3 en una mezcla 1:1 de F12 y medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina y penicilinestreptomicina. Las células SKBR3 se emplacan a razón de 20.000 células por placa de cultivo celular de 35 mm (2 ml/placa de 35 mm). Por placa se añaden 2,5 µg/ml del anticuerpo anti-ErbB2. Después de seis días, se cuenta el número de células, en comparación con las células no tratadas, utilizando un contador electrónico de células COULTER™. Se seleccionan los anticuerpos que inhiben el crecimiento de las células SKBR3 en un 50-100% para la combinación con los anticuerpos apoptóticos según se deseé.

10 (vii) *Diseño de la función efectora*

Se puede desechar modificar el anticuerpo de la presente invención con respecto a la función efectora a efectos de aumentar la efectividad del anticuerpo en el tratamiento del cáncer, por ejemplo. Por ejemplo, el residuo o residuos de cisteína se pueden introducir en la región Fc, permitiendo así la formación en esta región de enlaces disulfuro entre 15 cadenas. El anticuerpo homodimérico así generado puede mejorar la capacidad de internalización y/o aumentar la citólisis de células mediadas por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con una mayor actividad antitumoral también se pueden preparar utilizando reticuladores heterobifuncionales tal y como se ha descrito en Wolff *et al.*, *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se 20 puede diseñar un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y de este modo puede aumentar la lisis por complemento y las capacidades de ADCC. Véase Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989).

(viii) *Inmunoconjungados*

25 La presente invención también se refiere a inmunoconjungados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina de molécula pequeña o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjungado).

30 Los agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de dichos inmunoconjungados se han descrito anteriormente.

También se contemplan en la presente invención conjungados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula 35 pequeña, tales como una caliqueamicina, una maitansina (Patente de Estados Unidos No. 5.208.020), un tricoteno, un CC 1065. En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo se conjuga a una o más moléculas de maitansina (por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina se puede convertir, por ejemplo, en May-SS-Me que se puede reducir a May-SH3 y reaccionar con el anticuerpo modificado (Cari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 [1992]) para generar un inmunoconjungado de anticuerpo maitansinoide.

40 Otro imunoconjungado de interés comprende un anticuerpo anti-ErbB2 conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas del ADN de doble cadena en concentraciones subpicomolares. Entre los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden utilizar se incluyen, pero sin limitación,  $\gamma_1^1$ ,  $\alpha_2^1$ ,  $\alpha_3^1$ , N-acetil- $\gamma_1^1$ , PSAG y  $\theta^1$  (Hinman *et al.*, *Cancer Research* 53: 3336-3342 [1993] y LODE *et al.* *Cancer Research* 58: 2925-2928 [1998]).

Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, 50 proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

55 La presente invención se refiere además a un inmunoconjungado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desorribonucleasa; ADNasa).

Existe un conjunto de isótopos radioactivos disponibles para la producción de anticuerpos anti-ErbB2 radioconjungados. Algunos ejemplos incluyen At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radioactivos de Lu.

60 Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden fabricar utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditíol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), 65 compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaa-

cético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionúcleos al anticuerpo. Véase WO94/11026. El enlazador puede ser un “enlazador separable” que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil en ácido, un enlazador sensible a peptidasas, un enlazador dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Cari *et al.* *Cancer Research* 52: 127-131 [1992]).

5

Alternativamente, se puede fabricar una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-ErbB2 y agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos.

En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar a un “receptor” (tal como estreptavidina) para la utilización en el prereconocimiento de tumores en los que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación de conjugado no enlazado de la circulación utilizando un agente purificador y, a continuación, la administración de un “ligando” (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

15 (ix) *Inmunoliposomas*

Los anticuerpos anti-ErbB3 descritos en la presente invención también se pueden formular como immunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 77: 4030 (1980); y las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con un mayor tiempo de circulación se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.013.556.

20 Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para obtener liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar a los liposomas tal y como se describen en Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de enlaces disulfuro. Opcionalmente, el liposoma contiene un agente quimioterapéutico o ADN (por ejemplo, para terapia génica). Véase Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.*, 81(19): 1484 (1989).

30 30 (x) *Terapia de profármaco mediada por enzimas dependiente de anticuerpo (ADEPT)*

35 Los anticuerpos de la presente invención también se pueden utilizar en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo a un enzima activador de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptidilo, véase WO 81/01145) a un fármaco anticancerígeno activo. Véase, por ejemplo, WO 88/07378 y la Patente de Estados Unidos No. 4.975.278.

40 El componente enzimático del inmunoconjungado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar en un profármaco de manera que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

45 Entre las enzimas que son útiles en el procedimiento de la presente invención se incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluoroacilo; proteasas, tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que dividen los carbohidratos, tales como  $\beta$ -galactosidasa y neuramidinasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres;  $\beta$ -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con  $\beta$ -lactamas en fármacos libres; y penicilin amidas, tales como penicilin V amidasa o penicilin G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como “abzimas” se pueden utilizar para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey *Nature* 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar tal y como se ha descrito en la presente invención para la liberación del abzima a una población de células tumorales.

55 Las enzimas de la presente invención se pueden unir covalentemente a los anticuerpos anti-ErbB2 mediante técnicas bien conocidas en el sector, tal como la utilización de los reactivos de reticulación heterobifuncionales descritos anteriormente. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención unida a por lo menos una parte funcionalmente activa de una enzima se pueden construir utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger *et al.*, *Nature* 312: 604-608 (1984)).

(xi) *Fusiones de epítopo de unión de receptor salvaje-anticuerpo*

60 65 En ciertas realizaciones de la presente invención, puede ser deseable utilizar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intacto, para, por ejemplo, aumentar la penetración en el tumor. En este caso, puede ser deseable modificar el fragmento de anticuerpo con el fin de aumentar su vida media en suero. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítopo de unión de receptor salvaje al fragmento de anticuerpo (por ejemplo,

mediante la mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o mediante la incorporación del epítopo en un péptido etiqueta que a continuación se fusiona al fragmento de anticuerpo en el extremo o en el centro, por ejemplo, mediante síntesis de ADN o péptidos).

- 5 Un procedimiento sistemático para preparar dicha variante de anticuerpo que tiene una mayor vida media *in vivo* comprende varias etapas. La primera implica la identificación de la secuencia y la conformación de un epítopo de unión de receptor salvaje de una región Fc de una molécula de IgG. Una vez se identifica este epítopo, la secuencia del anticuerpo de interés se modifica para incluir la secuencia y la conformación del epítopo de unión identificado. Despues de mutar la secuencia, se estudia la variante del anticuerpo para ver si tiene una mayor vida media *in vivo* 10 que la del anticuerpo original. Si la variante del anticuerpo no tiene una mayor vida media *in vivo* tras el estudio, su secuencia se altera adicionalmente para incluir la secuencia y la conformación del epítopo de unión identificado. Se estudia el anticuerpo alterado para una vida media *in vivo* más larga, y se continúa este proceso hasta que se obtiene una molécula que muestra una vida media *in vivo* más larga.
- 15 El epítopo de unión de receptor salvaje incorporado de esta manera al anticuerpo de interés es cualquiera de los epítopos adecuados tal y como se han definido anteriormente, y su naturaleza dependerá, por ejemplo, del tipo de anticuerpo que se modifica. La transferencia se realiza de manera que el anticuerpo de interés aún posee las actividades biológicas descritas en la presente invención.
- 20 El epítopo preferiblemente constituye una región en la que uno o más residuos de aminoácidos de uno o dos bucles de un dominio Fc se transfieren a una posición análoga del fragmento de anticuerpo. Incluso más preferiblemente, se transfieren tres o más residuos de uno o dos bucles del dominio Fc. Aún más preferiblemente, el epítopo se extrae del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo, de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3 o V<sub>H</sub>, o más de una de dichas regiones, del anticuerpo. Alternativamente, el epítopo se extrae del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere 25 a la región C<sub>L</sub> o la región V<sub>L</sub>, o ambas, del fragmento de anticuerpo. Véase la patente de Estados Unidos 5.739.277 concedida el 14 de abril de 1998, incorporada expresamente por referencia en la presente invención.

### III. Formulaciones farmacéuticas

- 30 Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos utilizados en la presente invención se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla del anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16<sup>a</sup> Edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales 35 como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzenotonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabens, tales como metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); 40 proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> o polietilenglicol (PEG).
- 45 La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación concreta a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar adicionalmente anticuerpos que se unen a EGFR, ErbB2 (por ejemplo, un anticuerpo que se une a un epítopo diferente en ErbB2), ErbB3, ErbB4 o el factor endotelial 50 vascular (VEGF) en la formulación. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente citotóxico, una citoquina o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada combinadas en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

- 55 Los principios activos también pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización entre fases, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16<sup>a</sup> Edición, Osol, A. Ed. (1980).
- 60 Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

- 65 Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofílicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etyl-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicó-

lico degradables, tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante casi 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos más cortos de tiempo. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo largo de tiempo, se desnaturalizan o agregan como resultado de la exposición a humedad a 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear varias estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación se descubre que es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de tio-disulfuro, se puede conseguir la estabilización mediante la modificación de residuos sulfhidrilos, 10 la liofilización de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, la utilización de aditivos adecuados y el desarrollo de composiciones de matrices poliméricas específicas.

15 También se contempla en la presente invención el anticuerpo anti-ErbB2 conjugado a una nanopartículas biodegradable (por ejemplo, ácido poliláctico-co-glicólico) para aumentar la especificidad del tumor.

#### IV. Tratamiento con los anticuerpos anti-ErbB2

20 La presente invención proporciona la fabricación de un medicamento que se puede utilizar en un procedimiento de tres etapas para tratar un paciente humano susceptible de padecer o diagnosticado con un tumor (o tumores) en el que se expresa la proteína ErbB2. Generalmente, el tumor a tratar es un tumor primario. En la primera etapa, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-ErbB2 se administra al paciente con el fin de reducir el tamaño o eliminar el tumor (o tumores) en el paciente antes de la intervención quirúrgica. El paciente se trata opcionalmente además con uno o más agentes quimioterapéuticos antes de la intervención quirúrgica. En la segunda etapa, el tumor se extirpa quirúrgicamente según procedimientos quirúrgicos estándar (por ejemplo, lpectomía o mastectomía). 25 Después de la intervención quirúrgica, en la tercera etapa, se administra al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-ErbB2, o de por lo menos un agente quimioterapéutico, con el fin de reducir la probabilidad de reaparición de la enfermedad. En general, se administrará un anticuerpo anti-ErbB2 al paciente después de la cirugía y, opcionalmente, se administrarán adicionalmente al paciente uno o más agentes quimioterapéuticos durante esta fase de la terapia.

30 Se considera que los anticuerpos anti-ErbB2 se pueden utilizar para tratar un tumor que expresa, y preferiblemente sobreexprese, la proteína ErbB2. Entre los ejemplos de condiciones o trastornos a tratar en la presente invención se incluyen tumores benignos o malignos (por ejemplo, renal, hígado, vejiga, mama, gástrico, ovárico, colorrectal, próstata, pancreático, pulmón, vulva, tiroides, carcinomas hepáticos; sarcomas; glioblastomas; y varios tumores de cabeza y cuello); leucemias y tumores de linfoide; otros trastornos, tales como neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocoélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

40 Los anticuerpos se pueden administrar a un paciente humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo o mediante la infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa del anticuerpo.

45 Cuando el anticuerpo anti-ErbB2 se combina con un agente quimioterapéutico, éste es preferiblemente un taxoide, por ejemplo, paclitaxel o doxetaxel. La administración combinada de la presente invención incluye la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y la posterior administración el cualquiera orden, en el que preferiblemente existe un periodo de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. La preparación y las pautas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar según las instrucciones del fabricante o según se determina empíricamente por un técnico experto. La preparación y las pautas de dosificación para dicha quimioterapia también están descritas en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). La administración de agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración del anticuerpo o se puede administrar simultáneamente con el mismo. El anticuerpo se puede combinar con un compuesto anti-estrógeno, tal como tamoxifeno, o una anti-progesterona, tal como onapristona (véase, EP616812) en dosis conocidas para dichas moléculas.

55 Puede ser deseable administrar también anticuerpos contra otros antígenos asociados a tumores, tales como anticuerpos que se unen a EGFR, ErbB3, ErbB4 o el factor endotelial vascular (VEGF). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden co-administrar dos o más anticuerpos anti-ErbB2 al paciente. Algunas veces, puede ser ventajoso administrar también una o más citoquinas al paciente. En una realización preferida, el anticuerpo ErbB2 se coadministra con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento se puede administrar en primer lugar, seguido del anticuerpo ErbB2. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración del anticuerpo ErbB2 en primer lugar. Las dosis adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son los utilizados actualmente y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el anticuerpo anti-ErbB2. Cuando se observa cardiotoxicidad, según se considere adecuado se puede administrar un cardioprotector al paciente.

60 Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosis apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal y como se ha definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el

anticuerpo se administra con objetivos de prevención o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico responsable. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

- 5 Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hasta 15  $\text{mg}/\text{kg}$  (por ejemplo, 0,1-20  $\text{mg}/\text{kg}$ ) de anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, mediante, por ejemplo, uno o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosis diaria habitual podría variar desde, aproximadamente, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 100  $\text{mg}/\text{kg}$  o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que 10 tiene lugar la desaparición deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

#### V. Artículos de fabricación

- 15 Se puede proporcionar un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para el tratamiento de la enfermedad y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-ErbB2. La etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con el mismo indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la enfermedad de elección e indica adicionalmente el tratamiento del paciente según el protocolo descrito en la presente invención. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, 20 tal como una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir también 25 otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

#### Depósito de materiales

- 30 La siguiente línea de células de hibridoma se ha depositado con la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA (ATCC):

	Designación de anticuerpo	ATCC No.	Fecha de depósito
35	<b>7C2</b>	ATCC HB-12215	17 octubre, 1996
	<b>7F3</b>	ATCC HB-12216	17 octubre, 1996
40	<b>4D5</b>	ATCC CRL-10463	24 mayo, 1990

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

#### 45 Ejemplo 1

Se produjo el anticuerpo 4D5 monoclonal murino IgG<sub>1</sub>K anti-ErbB2, específico para el dominio extracelular de ErbB2, tal y como se describió en Fendly *et al.*, Cancer Research 50:1550-1558 (1990) y la Patente de Estados Unidos 5.677.171 concedida el 14 de octubre de 1997. En resumen, se recogieron las células NIH 3T3/HER2-3<sub>400</sub> (que expresaban aproximadamente 1 x 10<sup>5</sup> moléculas de ErbB2/célula) producidas tal y como se describe en Hudziak el al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84:7159 (1987) con tampón fosfato salino (PBS) que contenía EDTA 25 mM y se utilizó para inmunizar ratones BALB/c. Se administraron a los ratones inyecciones i.p. de 10<sup>7</sup> células en 0,5 ml de PBS en las semanas, 0, 2, 5 y 7. A los ratones con antisueros que inmunoprecipitaron ErbB2 marcado con <sup>32</sup>P se administraron inyecciones i.p. de un extracto de membrana con ErbB2 purificado con Sefarosa de aglutinina de germen de trigo (WGA) en las semanas 9 y 13. A continuación, se administró una inyección i.v. de 0,1 ml de la preparación de ErbB2 y se fusionaron los esplenocitos con línea de mieloma de ratón X63-Ag8.653. Se cribaron los sobrenadantes de hibridoma por la unión a ErbB2 mediante ELISA y radioinmunoprecipitación. Se utilizó MOPC-21 (IgG 1), (Cappell, Durham, NC), como un control que encaja con el isotipo.

60 Se diseñó una versión humanizada del anticuerpo murino 4D5 (HERCEPTIN<sup>®</sup>) mediante la inserción de las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo murino 4D5 en el armazón de una inmunoglobulina humana de consenso (IgG<sub>1</sub>) (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289 [1992]; y Patente de Estados Unidos N° 5.821.337 concedida el 13 de octubre de 1998). El anticuerpo monoclonal anti-ErbB2 humanizado resultante tiene alta afinidad por p185<sup>HER2</sup> (constante de "Dillohiation" [K<sub>d</sub>]=0,1 nmol/L), inhibe considerablemente, *in vitro* y en xenoinjertos humanos, el crecimiento de células de cáncer de mama que contienen altos niveles de ErbB2, induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), y se ha encontrado que es activo clínicamente, como un único agente, en pacientes con cánceres de mama metastáticos que sobreexpresan ErbB2 que habían recibido amplia terapia previa.

HERCEPTIN® es producido por una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) genéticamente creada, desarrollada a gran escala, que secreta el anticuerpo en el medio de cultivo. El anticuerpo se purifica a partir de los medios de cultivo de CHO utilizando procedimientos cromatográficos y de filtración. Se ensayó cada lote de anticuerpos usado para verificar la identidad, la pureza, y la potencia, así como cumplir con los requisitos de Food and Drug Administration para la esterilidad y la seguridad.

En la presente invención se tratan pacientes que presentan tumor de mama primario caracterizado por la sobreexpresión del oncogén ErbB2 (HER2) [2+ a 3+ tal y como se determina mediante immunohistoquímica o hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH)]. Puede determinarse la expresión tumoral de ErbB2 mediante análisis immunohistoquímico, tal y como se describe previamente (Slamon *et al.*, Science 235:177-182 [1987]; Slamon *et al.*, Science 244:707-712 [1989]), de un conjunto de secciones finas preparadas a partir de bloques tumorales del paciente incrustados en parafina. Se considera que los tumores sobreexpresan ErbB2 si por lo menos un 25% de las células tumorales muestran la tinción de membrana característica para ErbB2.

Se tratan los pacientes en primer lugar con HERCEPTIN® durante 8-24 semanas, opcionalmente en combinación con paclitaxel (TAXOL®), con el objetivo de reducir el tamaño o eliminar el tumor antes de intervención quirúrgica. En el día 0, se administra intravenosamente una dosis de 4 mg/kg de HERCEPTIN®, durante un período de 90 minutos. A partir del día 7, los pacientes reciben una administración semanal de anticuerpo 2 mg/kg (i.v.) durante un período de 90 minutos. Los pacientes pueden recibir adicionalmente paclitaxel (TAXOL®). La dosis inicial del anticuerpo HERCEPTIN® precede al primer ciclo del régimen de quimioterapia durante 24 horas. Las dosis posteriores del anticuerpo se administran inmediatamente antes de la administración de la quimioterapia, si se tolera bien la dosis inicial del anticuerpo. Si no se tolera bien la primera dosis del anticuerpo, las infusiones posteriores continúan precediendo a la administración de quimioterapia durante 24 horas. Se administra Paclitaxel (TAXOL®) en una dosis de 175 mg/m<sup>2</sup> durante 3 horas mediante administración intravenosa. Se premedican todos los pacientes que reciben paclitaxel con dexametasona (o su equivalente) 20 mg x 2, administrada oralmente 12 y 6 horas antes del paclitaxel; difenhidramina (o su equivalente) 50 mg, iv, administrado 30 minutos antes del paclitaxel; y dimetidina (u otro bloqueador de H<sub>2</sub>) 300 mg, iv, administrado 30 minutos antes del paclitaxel. Después de la terapia anterior, pueden evaluarse las mediciones clásicas de respuesta inmediatamente antes de la intervención quirúrgica; es decir, la suma de los productos del diámetro en cruz de cualquier nódulo tumoral bajo observación.

Después de la terapia tal y como se describe anteriormente, se extirpa quirúrgicamente el tumor de acuerdo con los procedimientos quirúrgicos estándar; lumpectomía o mastectomía. Puede evaluarse la respuesta patológica en este estadio.

Después de la intervención quirúrgica, se trata el paciente con HERCEPTIN®, opcionalmente en combinación con paclitaxel (TAXOL®), con el objetivo de reducir la probabilidad de reaparición de la enfermedad. En el día 0, se administra intravenosamente una dosis de 4 mg/kg de HERCEPTIN® durante un período de 90 minutos. A partir del día 7, los pacientes reciben semanalmente la administración de 2 mg/kg de anticuerpo (i.v.) durante un período de 90 minutos. Se continua con la terapia con HERCEPTIN® durante un año. Los pacientes pueden recibir adicionalmente paclitaxel (TAXOL®) durante 6-24 semanas. La dosis inicial del anticuerpo HERCEPTIN® precede al primer ciclo del régimen de quimioterapia durante 24 horas. Se administran las dosis posteriores del anticuerpo inmediatamente antes de la administración de la quimioterapia, si se tolera bien la dosis inicial del anticuerpo. Si no se tolera bien la primera dosis del anticuerpo, las infusiones posteriores continúan precediendo a la administración de quimioterapia durante 24 horas. Se administra Paclitaxel (TAXOL®) en una dosis de 175 mg/m<sup>2</sup> durante 3 horas mediante administración intravenosa. Se premedican todos los pacientes que reciben paclitaxel tal y como se describe anteriormente.

Los pacientes tratados de acuerdo con la pauta terapéutica anterior mostrarán una supervivencia global mejorada y/o un tiempo hasta la progresión tumoral (TTP) reducido.

## 50 Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

## 60 Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9422478 A [0004]
- WO 8906692 A [0005] [0096]
- WO 9400136 A [0010]
- WO 9220798 A [0027]
- US 4816567 A [0039] [0040] [0064] [0074] [0076]

# ES 2 320 311 T3

- EP 404097 A [0043]
- WO 9311161 A [0043]
- 5      • WO 9316185 A [0080]
- WO 9308829 A [0082]
- 10     • WO 9404690 A [0084]
- 15     • WO 9627011 A [0085]
- US 4676980 A [0086] [0086]
- 15     • WO 9100360 A [0086]
- WO 92200373 A [0086]
- 20     • EP 03089 A [0086]
- US 5208020 A [0100]
- WO 9321232 A [0102]
- 25     • WO 9411026 A [0105]
- US 4485045 A [0108]
- US 4544545 A [0108]
- 30     • US 5013556 A [0108]
- WO 8101145 A [0110]
- 35     • WO 8807378 A [0110]
- US 4975278 A [0110]
- US 5739277 A [0117]
- 40     • US 3773919 A [0122]
- EP 616812 A [0127]
- 45     • US 5677171 A [0134]
- US 5821337 A [0135]
- US P1757R1 W [0142]
- 50     • US 60134085 B [0142]

## Documentos que no son patentes citados en la descripción

- 55     • **SLAMON** *et al. Science*, 1987, vol. 235, 177-182 [0002] [0137]
- **SLAMON**. *Science*, 1989, vol. 244, 707-712 [0002]
- **HUDZIAK** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 7159-7163 [0003]
- 60     • **DIFIORE** *et al. Science*, 1987, vol. 237, 78-182 [0003]
- **GUY** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 10578-10582 [0003]
- 65     • **DREBIN** *et al. Cell*, 1985, vol. 41, 695-706 [0004]
- **DREBIN** *et al. PNAS (USA)*, 1986, vol. 83, 9129-9133 [0004]

## ES 2 320 311 T3

- **DREBIN** *et al. Oncogene*, 1988, vol. 2, 387-394 [0004]
- **DREBIN** *et al. Oncogene*, 1988, vol. 2, 273-277 [0004]
- 5       • **MYERS**. *Meth. Enzym.*, 1991, vol. 198, 277-290 [0004]
- **HUDZIAK** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9 (3), 1165-1172 [0005]
- 10      • **FENDLY** *et al. Cancer Research*, 1990, vol. 50, 1550-1558 [0005] [0134]
- **KOTTS** *et al. In Vitro*, 1990, vol. 26 (3), 59A [0005]
- 15      • **SARUP** *et al. Growth Regulation*, 1991, vol. 1, 72-82 [0005]
- **SHEPARD** *et al. J. Clin. Immunol.*, 1991, vol. 11 (3), 117-127 [0005]
- 20      • **KUMAR** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1991, vol. 11 (2), 979-986 [0005]
- **LEWIS** *et al. Cancer Immunol. Immunother.*, 1993, vol. 37, 255-263 [0005]
- 25      • **PIETRAS** *et al. Oncogene*, 1994, vol. 9, 1829-1838 [0005]
- **VITETTA** *et al. Cancer Research*, 1994, vol. 54, 5301-5309 [0005]
- 30      • **SLIWKOWSKI** *et al. J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269 (20), 14661-14665 [0005] [0028]
- **SCOTT** *et al. J. Biol. Chem.*, vol. 266, 14300-5 [0005]
- 35      • **D'SOUZA** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, vol. 91, 7202-7206 [0005]
- **TAGLIABUE** *et al. Int. J. Cancer*, 1991, vol. 47, 933-937 [0006]
- 40      • **MCKENZIE** *et al. Oncogene*, 1989, vol. 4, 543-548 [0007]
- **MAIER** *et al. Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 5361-5369 [0007]
- 45      • **BACUS** *et al. Molecular Carcinogenesis*, 1990, vol. 3, 350-362 [0007]
- **BACUS** *et al. Cancer Research*, 1992, vol. 52, 2580-2589 [0009]
- 50      • **XU** *et al. Int. J. Cancer*, 1993, vol. 53, 401-408 [0010]
- **KASPRZYK** *et al. Cancer Research*, 1992, vol. 52, 2771-2776 [0010]
- **HANCOCK** *et al. Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 4575-4580 [0010]
- 55      • **SHAWVER**. *Cancer Res.*, 1994, vol. 54, 1367-1373 [0010]
- **ARTEAGA** *et al. Cancer Res.*, 1994, vol. 54, 3758-3765 [0010]
- 50      • **HARWERTH** *et al. J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 15160-15167 [0010]
- **BASELGA** *et al. J. Clin. Oncol.*, 1996, vol. 14, 737-744 [0011]
- 55      • **RAVDIN; CHAMNESS**. *Gene*, 1995, vol. 159, 19-27 [0012]
- **HYNES; STERN**. *Biochim Biophys Acta*, 1994, vol. 1198, 165-184 [0012]
- 60      • **BASELGA** *et al. Oncology*, 1997, vol. 11 (1), 43-48 [0012]
- **BASELGA** *et al. Breast Cancer, Proceedings of ASCO*, 1994, vol. 13, 53 [0012]
- 65      • **GOLDENBERG**. *Clinical Therapeutics*, 1999, vol. 21 (2 [0013]
- **DEES; JENNEDY**. *Current Opinion in Oncology*, November 1998, vol. 10 (6), 517-522 [0013]
- 70      • **ESTEVA; HOROBAGYI**. *The Oncologist*, 1998, vol. 3, 300-313 [0014]

# ES 2 320 311 T3

- **KUERER** *et al. J. Clin. Oncology*, February 1999, vol. 17, 460-469 [0015]
- **MCMASTERS; HUNT**. *J. Clin. Oncology*, February 1999, vol. 17, 441-444 [0015]
- 5     • **NAKAMURA** *et al. J. of Virology*, October 1993, vol. 67 (10), 6179-6191 [0018]
- **RENZ** *et al. J. Cell Biol*, June 1994, vol. 125 (6), 1395-1406 [0018]
- 10    • **SEMBA** *et al. PNAS (USA)*, 1985, vol. 82, 6497-6501 [0019]
- 15    • **YAMAMOTO** *et al. Nature*, 1986, vol. 319, 230-234 [0019]
  - Antibodies, A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1988 [0020] [0095]
  - Antibodies. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1988 [0022]
- 20    • **MOORE** *et al. Cytotechnology*, 1995, vol. 17, 1-11 [0023]
- 25    • **SCHECTER** *et al. Nature*, 1984, vol. 312, 513 [0026]
- 30    • **DREBIN** *et al. Nature*, 1984, vol. 312, 545-548 [0026]
- 35    • **HOLMES** *et al. Science*, 1992, vol. 256, 1205-1210 [0027]
- 40    • **WEN** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1994, vol. 14 (3), 1909-1919 [0027]
- 45    • **MARCHIONNI** *et al. Nature*, 1993, vol. 362, 312-318 [0027]
- 50    • **KABAT** *et al. NIH Publ. No. 91-3242*, 1991, vol. I, 647-669 [0031]
- 55    • **ZAPATA** *et al. Protein Eng.*, 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0038]
- 60    • **KOHLER** *et al. Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0039] [0064]
- 65    • **CLACKSON** *et al. Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0039] [0073]
- 70    • **MARKS** *et al. J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0039]
- 75    • **MORRISON** *et al. Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0040]
- 80    • **JONES** *et al. Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0041] [0076]
- 85    • **REICHMANN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0041]
- 90    • **PRESTA**. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0041]
- 95    • **PLÜCKTHUN**. The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. *Springer-Verlag*, 1994, vol. 113, 269-315 [0072]
- 100   • **HOLLINGER** *et al. Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0043]
  - Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs. **MURAKAMI** *et al.* The Molecular Basis of Cancer. *WB Saunders*, 1995, 13 [0053]
- 105   • **WILMAN**. Prodrugs in Cancer Chemotherapy. *Biochemical Society Transactions*, 1986, vol. 14, 375-382 [0056]
  - Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery. **STELLA** *et al.* Directed Drug Delivery. *Humana Press*, 1985, 247-267 [0056]
- 110   • **SEIFERT** *et al. The Annals of Pharmacotherapy*, 1994, vol. 28, 1063-1072 [0059]
- 115   • **SINGAL** *et al. J. Mol. Cell Cardiol.*, 1995, vol. 27, 1055-1063 [0059]
- 120   • **GREEN** *et al. Cancer Research*, 1994, vol. 54, 738-741 [0059]
- 125   • Drug-Induced Heart Disease. *Elsevier*, 1980, 191-215 [0059]
- 130   • **HJALMARSON** *et al. Drugs*, 1994, vol. 47 (4), 31-9 [0059]

- **SHADDY** *et al. Am. Heart J.*, 1995, vol. 129, 197-9 [0059]
- **PARACCHINI** *et al. Anticancer Res.*, 1993, vol. 13, 1607-1612 [0059]
- 5       • **STANCOVSKI** *et al. PNAS (USA)*, 1991, vol. 88, 8691-8695 [0060]
- **GODING**. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. *Academic Press*, 1986, 59-103 [0065] [0070]
- 10      • **KOZBOR**. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0067]
- 15      • **BRODEUR** *et al. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc*, 1987, 51-63 [0067]
- **MUNSON** *et al. Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0069]
- 15      • **SKERRA** *et al. Curr. Opinion in Immunol.*, 1993, vol. 5, 256-262 [0072]
- **PLÜCKTHUN**. *Immunol. Revs.*, 1992, vol. 130, 151-188 [0072]
- 20      • **MCCAFFERTY** *et al. Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0073]
- **MARKS** *et al. J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0073] [0079]
- 25      • **MARKS** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0073]
- **WATERHOUSE** *et al. Nuc. Acids. Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0073]
- **MORRISON** *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851 [0074]
- 30      • **RIECHMANN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0076]
- **VERHOEYEN** *et al. Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0076]
- 35      • **SIMS** *et al. J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296 [0077]
- **CHOTHIA** *et al. J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901 [0077]
- **CARTER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285 [0077]
- 40      • **PRESTA** *et al. J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623 [0077]
- **JAKOBOVITS** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0079]
- 45      • **JAKOBOVITS** *et al. Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0079]
- **BRUGGERMANN** *et al. Year in Immuno.*, 1993, vol. 7, 33 [0079]
- **HOOGENBOOM** *et al. J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0079]
- 50      • **MORIMOTO** *et al. Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1992, vol. 24, 107-117 [0080]
- **BRENNAN** *et al. Science*, 1985, vol. 229, 81 [0080]
- 55      • **CARTER** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0080]
- **MILLSTEIN** *et al. Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0082]
- **TRAUNECKER** *et al. EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0082]
- 60      • **SURESH** *et al. Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0084]
- **SHALABY** *et al. J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0088]
- 65      • **KOSTELNY** *et al. J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0089]
- **HOLLINGER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0089]

- **GRUBER** *et al. J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0089]
- **TUTT** *et al. J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0090]
- 5 • **CARON** *et al. J. Exp Med.*, 1992, vol. 176, 1191-1195 [0097]
- **SHOPES**, B. *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 2918-2922 [0097]
- 10 • **WOLFF** *et al. Cancer Research*, 1993, vol. 53, 2560-2565 [0097]
- **STEVENSON** *et al. Anti-Cancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0097]
- 15 • **CHARI** *et al. Cancer Research*, 1992, vol. 52, 127-131 [0100] [0105]
- **HINMAN** *et al. Cancer Research*, 1993, vol. 53, 3336-3342 [0101]
- 20 • **LODE** *et al. Cancer Research*, 1998, vol. 58, 2925-2928 [0101]
- **VITETTA** *et al. Science*, 1987, vol. 238, 1098 [0105]
- 25 • **EPSTEIN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0108]
- **HWANG** *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0108]
- 30 • **MARTIN** *et al. J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 286-288 [0109]
- **GABIZON** *et al. J. National Cancer Inst.*, 1989, vol. 81 (19), 1484 [0109]
- **MASSEY**. *Nature*, 1987, vol. 328, 457-458 [0112]
- 35 • **NEUBERGER** *et al. Nature*, 1984, vol. 312, 604-608 [0113]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 1980 [0120]
- **HUDZIAK**. *Proc. Natl. Acad Sci. (USA)*, 1987, vol. 84, 7159 [0134]
- 40 • **CARTER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285-4289 [0135]
- **SLAMON** *et al. Science*, 1989, vol. 244, 707-712 [0137]

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Utilización de un anticuerpo anti-ErbB2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente humano susceptible o diagnosticado con un tumor en el que se expresa la proteína ErbB2, en la que el medicamento es para el tratamiento del paciente antes de las etapas de extirpación quirúrgica del tumor y el tratamiento del paciente después de la extirpación quirúrgica del tumor con anticuerpo anti-ErbB2 y/o un agente quimioterapéutico.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el medicamento es para el tratamiento del paciente antes de las etapas de extirpación quirúrgica del tumor y el tratamiento del paciente con un agente quimioterapéutico después de la extirpación quirúrgica del tumor.
- 15 3. Utilización según la reivindicación 1, en la que el medicamento es para el tratamiento del paciente antes de la extirpación quirúrgica del tumor y después de la extirpación quirúrgica del tumor.
- 20 4. Utilización según la reivindicación 3, en la que el medicamento es para el tratamiento del paciente antes de las etapas de extirpación quirúrgica del tumor y el tratamiento del paciente después de la extirpación quirúrgica del tumor con anticuerpo anti-ErbB2 y un agente quimioterapéutico.
- 25 5. Utilización según la reivindicación 1, en la que el tumor sobreexpresa la proteína ErbB2.
6. Utilización según la reivindicación 5, en la que el tumor se selecciona del grupo que consiste en tumor de mama, tumor de células escamosas, tumor de células pequeñas de pulmón, tumor de células no pequeñas de pulmón, tumor gastrointestinal, tumor pancreático, glioblastoma, tumor cervical, tumor de ovario, tumor de hígado, tumor de vejiga, hepatoma, tumor de colon, tumor colorrectal, tumor endometrial, tumor de las glándulas salivares, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor de vulva, tumor de tiroides, tumor hepático, tumor de cabeza y tumor de cuello.
- 30 7. Utilización según la reivindicación 6, en la que el tumor es un tumor de mama.
8. Utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo se une al dominio extracelular de la proteína ErbB2.
- 25 9. Utilización según la reivindicación 8, en la que el anticuerpo se une al epítopo 4D5 en la secuencia del dominio extracelular de ErbB2.
- 35 10. Utilización según la reivindicación 9, en la que el anticuerpo es un anticuerpo 4D5 humanizado anti-ErbB2.
11. Utilización según la reivindicación 2, en la que el agente quimioterapéutico es un taxoide.
12. Utilización según la reivindicación 11, en la que el taxoide es paclitaxel o docetaxel.
- 40 13. Utilización según la reivindicación 4, en la que el agente quimioterapéutico es un taxoide.

45

50

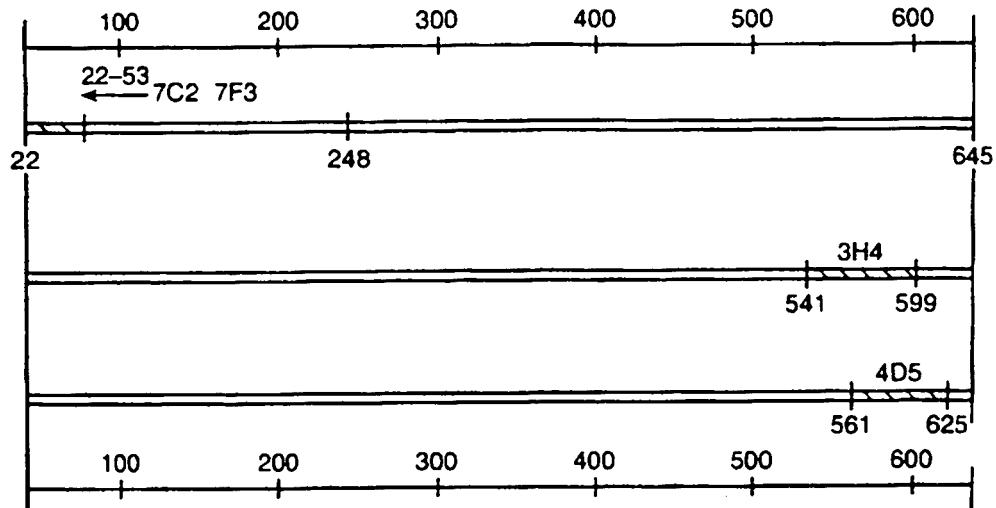
55

60

65

# ES 2 320 311 T3

3H4 aa 541-599  
 4D5 aa 529-625  
 7C2 aa 22-53  
 7F3 aa 22-53



Epitopo 3H4 (SEC ID No. 3)

VEECRVLQQLPREYVNDARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVAR  
 |  
 541  
 |  
 599

Epitopo 4D5 (SEC ID No. 4)

LPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQP  
 |  
 561  
 |  
 625

**FIG.\_1**

1 MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMLRLPA  
 38 SPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFL  
 75 QDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDN  
 112 YALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGRELQLRSLTEI  
 149 LKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLID  
 186 TNRSRA

**FIG.\_2**

# ES 2 320 311 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc.

5 <120> TRATAMIENTO CON ANTICUERPOS ANTI-ErbB2

<130> P1757R1PCT

10 <141> 2000-05-09

<150> US 60/134,085

<151> 1999-05-14

15 <160> 4

<210> 1

20 <211> 166

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu
	1					5				10					15
30	Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	His	Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val
						20				25					30
35	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser
					35					40					45
40	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val	Gln	Gly	Tyr	Val	Leu
					50					55					60
45	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu	Gln	Arg	Leu	Arg
					65					70					75
50	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ala
					80					85					90
55	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro	Val	Thr
					95					100					105
60	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu
					110					115					120
65	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Asn	Pro	Gln
					125					130					135
70	Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe	His	Lys
					140					145					150
75	Asn	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg
					155					160					165
80	<b>Ala</b>														

<210> 2

ES 2 320 311 T3

<211> 32

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro

10

1 5 10 15

Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln  
20 25 30

15

Gly Cys

<210> 3

<211> 59

20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 3

Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val  
1 5 10 15

30

Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln  
20 25 30

35

Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val  
35 40 45

Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg  
50 55

40

<210> 4

<211> 65

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 4

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr  
1 5 10 15

50

Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr  
20 25 30

55

Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys  
35 40 45

60

Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu  
50 55 60

Gly Ala Cys Gln Pro  
65

65