



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 274 537**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97908923 .2**

86 Fecha de presentación : **07.03.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0896586**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.02.1999**

54

Título: **Anticuerpos ErbB3.**

30

Prioridad: **27.03.1996 US 624036**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

73

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

72

Inventor/es: **Akita, Robert y**
Sliwkowski, Mark

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 274 537 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

Anticuerpos ErbB3.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere generalmente a anticuerpos que se unen al receptor ErbB3. En particular se refiere a anticuerpos anti-ErbB3 que, sorprendentemente, reducen la formación inducida por HRG de un complejo de proteínas ErbB2-ErbB3 en una célula que expresa ambos receptores y reduce la activación de ErbB2 inducida por heregulina en dicha célula, y también puede incrementar la afinidad de unión de heregulina (HRG) por la proteína ErbB3.

Descripción de la técnica anterior

La transducción de señales que regulan el crecimiento celular y la diferenciación se regula en parte mediante la fosforilación de varias proteínas celulares. Las proteínas tirosina quinasas son enzimas que catalizan este proceso. Se cree que los receptores de proteínas tirosina quinasas dirigen el crecimiento celular mediante la fosforilación de tirosina estimulada por ligandos en sustratos intracelulares. Entre los receptores de proteínas tirosina quinasas del factor de crecimiento de la subfamilia de la clase I se incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de 170 kDa codificado por el gen *erbB1*, el cual se ha implicado casualmente en tumores humanos. En particular, la expresión aumentada de este gen se ha observado en los carcinomas más agresivos de mama, vejiga, pulmón y estómago.

El segundo miembro de la subfamilia de la clase I, p185^{neu}, se identificó originalmente como el producto del gen de transformación de neuroblastomas de ratas químicamente tratadas. El gen *neu* (también denominado *erbB2* y HER2) codifica un receptor de proteína tirosina quinasa de 185 kDa. La amplificación y/o sobreexpresión del gen HER2 humano se correlaciona con una prognosis pobre en los cáncer de mama y ovario (Slamon *et al.*, *Science*, 235:177-182 (1987); y Salmón *et al.*, *Science*, 244: 707-712 (1989)). La sobreexpresión de HER2 también se ha correlacionado con otros carcinomas que incluyen carcinomas de estómago, endometrio, glándulas salivares, pulmón, riñón, colon y vejiga.

También se ha descrito un gen relacionado adicional, denominado *erbB3* o HER3. Véase Patente de Estados Unidos Nos. 5.183.884 y 5.480.968; Plowman *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 87: 4905-4909 (1990); Kraus *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86: 9193-9197 (1989); Solicitud de Patente EP No. 444.961 A1; y Kraus *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90: 2900-2904 (1993). Kraus *et al.* (1989) descubrieron que niveles notablemente elevados de ARNm de *erbB3* estaban presentes en ciertas líneas celulares de tumores mamarios humanos indicando que *erbB3*, como *erbB1* y *erbB2*, pueden jugar un papel importante en algunos tumores humanos. Estos investigadores demostraron que algunas líneas celulares de tumores mamarios humanos muestran un incremento significativo de la fosforilación de tirosina de ErbB3 en estado estacionario, indicando además que este receptor puede jugar un papel en tumores humanos. Por consiguiente, los bioensayos de diagnóstico que utilizan anticuerpos que se unen a ErbB3 se describen por Kraus *et al.* en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.183.884 y 5.480.968.

El papel de *erbB3* en el cáncer ha sido explorado por otros. Se ha observado que se sobreexpresa en el cáncer de mama (Lemoine *et al.*, *Br. J. Cancer*, 66: 1116-1121 (1992)), gastrointestinal (Poller *et al.*, *J. Pathol.*, 168: 275-280 (1992), Rajkumar *et al.*, *J. Pathol.*, 170: 271-278 (1993), y Sanidas *et al.*, *Int. J. Cancer* 54: 935-940 (1993)), y pancreático (Lemoine *et al.*, *J. Pathol.*, 168: 269-273 (1992), y Friess *et al. Clinical Cancer Research* 1: 1413-1420 (1995)).

ErbB3 es único entre la familia de receptores ErbB en que posee una escasa o nula actividad de tirosina quinasa intrínseca (Guy *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91: 8132-8136 (1994) y Kim *et al. J. Biol. Chem.* 269: 24747-55 (1994)). Cuando ErbB3 se coexpresa con ErbB2, se forma un complejo de señalización activo y los anticuerpos dirigidos contra ErbB2 son capaces de deshacer este complejo (Sliwkowski *et al. J. Biol. Chem.*, 269 (20): 14661-14665 (1994)). Adicionalmente, la afinidad de ErbB3 por heregulina (HER) aumenta hasta un estado de afinidad más elevado cuando se coexpresa con ErbB2. Véase también, Levi *et al.*, *Journal of Neuroscience* 15: 1329-1340 (1995); Mortissey *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92: 1431-1435 (1995); y Lewis *et al.*, *Cancer Res*, 56: 1457-1465 (1996) con respecto al complejo de proteínas ErbB2-ErbB3.

Rajkumar *et al.*, *British Journal Cancer* 70(3): 459-465 (1994) desarrollaron un anticuerpo monoclonal contra ErbB3 que tenía un efecto agonístico en el crecimiento independiente del anclaje de líneas celulares que expresan este receptor.

La subfamilia de la clase I de receptores de proteínas tirosina quinasas del factor de crecimiento se ha extendido además para incluir el receptor HER4/p180^{erbB4}. Ver la Solicitud de Patente EP No. 599.274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90: 1746-1750 (1993); y Plowman *et al. Nature*, 366: 473-475 (1993). Plowman *et al.* observaron que el aumento de la expresión de HER4 se correlacionaba estrechamente con ciertos carcinomas de origen epitelial, incluyendo adenocarcinomas de mama. Por consiguiente, los métodos de diagnóstico para la detección de condiciones neoplásicas humanas (especialmente cánceres de mama) que evalúan la expresión de HER4 se describen en la Solicitud de Patente EP No. 599.274.

La búsqueda de un activador del oncogén de HER2 ha llevado al descubrimiento de una familia de polipéptidos de heregulina. Estas proteínas parecen surgir del splicing (“corte y empalme”) de un gen único que se mapeó en el brazo corto del cromosoma 8 humano por Lee *et al.*, *Genomics*, 16: 790-791 (1993); y Orr-Urtreger *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, Vol. 90 páginas 1867-1871 (1993).

5 Holmes *et al.* aislaron y clonaron una familia de activadores de polipéptidos para el receptor HER2 que denominaron heregulina- α (HRG- α), heregulina- β 1 (HRG- β), heregulina- β 2 (HRG- β 2), tipo heregulina- β 2 (tipo HRG- β 2), y heregulina- β 3 (HRG- β 3). Véase Holmes *et al.*, *Science*, 256: 1205-1210 (1992); y WO 92/20798. El polipéptido de 45 kDa, HRG- α , se purificó a partir del medio condicionado de la línea celular del cáncer de mama humano MDA-MB-231. Estos investigadores demostraron la capacidad de los polipéptidos de heregulina purificados para activar la fosforilación de tirosina del receptor HER2 en células de tumores de mama MCF-7. Además, se mostró la actividad mitogénica de los polipéptidos de heregulina en células SK-BR-3 (que expresan niveles elevados del receptor HER2) Como otros factores de crecimiento que pertenecen a la familia de EGF, los polipéptidos solubles de HRG parecen derivarse de un precursor unido a membrana (denominado pro-HRG) que se procesa proteolíticamente para liberar la forma soluble de 45 kDa. Estos pro-HRGs carecen de un péptido señal N-terminal.

Aunque las heregulinas son sustancialmente idénticas en los primeros 213 residuos de aminoácidos, se clasifican en dos tipos principales, α y β , basándose en los dominios variantes de tipo EGF que difieren en sus partes C-terminales. No obstante, estos dominios de tipo EGF son idénticos en el espaciado de seis residuos de cisteínas contenidos en los mismos. En base a la comparación de la secuencia de aminoácidos, Holmes *et al.* encontraron que entre la primera y la sexta cisteína en el dominio de tipo EGF, las HRGs tenían un 45% de similitud con el factor de crecimiento de tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF), un 35% de similitud con amfiregulina (AR), un 32% de similitud con TGF- α y un 27% de similitud con EGF.

25 El factor de diferenciación *neu* (NDF) de 44 kDa, que es el equivalente en la rata de la HRG humana, se describió en primer lugar por Peles *et al.* *Cell*. 69: 205-216 (1992) y Wen *et al.*, *Cell*. 69:559-572 (1992). Como los polipéptidos de HRG, el NDF tiene un dominio de homología de inmunoglobulina (Ig) seguido de un dominio de tipo EGF y carece de un péptido señal N-terminal. Posteriormente, Wen *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 14 (3): 1909-1919 (1994) llevó a cabo una “clonación exhaustiva” para extender la familia de NDFs. Este trabajo reveló seis pro-NDFs fibroblásticos distintos. Adoptando la nomenclatura de Holmes *et al.*, los NDFs se clasifican como polipéptidos α o β en base a las secuencias de los dominios de tipo EGF. Las isoformas 1 a 4 se caracterizan en base al tramo yuxtamembrana variable (entre el dominio de tipo EGF y el dominio transmembrana). Además, se describe que las isoformas a, b, y c tienen dominios citoplásmicos de longitud variable. Estos investigadores concluyen que se generan isoformas de NDF diferentes mediante “splicing” alternativo y realizan funciones específicas de tejido diferentes.

35 Falls *et al.*, *Cell*, 72:801-815 (1993) describen otro miembro de la familia de heregulinas que denominan polipéptido inductor de la actividad del receptor acetilcolina (ARIA). El polipéptido ARIA derivado de pollo estimula la síntesis de los receptores de acetilcolina del músculo. Véase también WO 94/08007. ARIA es una heregulina de tipo β y carece del espaciador “glico” completo (rico en sitios de glicosilación) presentes entre el dominio de tipo Ig y el dominio de tipo EGF de HRG- α , y HRG β 1- β 3.

Marchionni *et al.*, *Nature*, 362:312-318 (1993) identificó varias proteínas derivadas de bovino que denominaron factores de crecimiento glial (GGFs). Estos GGFs comparten el dominio de tipo Ig y dominio de tipo EGF con las otras proteínas de heregulina descritas anteriormente, pero también tienen un dominio único amino terminal. Los GGFs generalmente no tienen el espaciador “glico” completo entre el dominio de tipo Ig y el dominio de tipo EGF. Sólo uno de los GGFs, GGFII, posee un péptido señal N-terminal.

La expresión de la familia de receptores ErbB2 y polipéptidos de heregulina en el cáncer de mama se estudian en Bacus *et al.*, *Pathology Patterns*, 102(4) (Suplemento 1): S13-S24 (1994).

50 Véase también, Alimandi *et al.*, *Oncogene*, 10:1813-1821 (1995); Beerli *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 15: 6496-6505 (1995); Karunagaran *et al.*, *EMBO J*, 15:254-264 (1996); Wallasch *et al.*, *EMBO J.*, 14:4267-4275 (1995); y Zhang *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 271:3884-3890 (1996), en relación con la familia de receptores anterior.

55 La Patente de Estados Unidos 5480968 describe el polipéptido erbB3, y el antisuero desarrollado con péptidos específicos de ese polipéptido, uno de los cuales proviene del dominio extracelular. Sin embargo, aunque se mencionan posibles usos de los anticuerpos en la terapia y detección de erbB3, no se menciona ningún efecto en la acción de la heregulina y, de hecho, no reconoce su existencia. No se conoce si el antisuero para el dominio extracelular tendría intrínsecamente dicha propiedad, pero en cualquier caso renuncia a las reivindicaciones dirigidas a los anticuerpos *per se*.

Descripción resumida de la invención

65 La presente invención da a conocer anticuerpos que se unen a la proteína ErbB3 y poseen además las siguientes propiedades: una capacidad para reducir la formación inducida por heregulina de un complejo de proteínas ErbB2-ErbB3 en una célula que expresa ErbB2 y ErbB3; y la característica de reducir la activación de ErbB2 inducida por heregulina en una célula que expresa ErbB2 y ErbB3.

La afinidad de unión de la heregulina por la proteína ErbB3 se puede aumentar o reducir, pero es preferible que aumente.

Los anticuerpos preferidos son anticuerpos monoclonales que se unen a un epítipo en el dominio extracelular del receptor ErbB3. Generalmente, los anticuerpos de interés se unirán al receptor ErbB3 con una afinidad de, como mínimo, aproximadamente 10 nM, más preferiblemente, como mínimo, aproximadamente 1 nM. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se inmoviliza en (por ejemplo, unido covalentemente a) una fase sólida, por ejemplo, para purificación por afinidad del receptor o para ensayos de diagnóstico.

Los anticuerpos de los párrafos anteriores se pueden proporcionar en forma de una composición que comprende el anticuerpo y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Se describen una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo de los párrafos anteriores que puede comprender adicionalmente un promotor unido operativamente a la misma; un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico unida operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector; una línea celular que comprende el ácido nucleico (por ejemplo, una línea celular de hibridoma); y un proceso de utilización de una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo para efectuar la producción del anticuerpo que comprende el cultivo de una célula que comprende el ácido nucleico y, opcionalmente, la recuperación del anticuerpo del cultivo celular y, preferiblemente, el medio de cultivo.

La presente invención también da a conocer la utilización del anticuerpo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero.

Se describen un procedimiento para detectar ErbB3 *in vitro* o *in vivo* que comprende el contacto del anticuerpo con una célula sospechosa de contener ErbB3 y la detección de si la unión ha tenido lugar, y un ensayo para detectar un tumor caracterizado por la expresión amplificada de ErbB3 que comprende las etapas de exposición de una célula al anticuerpo descrito en la presente invención y la determinación de la extensión de la unión del anticuerpo a la célula. Generalmente, el anticuerpo a utilizar en dicho ensayo estará marcado. El ensayo de la presente invención puede ser un ensayo *in vitro* (tal como un ensayo ELISA) o un ensayo *in vivo*. Para el diagnóstico de tumores *in vivo*, el anticuerpo está generalmente conjugado a un isótopo radioactivo y está administrado a un mamífero, y la extensión de la unión del anticuerpo a tejidos en el mamífero se observa mediante rastreo externo para radioactividad.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la unión de HRG a células K562 ErbB3 en presencia de varios anticuerpos monoclonales anti-ErbB3. Los anticuerpos anti-ErbB3 purificados se incubaron con una suspensión de células K562 ErbB3 y ^{125}I -HRG β_1 ₍₁₇₇₋₂₄₄₎. Después de aproximadamente 18 horas en hielo, se midieron los recuentos unidos a células. Los recuentos se muestran representados como el porcentaje de unión en ausencia de anticuerpo (control). La unión no específica se determinó utilizando un exceso de HRG β_1 ₍₁₇₇₋₂₄₄₎ (HRG) no marcada. Los anticuerpos con la proteína ErbB2 (2C4) y HSV (5B6) se utilizaron como controles negativos.

La figura 2 muestra el efecto de la concentración de anticuerpo en la unión de HRG. Se realizó un experimento dosis-respuesta en el anticuerpo 3-8D6 que se observó que aumentaba la unión de HRG. Se incubaron células K562 ErbB3 con una concentración fija de ^{125}I -HRG y concentraciones crecientes del anticuerpo 3-8D6. Los datos del experimento se muestran representados como recuentos unidos a célula frente a concentración de anticuerpo.

La figura 3 muestra la unión de HRG a células K562 ErbB3 en presencia y ausencia del anticuerpos 3-8D6 o un fragmento Fab del mismo. Se realizaron experimentos de unión competitiva de ligando en ausencia (control) y presencia de 3-8D6 o Fab 100 nM. Los datos se representan como unido/total (B/T) frente a HRG β_1 ₍₁₇₇₋₂₄₄₎ total.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

A menos que se indique lo contrario, el término “ErbB3” cuando se utiliza en la presente invención se refiere a la proteína ErbB3 mamífera y “*erbB3*” se refiere a gen *erbB3* mamífero. La proteína ErbB3 preferida es la proteína ErbB3 humana presente en la membrana celular de una célula. El gen *erbB3* humano se describe en la Patente de Estados Unidos 5.480.968 de Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4905-4909 (1990).

El anticuerpo de interés puede ser uno que no reacciona de forma cruzada de manera significativa con otras proteínas, tal como el codificado por los genes *erbB1*, *erbB2* y/o *erbB4*. En dichas realizaciones, el grado de unión del anticuerpo a estas proteínas no-ErbB3 (por ejemplo, unión de la superficie celular a receptor endógeno) será inferior al 10% tal y como se determina mediante un análisis de separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). Sin embargo, algunas veces el anticuerpo puede ser uno que no reaccione de forma cruzada con el receptor ErbB4 y, opcionalmente, no reacciones de forma cruzada con el receptor EGFR y/o ErbB2, por ejemplo.

“Heregulina” (HRG) cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un polipéptido que activa el complejo de proteínas ErbB2-ErbB3 (es decir, induce la fosforilación de residuos de tirosina en el complejo ErbB2-ErbB3 tras la unión al mismo). Anteriormente se han descrito varios polipéptidos de heregulina comprendidos por este término. El término incluye fragmentos y/o variantes biológicamente activos de un polipéptido de HRG naturales, tal como un fragmento de dominio de tipo EGF del mismo (por ejemplo, HRG β ₁₇₇₋₂₄₄).

El “complejo de proteínas ErbB2-ErbB3” es un oligómero asociado no covalentemente del receptor ErbB2 y el receptor ErbB3. Este complejo se forma cuando una célula que expresa ambos receptores se expone a HRG. El complejo se puede aislar mediante inmunoprecipitación y se puede analizar mediante SDS-PAGE tal y como se ha descrito en el Ejemplo posterior.

La expresión “reduce la formación inducida por HRG de un complejo de proteínas ErbB2-ErbB3 en una célula que expresa ErbB2 y ErbB3” se refiere a la capacidad del anticuerpo de reducir estadísticamente de forma significativa el número de complejos de proteínas ErbB2-ErbB3 que se forman en una célula que se ha expuesto al anticuerpo y HRG en relación con una célula no tratada (control). La célula que expresa ErbB2 y ErbB3 puede ser una célula o línea de células naturales (por ejemplo, célula Caov3) o se puede producir de forma recombinante mediante la introducción de ácido nucleico que codifica cada una de estas proteínas en una célula huésped. Preferiblemente, el anticuerpo reducirá la formación de este complejo en, como mínimo, un 50%, y más preferiblemente en, como mínimo, un 70%, tal y como se determina mediante densitometría de rastreo por reflectancia de transferencias Western del complejo (véase el Ejemplo posterior).

El anticuerpo que “reduce la formación inducida por HRG de un complejo de proteínas ErbB2-ErbB3 en una célula que expresa ErbB2 y ErbB3” es uno que reduce estadísticamente de forma significativa la actividad de fosforilación de tirosina de ErbB2 que tiene lugar cuando HRG se une a ErbB3 en el complejo de proteínas ErbB2-ErbB3 (presente en la superficie de una célula que expresa los dos receptores) en relación con una célula no tratada (control). Esto se puede determinar en base a los niveles de fosfotirosina en el complejo ErbB2-ErbB3 tras la exposición del complejo a HRG y el anticuerpo de interés. La célula que expresa las proteínas ErbB2 y ErbB3 puede ser una célula o línea de células naturales (por ejemplo, célula Caov3) o se puede producir de forma recombinante. La activación de ErbB2 se puede determinar mediante transferencia Western seguido por el sondeo con un anticuerpo anti-fosfotirosina tal y como se describe en el Ejemplo posterior. Alternativamente, el ensayo de activación del receptor quinasa descrito en WO 95/14930 y Sadick *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 235: 207-214 (1996) se puede utilizar para cuantificar la activación de ErbB2. Preferiblemente, el anticuerpo reducirá la activación de ErbB2 inducida por heregulina en, como mínimo, un 50%, y más preferiblemente, como mínimo, un 70%, tal y como se determina mediante densitometría de rastreo por reflectancia de transferencias Western del complejo sondado con un anticuerpo anti-fosfotirosina (véase el Ejemplo posterior).

El anticuerpo puede ser uno que “aumenta la afinidad de unión de heregulina por la proteína ErbB3”. Esto significa que, en presencia del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo 100 nM), la cantidad de HRG que se une a ErbB3 (por ejemplo, ErbB3 endógeno presente en una célula o línea de células naturales o introducido en una célula mediante técnicas recombinantes, véase el Ejemplo posterior), en relación al control (sin anticuerpo) aumenta estadísticamente de forma significativa. Por ejemplo, la cantidad de HRG que se une a la línea de células K562 transfectada con *erbB3*, tal y como se describe en la presente invención, puede aumentar en presencia de anticuerpo 100 nM en, como mínimo, un 10%, más preferiblemente, como mínimo, un 50%, y aún más preferiblemente, como mínimo, aproximadamente, un 100% (ver figura 1), en relación al control.

El anticuerpo que reduce la unión de HRG a proteína ErbB3 (por ejemplo, ErbB3 presente en una célula) es uno que interfiere con el sitio de unión de HRG en la proteína ErbB3, de manera que disminuye estadísticamente de manera significativa la cantidad de heregulina que es capaz de unirse a este sitio en la molécula. Entre los ejemplos dichos anticuerpos se incluyen anticuerpos 3-2F9, 3-3E9 y 3-6B9 descritos en los Ejemplos de la presente invención.

El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) intactos formados a partir de, como mínimo, dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada. El anticuerpo puede ser una IgM, IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄), IgD, IgA o IgE, por ejemplo. Sin embargo, preferiblemente, el anticuerpo no es un anticuerpo IgM.

Los “fragmentos de anticuerpos” comprende una parte de un anticuerpo intacto, generalmente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diabodies; moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

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 (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son venta-

josos en que se sintetizan mediante el cultivo de hibridomas, sin estar contaminados por otras inmunoglobulinas. El 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 fabricar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o se puede 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 fagos-anticuerpos fagos 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 incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece 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 pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo, así como 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 quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab’, F(ab’)₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) 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 de una región determinante de la 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 tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del marco de la región (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 marco importadas. 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 las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente, como mínimo, 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 PrimatizadoTM 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.

Los fragmentos de anticuerpo “Fv de cadena única” o “sFv” comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios se presentan en una única cadena de polipéptido. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L 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, páginas 269-315 (1994).

El término “diabodies” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H - V_L). 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).

Un anticuerpo “aislado” es uno 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 utilidades de diagnóstico y terapéuticas del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos y no proteínicos. 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 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.

Tal y como se utiliza en la presente invención, el término “epítipo de unión del receptor de rescate” se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable para aumentar la vida media de suero *in vivo* de la molécula IgG.

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.

5 “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.

10 Un “trastorno” es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo anti-ErbB3. Esto incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades que incluyen aquellas condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Generalmente, el trastorno será uno en el que tiene lugar una activación excesiva del complejo de proteínas ErbB2-ErbB3 por heregulina. 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 blastocélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

15 Los términos “cáncer” y “canceroso/a” se refieren a 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. Entre más ejemplos particulares de dichos cánceres se incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, 20 cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

25 El término “agente citotóxico”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de células y/o provoca la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, I, Y y Pr), agentes quimioterapéuticos, y toxinas, tales como toxinas enzimáticamente activas de bacterias, hongos, de origen animal o vegetal, o fragmentos de las mismas.

30 Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen Adriamicina, Doxorubicina, 5-Fluorouracilo, Arabinósido de citosina (“Ara-C”), Ciclofosfamida, Tiotepa, Busulfano, Citoxina, Taxol, Metotrexato, Cisplatino, Melfalano, Vinblastina, Bleomicina, Etopósido, Ifosfamida, Mitomicina C, Mitoxantrona, Vincristina, Vinorelbina, Carboplatino, Tenipósido, Daunomicina, Carminomicina, Aminopterina, Dactinomicina, Mitomicinas, Esperamicinas (véase Patente de Estados Unidos 35 No. 4.675.187), Melfalano y otros gases de nitrógeno relacionados.

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, 40 y hormonas de polipéptidos 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; factores α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor 45 de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGFs), tales como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento I y II de tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones, tales como interferón- α , β , y γ ; 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 α , IL-2, IL-3, 50 IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- α o TNF- β , 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.

55 El término “profármaco”, tal y como se utiliza en esta solicitud, se refiere a un precursor o una forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con fármaco parental y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Filman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” *Biochemical Society Transactions*, 14, páginas 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.), páginas 247-267. Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención 60 incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, profármacos de 5-fluorocitosina y otros 65 profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Entre los ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivatizar a una forma profármaco para la utilización en la presente invención se incluyen, pero no se limitan a, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

La palabra “marcador” cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo. El “marcador” puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

Por “fase sólida” se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. Entre los ejemplos de fases sólidas que se engloban en la presente invención se incluyen las formadas parcial o totalmente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, polivinilalcohol y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos No. 4.275.149.

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-ErbB3 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.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada está en una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico ya que existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye moléculas de ácido nucleico contenidas en células que normalmente expresan el anticuerpo cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

La expresión “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan según la práctica convencional.

Tal y como se utiliza en la presente invención, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se utilizan indistintamente y todas las denominaciones incluyen progenie. De este modo, las palabras “transformantes” y “células transformantes” incluyen las células primarias del sujeto y los cultivos derivados de las mismas sin considerar el número de transferencias. También debe entenderse que la progenie no puede ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica tal y como se rastrea en la célula originalmente transformada. Cuando se pretenden designaciones diferentes, serán obvias a partir del contexto.

II. Modos para realizar la invención

A. Preparación de anticuerpos

La descripción siguiente se muestra como técnicas de ejemplo para la producción de los anticuerpos reivindicados.

(i) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se desarrollan generalmente en animales mediante inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) múltiples 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 maleimidobenzoiil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxi-succinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación de, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y la inyección de la solución intradérmicamente en sitios múltiples. Un mes más tarde,

los animales se estimulan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en sitios múltiples. De siete a catorce días más tarde los animales sangran y el suero se ensaya para el título de anticuerpo. Los animales se estimulan hasta que el título se estabiliza. Preferiblemente, el animal se estimula 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 el carácter del anticuerpo que 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 inmuniza 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 a un nivel elevado estable de anticuerpo por las células productoras de los anticuerpos seleccionados, y son sensibles a un medio, tal como medio HAT. Entre éstos, 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 ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales (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 limitando los procedimientos de dilución 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 RPM1-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores ascitis en un animal.

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

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla 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 transfectan 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 modo producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de

anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Entre los artículos de estudios 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).

5 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de fagos-anticuerpos 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 infección combinatoria y 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 hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

15 El ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante de los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera 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.

20 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.

25 (iii) *Anticuerpos humanizados y humanos*

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, 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); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de CDRs de roedores o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (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.

40 La elección de dominios variables humanos, tanto ligero como pesado, para utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antegenicidad. 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 se acepta como marco de la región humano (FR) 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 marco de región particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco de región 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)).

50 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 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. Hay programas informáticos 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. 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 para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

65 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 quiméricos 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 inducción 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); Bruggermann *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)).

(iv) *Fragmentos de anticuerpos*

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 fagos-anticuerpos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otra aproximación, los fragmentos F(ab')₂ 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.

(v) *Anticuerpos biespecíficos*

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tiene 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 ErbB3. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a ErbB3 con sitio o sitios de unión para EGFR, ErbB2 y/o ErbB4. Alternativamente, un brazo anti-ErbB3 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 (FCγR), tal como FCγRI (CD64), FCγRII (CD32) y FCγRIII (CD16) con el fin de centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa ErbB3. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan ErbB3. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a ErbB3 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide vinca, cadena A de ricina, metotrexato o isótopo radioactivo de hapteno). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

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 tiene diferentes especificidades (Milstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) 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 aproximación 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 flexibles 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 cuando la proporción desigual de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporciona 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.

Los anticuerpos biespecíficos pueden estar 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 aproximación 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 aproximación, 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_H3 de 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.

5 Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos reticulados o “heteroconjugados”. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado 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
10 de heteroconjugado se pueden fabricar utilizando cuando 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
15 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')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de
20 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 específico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado el descubrimiento directo de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar
25 químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento de Fab' se secretó de manera separada de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado 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
30 humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

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
35 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 flexible para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros del 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
40 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).

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

50 (vi) *Cribado (“screening”) de anticuerpos con las propiedades deseadas*

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

55 Para seleccionar anticuerpos que reducen la formación inducida por HRG del complejo de proteínas ErbB2-ErbB3, las células que expresan ambos receptores (por ejemplo, células Caov3) se pueden preincubar con tampón (control) o anticuerpo, a continuación se tratan con HRG o el tampón control. A continuación, las células se lisan y los lisados crudos se pueden centrifugar para eliminar el material insoluble. Los sobrenadantes se pueden incubar con un anticuerpo específico para ErbB2 acoplado covalentemente a una fase sólida. Tras el lavado, los inmunoprecipitados se pueden
60 separar mediante SDS-PAGE. A continuación las transferencias Western de los geles se sondan con anticuerpo anti-ErbB3. Tras la visualización, los puntos de transferencia se pueden poner en tiras y resondar con un anticuerpo anti-ErbB2. La densitometría de rastreo de reflectancia del gel se puede realizar con el fin de cuantificar el efecto del anticuerpo en cuestión en la formación inducida por HRG del complejo. Se pueden seleccionar anticuerpos que reducen la formación del complejo ErbB2-ErbB3 con relación al control (células no tratadas). Véase el Ejemplo posterior.

65 Para seleccionar los anticuerpos que reducen la activación de ErbB2 inducida por HRG en una célula que expresa los receptores ErbB2 y ErbB3, las células se pueden preincubar con tampón (control) o anticuerpo, a continuación se tratan con HRG o el tampón control. A continuación, las células se lisan y los lisados crudos se pueden centrifugar para

eliminar el material insoluble. La activación de ErbB2 se puede determinar mediante transferencia Western seguido por el sondeo con un anticuerpo anti-fosfotirosina tal y como se describe en el Ejemplo posterior. La activación de ErbB2 se puede cuantificar mediante densitometría de rastreo de reflectancia del gel, por ejemplo. Alternativamente, el ensayo de la activación del receptor de quinasa en WO 95/14930 y Sadick *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 235: 207-214 (1996) se puede utilizar para determinar la activación de ErbB2.

El efecto del anticuerpo en la unión de HRG a ErbB3 se puede determinar mediante la incubación de células que expresan este receptor (por ejemplo, células 4E9H3 transfectadas para expresar ErbB3) con HRG radiomarcada (por ejemplo, el dominio de tipo EGF de la misma), en ausencia (control) o presencia del anticuerpo anti-ErbB3, tal y como se describe en el Ejemplo posterior, por ejemplo. Los anticuerpos que aumentan la afinidad de unión de la HRG por el receptor ErbB3 se pueden seleccionar para un desarrollo posterior. Cuando el anticuerpo de elección es el que bloquea la unión de HRG a ErbB3, se pueden identificar los anticuerpos que así lo hacen en el ensayo.

Para cribar los anticuerpos que se unen al epítipo en ErbB3 unidos mediante un anticuerpo de interés (por ejemplo, los que bloquean la unión del anticuerpo 3-8BS a ErbB3), se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como el descrito en *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Ed Harlow y David Lane (1998).

(vii) Diseño de la función efectora

Se puede desear 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 cadenas. El anticuerpo homodimérico así generado puede mejorar la capacidad de internalización y/o aumentar la eliminación de células mediada 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 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) Inmunoconjugados

Se prevén inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo de la presente invención conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Los agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de dichos inmunoconjugados se ha descrito anteriormente. 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 modeccin, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, 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. Hay un conjunto de radionucleidos disponibles para la producción de anticuerpos anti-ErbB3 radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleidos al anticuerpo. Véase WO94/11026.

El anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el premarcado 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 clarificador y, a continuación, la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleido).

(ix) Inmunoliposomas

Los anticuerpos anti-ErbB3 descritos en la presente invención también se pueden formular como inmunoliposomas. 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*,

ES 2 274 537 T3

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.

5 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 extraen 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 (tal como Doxorubicina). Véase Gabizon
10 *et al.*, *J. National Cancer Inst.*, 81(19): 1484 (1989).

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

15 El anticuerpo de la presente invención también se puede utilizar en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo a un enzima activador de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, 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.

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

Entre los enzimas que son útiles en el procedimiento 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 anticancerígeno, 5-fluoroacilo; proteasas, tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y cathepsinas (tales como cathepsinas 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 que dividen los carbohidratos, tales como β -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convertir profármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilin amidasa, 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 puede utilizar para convertir los profármacos 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
35 para la liberación del abisma a una población de células tumorales.

Las enzimas se pueden unir covalentemente a los anticuerpos anti-ErbB3 mediante técnicas bien conocidas en la técnica, 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 epítipo de unión de receptor salvaje-anticuerpo*

45 En ciertas realizaciones de la presente invención, puede ser deseable utilizar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intacto, para aumentar la penetración en el tumor, por ejemplo. 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 una un epítipo de unión de receptor salvaje al anticuerpo, fragmento (por ejemplo, mediante la mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o mediante la incorporación del epítipo 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).

55 Un procedimiento sistemático para preparar dicha variante de anticuerpo que tiene una vida media *in vivo* comprende varias etapas. La primera implica la identificación de la secuencia y la conformación de un epítipo de unión de receptor salvaje de una región Fc de una molécula de IgG. Una vez se identifica este epítipo, la secuencia del anticuerpo de interés se modifica para incluir la secuencia y la conformación del epítipo de unión identificado. Después de mutar la secuencia, se estudia la variante del anticuerpo para ver si tiene una mayor vida media *in vivo* 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 epítipo 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.

65 El epítipo de unión de receptor salvaje incorporado de esta manera al anticuerpo de interés es cualquiera de los epítipos 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.

El epítipo generalmente constituye una región en la que cualquier residuo o 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 más bucles del dominio Fc. Aún más preferiblemente, el epítipo se extrae del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo, de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3 o V_H, o más de una de dichas regiones del anticuerpo. Alternativamente, el epítipo se extrae del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región C_L o la región V_L, o ambas, del fragmento de anticuerpo.

El epítipo de unión de receptor salvaje comprende preferiblemente la secuencia (5' a 3'): PKNSSMISNTP (SEC ID No: 1), y opcionalmente comprende además una secuencia seleccionada del grupo que consiste en HQSLGTQ (SEC ID No: 2), HQNLSGDGK (SEC ID No: 3), HQNISDGK (SEC ID No: 4) o VISSHLGQ (SEC ID No: 5), particularmente cuando el fragmento de anticuerpo es Fab o F(ab')₂ o el epítipo de unión de receptor salvaje es un polipéptido que contiene la secuencia(s) (5' a 3'): HQNLSGDGK (SEC ID No: 3), HQNISDGK (SEC ID No: 4) o VISSHLGQ (SEC ID No: 5), y la secuencia PKNSSMISNTP (SEC ID No: 1).

15 B. Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

Se prevén el ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo tal y como se describe en la presente invención, vectores y células huésped que comprende el ácido nucleico; y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo.

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para la clonación posterior (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencian utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Muchos vectores son útiles. Entre los componentes del vector se incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de transcripción.

(i) Componente secuencia señal

El anticuerpo anti-ErbB3 de la presente invención se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específica en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduros. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es la que es reconocida y procesada (es decir, dividida por una señal peptidasa) por la célula huésped. Para células huésped procariontas que no reconocen y procesan la secuencia señal de anticuerpo anti-ErbB3 nativo, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionta seleccionada, por ejemplo, del grupo de la alcalina fosfatasa, penicilinas, Ipp, o líderes de enterotoxina II estables térmicamente. Para la secreción en levaduras, se dispone de la secuencia señal nativa se puede sustituir por, por ejemplo, líder de la levadura invertasa, líder de factor α (incluyendo líderes de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o líder de fosfatasa ácida, líder de glucoamilasa de *C. albicans* o la señal descrita en WO 90/13646. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias señal de mamíferos, así como los líderes secretores víricos, por ejemplo, la señal gG de herpes simplex.

El ADN para dicha región de precursor está ligada en el marco de lectura a ADN que codifica el anticuerpo anti-ErbB3.

(ii) Componente origen de replicación

Los vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación, esta secuencia es la que permite que el vector a replicar independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias ARS. Dichas secuencias son bien conocidas para un conjunto de bacterias, levaduras y virus. El origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para las levaduras, y varios orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos. Generalmente, el origen del componente de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 se puede utilizar habitualmente sólo porque contiene el promotor temprano).

(iii) Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación puede contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) deficiencias autotróficas de complemento, o (c) nutrientes de suministro críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Las células que se transforman de forma satisfactoria con un gen heterólogo producen una proteína que confiere

ES 2 274 537 T3

resistencia al fármaco y sobreviven de esta manera al régimen de selección. Algunos ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico del anticuerpo anti-ErbB3, tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneina-I y -II, preferiblemente genes de metalotioneina de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identificaron por primera vez mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando la DHFR de tipo salvaje se utiliza es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en la actividad de DHFR.

Alternativamente, las células huésped (particularmente huéspedes de tipo salvaje que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican anticuerpo anti-ErbB3, proteína DHFR de tipo salvaje, y se pueden seleccionar otros marcadores seleccionables, tales como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH), mediante el crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase Patente de Estados Unidos No. 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su utilización en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levaduras YRp7 (Stinchcomb *et al. Nature*, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). La presencia de la lesión en *trp1* en el genoma de células huésped de levadura proporciona a continuación un medio eficaz para la detección de la transformación mediante el crecimiento en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levadura deficientes de *Leu-2* (ATCC 20.622 ó 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que llevan el gen *Leu2*.

Además, se pueden utilizar los vectores derivados del plásmido circular de 1,6 μ m pKD1 para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, se describió un sistema de expresión para una producción a gran escala de quimosina recombinante de ternera para *K. lactis*. Van der Berg, *Biol. Technology*, 8:135 (1990). También se han descrito vectores de expresión multicopia estables para la secreción de albúminas de suero humanos recombinante maduras mediante cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, *Biol. Technology*, 9:968-975 (1991).

(iv) Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está unido operativamente al ácido nucleico del anticuerpo anti-ErbB3. Entre los promotores adecuados para la utilización con huéspedes procariontes se incluyen el promotor *phoA*, sistemas de promotores β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*), y promotores híbridos, tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para la utilización en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el anticuerpo anti-ErbB3.

Las secuencias de promotor son conocidas para eucariotas. Prácticamente, todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases en dirección 5' desde el sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases en dirección 5' desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas es una secuencia AATAAA que pueden ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en vectores de expresión eucariotas.

Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para la utilización en huéspedes de levadura se incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa u otros enzimas glicolíticos, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones de promotor para la alcohol deshidrogenada 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativos asociados con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en EP 73.657. Los potenciadores de la levadura también se utilizan de forma ventajosa con promotores de levadura.

La transcripción de anticuerpo anti-ErbB3 de vectores en células huésped de mamíferos se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como el virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y más preferiblemente Virus del Simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos,

por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

5 Los promotores tempranos y tardíos del virus Sv40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción SV40 que también contiene el origen de replicación vírico SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. En la Patente de Estados Unidos No. 4.419.446 se describe un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamíferos que utiliza el virus de papiloma bovino como vector se describe. En la Patente de Estados Unidos No. 4.601.978 se describe una modificación de este sistema. Véase también Reyes *et al.*, *Nature*, 297: 598-601 (1982) en la expresión de ADNc de β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus de herpes simplex. Alternativamente, la repetición terminal larga del virus de sarcoma de rous se puede utilizar como promotor.

(v) *Componente elemento potenciador*

15 La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo anti-ErbB3 de la presente invención por eucariotas superiores se incrementa frecuentemente mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Actualmente, muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de células eucariotas. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en la cara tardía del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv. *Nature* 297:17-18 (1982) en elementos de potenciación para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede empalmar en el vector en la posición 5' ó 3' a la secuencia codificante del anticuerpo anti-ErbB3, pero se localiza preferiblemente en un sitio 5' del promotor.

25 (vi) *Componente de la terminación de la transcripción*

Los vectores de expresión utilizados en las células huésped eucariotas (levadura, hongo, insecto, planta, animal, humano o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán la secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente desde 30 5' y alguna vez desde 3', regiones no traducidas de ADNs o ADNcs eucariotas o víricas. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo anti-ErbB3. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino. Véase WO 94/11026 y el vector de expresión descrito en la misma.

35 (vii) *Selección y transformación de células huésped*

Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención se incluyen células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores descritas anteriormente. Entre las procariotas adecuadas para este objetivo se incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceae, tal como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. coli* Ka12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son adecuados. Estos ejemplo son ilustrativos en lugar de limitantes.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos o levaduras filamentosos, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpo anti-ErbB3. El *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura habitual del panadero, es el más habitualmente utilizado entre los microorganismos de huéspedes eucariotas inferiores. Sin embargo, un grupo de otros géneros, especies y cepas están disponibles habitualmente y son útiles en la presente invención, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces*, tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesta* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanmomomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y huéspedes de *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. Níger*.

Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo anti-ErbB3 glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células vegetales y de insectos. Se han modificado numerosas cepas baculovíricas y variantes y las correspondientes células huéspedes de insecto permisivas de huéspedes, tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una serie de cepas víricas para la transfección están públicamente disponibles, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden utilizar como el virus del presente documento según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes.

Sin embargo, el mayor interés ha estado en las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en un cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Entre los ejemplos de líneas de celulares de huéspedes mamíferos están la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé BHK, aTCC CCL 10; células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO. Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción del anticuerpo anti-ErbB3 y se cultivan en un medio con nutrientes habituales según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, i amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivo de células huésped

Las células huésped utilizadas para producir el anticuerpo anti-ErbB3 de la presente invención se puede cultivar en una serie de medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Mínimo Esencial (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma) son adecuados para el cultivo de células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), Patente de Estados Unidos Nos. 4.767.404; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655 ó 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195 o la Patente de Estados Unidos Re. 30.985 se pueden utilizar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede suplementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), soluciones tampón (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCINTM), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente en concentraciones finales a nivel micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario se puede también incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán obvias para un técnico habitual.

(xi) Purificación de anticuerpo anti-ErbB3

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o directamente secretado en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, la debris particulada, células huésped o fragmentos lisados, se elimina, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Biol Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, se descongela la pasta celular en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. La debris celular se puede eliminar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran generalmente en primer lugar utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de filtración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición de anticuerpos preparados a partir de células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo ésta última la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isótopo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que están basados en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (Lindmark *et al.*, *J. Immunol Meth* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isótopos de ratón y para $\gamma 3$ humanas (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es frecuentemente agarosa, pero se disponen de otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como el vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinil)benceno permite mayores velocidades de flujo y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden conseguir con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABXTM (J.T. Baker Philipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas son el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol. La HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-SefarosaTM, cromatografía en una resina de intercambio de anión o catión (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SDS-PAGE y precipitación con sulfato amónico también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

Tras cualquier etapa o etapas de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se pueden someter a una cromatografía de interacción hidrofóbica a pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferiblemente a concentraciones de sales bajas (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M)

5

C. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo se prepararan para su almacenamiento mediante la mezcla del anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª 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 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 benzetonio; 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); 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; contraponos formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TweenTM, PluronicTM o polietilenglicol (PEG).

La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación concreta a tratar, preferiblemente aquellas 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, ErbB4 o el factor endotelial vascular (VEGF) en la formulación. Alternativamente, o además, la composición puede comprender un agente quimioterapéutico o una citoquina. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada combinadas en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

30

Los principios activos también pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), 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* 16ª Edición, Osol, A. Ed. (1980).

35

Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación controladas. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos 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-hidroxietilmetacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente U.S.A. No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico, tales como el Lupron DepotTM (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 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos 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-disulfuros, se puede conseguir la estabilización mediante la modificación de residuos sulfhidrilos, la liofilización de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, la utilización de aditivos adecuados y el desarrollo de composiciones de matriz de polímeros específicas.

55

D. Usos no terapéuticos del anticuerpo

Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar como agentes de purificación de afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida, tal como una resina Sefadex o papel de filtro, utilizando los procedimientos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene la proteína ErbB3 (o fragmento de la misma) a purificar, y a continuación, el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra a excepción de la proteína ErbB3, que está unida al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina, pH 5,0, que liberará la proteína ErbB3 del anticuerpo.

65

ES 2 274 537 T3

Los anticuerpos anti-ErbB3 también pueden ser útiles en los ensayos de diagnóstico para la proteína ErbB3, por ejemplo, la detección de su expresión en células, tejidos o suero específicos. De este modo, los anticuerpos se pueden utilizar en el diagnóstico de tumores humanos (véase, por ejemplo, la Patente U.S.A. 5.183.884).

5 Para las aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo se marcará habitualmente con un grupo detectable. Existen numerosos marcadores disponibles que se pueden agrupar generalmente en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos, tales como ³⁵S, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, y ¹³¹I. El anticuerpo se puede marcar con el radioisótopo utilizando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, volúmenes 1 y 2. Coligen *et al.*, Ed., Wiley-Interscience. Nueva York, Nueva York, Pubs., (1991), por ejemplo, y la radiactividad se puede medir utilizando recuento por centelleo.

(b) Están disponibles marcadores fluorescentes, tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lissamina, ficoeritrina y Texas Red. Los marcadores fluorescentes se pueden conjugar al anticuerpo utilizando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, *supra.*, por ejemplo. La fluorescencia se puede cuantificar utilizando un fluorímetro.

(c) Varios marcadores de enzima-sustrato están disponibles y la Patente de U.S.A. No. 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de éstos. La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir utilizando varias técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o la quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se describen anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se vuelve electrónicamente excitado mediante una reacción química y puede entonces emitir luz que se puede medir (utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Entre los ejemplos de marcadores enzimáticos se incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente U.S.A. No. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, malato deshidrogenada, ureasa, peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacaridasa (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasa heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan *et al.*, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzymology* (ed J. Langone y H. Van Vunakis), Academic press, Nueva York, 72: 147-166 (1981).

Entre los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato se incluyen, por ejemplo:

(i) peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, donde la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenileno diamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico; y

(iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metillumbeliferil- β -D-galactosidasa.

Para los expertos en la materia, están disponibles numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato. Para una revisión general de las mismas, véase la Patente de U.S.A. Nos. 4.275.149 y 4.318.980.

Algunas veces, el marcador está directamente conjugado con el anticuerpo. El técnico experto conoce las técnicas para conseguir esto. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcadores mencionados anteriormente se pueden conjugar con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y, de este modo, el marcador se puede conjugar con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para conseguir la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). De este modo, se puede conseguir la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo.

El anticuerpo anti-ErbB3 no necesita estar marcado, y la presencia del mismo se puede detectar utilizando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo de ErbB3.

Los anticuerpos de la presente invención se puede utilizar en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directo e indirecto, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies A Manual of Techniques*, páginas 147-158 (CRC Press. Inc., 1987).

Los ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito de la muestra de prueba para la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína ErbB3 en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos generalmente están insolubilizados antes o después

de la competición, de manera que el patrón y el analito que están unidos a los anticuerpos se pueden separar de manera adecuada del patrón y el analito que permanecen no unidos.

Los ensayos de sándwich implican la utilización de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una parte inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína a detectar. En un ensayo de sándwich, el analito de la muestra de prueba se une a un primer anticuerpo que está inmovilizado en un soporte sólido y, a continuación, un segundo anticuerpo se une al analito, formando así un complejo de tres partes insolubles. Véase, por ejemplo, la Patente U.S.A. No. 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar marcado en sí mismo con un grupo detectable (ensayos de sándwich directos) o se puede medir utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un grupo detectable (ensayo de sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el grupo detectable es una enzima.

Para la inmunohistoquímica, la muestra de tumor puede ser reciente o congelada o puede estar envuelta de parafina y fijada con un conservante, tal como formalina, por ejemplo.

Los anticuerpos también se pueden utilizar para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, el anticuerpo se marca con un radionucleido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S), de manera que el tumor se puede localizar utilizando inmunocentelleografía.

E. Kits de diagnóstico

A modo de comodidad, el anticuerpo de la presente invención se puede disponer en un kit, es decir, una combinación empaquetada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para llevar a cabo el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está marcado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores necesarios por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos se pueden variar de forma amplia para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos se pueden proporcionar como polvos secos, habitualmente liofilizados, que incluyen excipientes que en disolución proporcionarán una solución de reactivos que tienen la concentración apropiada.

F. Usos terapéuticos del anticuerpo

Se considera que el anticuerpo anti-ErbB3 de la presente invención se puede utilizar para tratar condiciones en las que tiene lugar la activación excesiva del complejo ErbB2-ErbB3, particularmente cuando dicha activación está mediada por un polipéptido heregulina. Entre los ejemplos de condiciones o trastornos a tratar con el anticuerpo de ErbB3 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 linfoides; otros trastornos, tales como neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrófágicos, epiteliales, estromales y blastocóclicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

Los anticuerpos de la presente invención se administran a un mamífero, preferiblemente un 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 rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinoval, intratecal, oral, tópica o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa del anticuerpo.

Otras pautas terapéuticas se pueden combinar con la administración de los anticuerpos anti-ErbB3 de la presente invención. Por ejemplo, el paciente a tratar con los anticuerpos descritos en la presente invención también puede recibir terapia por radiación. Alternativamente, o adicionalmente, se puede administrar un agente quimioterapéutico al paciente. La preparación y la pauta 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 la pauta de dosificación para dicha quimioterapia también están descritas en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración del anticuerpo o se puede administrar simultáneamente con el mismo.

Puede ser deseable administrar también anticuerpos contra otros antígenos asociados a tumores, tales como anticuerpos que se unen a EGFR, ErbB2, ErbB4 o el factor endotelial vascular (VEGF). Se pueden coadministrar dos o más anticuerpos anti-ErbB3 al paciente. Alternativamente, o adicionalmente, se pueden administrar dos o más citoquinas al paciente.

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 el transcurso 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 la discreción del médico responsable. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

ES 2 274 537 T3

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (por ejemplo, 0,1-20 mg/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 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionadas anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que 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.

G. Artículos de fabricación

Se describe un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y un marcador. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de prueba. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. Los recipientes contienen 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 se solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el anticuerpo anti-ErbB3. El marcador en, o asociado con, el recipiente indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la enfermedad de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Pueden incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y inserciones de empaquetamiento con instrucciones para su uso.

H. Depósito de materiales

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 hibridoma/anticuerpo	ATCC No.	Fecha de depósito
8B8	HB-12070	22 marzo, 1996

Este depósito se realizó bajo las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y las Regulaciones de las mismas (Tratado de Budapest).

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

Ejemplo

Producción de anticuerpos anti-ErbB3

Este ejemplo describe la producción de los anticuerpos anti-ErbB3 que tienen las características descritas en la presente invención.

Materiales y procedimientos

Líneas celulares. La línea de células de leucemia mieloide humana K562 (que carece de receptores de proteínas tirosina quinasas de la subfamilia de la clase 1 según se determina mediante transferencia Northern) y la línea de células de carcinoma de ovario humana Caov3 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD). Ambas se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y HEPES 10 mM ("medio de crecimiento").

Transfección estable de células K562. La línea de células K562 se transfectó y se seleccionaron clones de expresión de ErbB3. Brevemente, el ADNc de erbB3 se subclonó en el vector de expresión de células de mamíferos pcDNA-3 (Invitrogen) y se intrujeron en células K562 mediante electroporación (1180 mF, 350 V). Las células transfectadas se cultivaron en un medio de crecimiento que contenía G418 0,8 mg/ml . Los clones resistentes se obtuvieron limitando la dilución y se estudiaron para la expresión de ErbB3 mediante transferencia Western y ensayos de unión a heregulina (HRG). El clon de expresión de ErbB3 4E9H3 se utilizó en los experimentos descritos en esta memoria. Se observó que la estimulación con forbol éster aumentaba significativamente la expresión de ErbB3 en los transfectantes de K562. Por lo tanto, las células 4E9H3 se colocaron en un medio de crecimiento que contenía 10 ng/ml de forbol-12-miristato acetato (PMA) durante toda la noche antes de su utilización en los diversos ensayos descritos a continuación.

Anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales específicos para la proteína ErbB3 se generaron contra un fragmento recombinante del receptor correspondiente al dominio extracelular (ECD) del mismo fusionado en su extremo amino terminal del epítipo de la glicoproteína D (gD) del virus del herpes simplex de tipo 1 (HSV1) para el anticuerpo monoclonal 5B6. La secuencia codificante de la secuencia señal de ErbB3 se sustituyó por una secuencia que codificaba los aminoácidos 1-53 del polipéptido gD. Los aminoácidos 1-25 codifican la secuencia señal de gD mientras que los

aminoácidos 26-53 contienen un epítipo para el anticuerpo monoclonal 5B6. Véase WO 95/14776. La construcción resultante, gD.ErbB3.ECD, se purificó utilizando una columna de afinidad del anticuerpo anti-gD. Las inmunizaciones se realizaron tal y como indica a continuación. Los ratones hembra Balb/c (Charles River) se inyectaron inicialmente en la planta de la pata con 5 μ g de gD.ErbB3.ECD en 100 μ l de adyuvante de RIBI™ (Ribi ImmunochemResearch, Inc., Hamilton, MT). Los animales se estimularon dos veces con 5 μ g de gD.ErbB3.ECD en su planta de la pata cada dos semanas seguido de una inyección final en la planta de la pata de 5 μ g de gD.ErbB3.ECD. Tres días después de la última inmunización, los nódulos de la linfa popliteales se eliminaron y se preparó una única suspensión de células para la fusión con PEG.

Los anticuerpos monoclonales se purificaron y se ensayaron mediante un ELISA inmovilizado y de fase en solución para la reactividad cruzada con ErbB2 y ErbB4. Para el ELISA inmovilizado, se utilizó 1 μ g/ml de ErbB2.ECD, gD.ErbB3.ECD o gD.ErbB4.ECD para recubrir una placa de microtítulos de 96 pocillos durante toda la noche. Se añadió Mab anti-ErbB3 a 1 μ g/ml y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (RT), se lavó y se siguió de IgG de cabra anti-ratón (gam) conjugado a HRPO. El ELISA se desarrolló y se leyó a 490 nm. Para el ELISA de fase en solución, se utilizó 1 μ g/ml de IgG gam (específico de Fc) para recubrir una placa de microtítulos de 96 pocillos durante toda la noche. Se añadió Mab anti-ErbB3 a 1 μ g/ml y se incubó durante 1 hora a RT, se lavó y se siguió de estreptavidina de HRPO. El ELISA se desarrolló y se leyó a 490 nm. En este ensayo, ninguno de los anticuerpos anti-ErbB3 reaccionó de forma cruzada con ErbB2 o ErbB4.

Los fragmentos Fab del anticuerpo 3-8D6 se generaron mediante digestión con papaína. Los fragmentos IgG y Fc no digeridos se eliminaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A seguido de una cromatografía de filtración en gel. No se detectó IgG en el grupo Fab mediante SDS-PAGE y mediante transferencia Western se sondó con un anticuerpo específico de Fc.

Ensayos de unión a HRG. Todos los experimentos de unión a HRG se realizaron utilizando el dominio de tipo EGF de la isoforma β 1, es decir, HRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ (Sliwkowski *et al.*, *J Biol Chem.* 269: 14661-5 (1994)). El grupo de anticuerpos de ErbB3 se rastreó por un efecto en la unión a HRG mediante la incubación de $5,0 \times 10^4$ células 4E9H3 con ¹²⁵I-HRG 100 pM durante toda la noche a 0°C, en ausencia (control) o presencia de anticuerpo anti-ErbB3 100 nM. Las IgGs irrelevantes se utilizaron como controles negativos. Las células se recogieron y se lavaron rápidamente con tampón de ensayo enfriado con hielo (medio RPMI que contiene HEPER 10 mM, pH = 7,2) en un dispositivo de filtración de 96 pocillos (Millipore). A continuación, los filtros se extrajeron y se contaron.

Para los experimentos dosis-respuesta de los anticuerpos, se incubaron células 4E9H3 con ¹²⁵I-HRG 100 pM en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpo. Las mediciones de afinidad de HRG se determinaron en ausencia (control) o presencia de anticuerpo o fragmento Fab 100 nM. Estos experimentos se realizaron en un formato de inhibición competitiva con cantidades crecientes de HRG no marcada y una concentración fija (35 pM) de ¹²⁵I-HRG. Para el experimento de control (sin anticuerpo) se utilizaron 1×10^5 células 4E9H3 para cada muestra. Debido a las limitaciones en el intervalo dinámico del ensayo, el número de células 4E9H3 utilizadas para la unión en presencia del anticuerpo o del Fab se redujo a $2,5 \times 10^4$ células por muestra.

Reducción de anticuerpos de fosforilación estimulada por HRG. Se preincubaron células Caov3, que expresan de forma natural ErbB2 y ErbB3, con 250 nM de anticuerpo anti-ErbB3 3-8D6, fragmentos Fab de este anticuerpo, o tampón (control), durante 60 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo anti-ErbB2, 2C4 (Fendly *et al.*, *Cancer Res.*, 50:1550-1558 (1990)), que se observó previamente que bloqueaba la fosforilación estimulada por HRG de ErbB2, se incluyó como control positivo. A continuación, las células se estimularon con HRG a una concentración final de 10 nM durante 8 minutos a temperatura ambiente, o se dejaron sin estimulación. La reacción se detuvo mediante la eliminación de los sobrenadantes y disolviendo las células en tampón muestra de SDS. A continuación, los lisados se desarrollaron en SDS-PAGE. Las transferencias Western de los geles se sondaron con anti-fosfotirosina conjugado con peroxidasa de rábano picante (Transduction Labs), y las manchas se visualizaron utilizando un sustrato quimioluminiscente (Amersham). Las manchas se escanearon con un densitómetro de escaneo por reflectancia tal y como se describe en Holmes *et al.*, *Science*, 256: 1205-1210 (1992).

Reducción de anticuerpos de la formación del complejo de proteínas ErbB2-ErbB3. Se preincubaron células Caov3 con tampón (control), 250 nM de anticuerpo anti-ErbB3 3-8D6, fragmentos Fab de este anticuerpo, o el anticuerpo anti-ErbB2 (2C4) durante 60 minutos a temperatura ambiente, a continuación se trataron con 10 nM de HRG o tampón control durante 10 minutos. Las células se lisaron en 25 mM de Tris, pH = 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM de EDTA, 1,0% de Triton X-100™, 1,0% de CHAPS, 10% v/v de glicerol, que contenía 0,2 mM de PMSF, 50 mTU/ml de aprotinina, y 10 mM de leupeptina (“tampón de lisis”) y los lisados de crudo se centrifugaron brevemente para eliminar el material insoluble. Los sobrenadantes se incubaron con 3E8, un anticuerpo monoclonal específico para ErbB2 (Fendly *et al.*, *Cancer Res.*, 50:1550-1558 (1990)), acoplado covalentemente a un soporte insoluble (Affi Prep-10™, Bio-Rad). La incubación se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C. Los inmunoprecipitados se lavaron dos veces con tampón de lisis enfriado con hielo, se resuspendieron con un anti-ErbB3 policlonal (Santa Cruz Biotech). Las manchas se escanearon con un densitómetro de escaneo por reflectancia tal y como se describe en Holmes *et al.*, *Science*, 256: 1205-1210 (1992). Tras la visualización con el sustrato quimioluminiscente ECL, las manchas se pusieron en tiras y se resondaron con un anti-ErbB2 policlonal (Santa Cruz Biotech). Una mancha duplicada sondada con anti-ErbB2 mostró que se inmunoprecipitaban cantidades iguales de ErbB2 de cada muestra.

Resultados

Un grupo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio extracelular de ErbB3 se evaluó por su capacidad de afectar la unión de HRG a ErbB3. El rastreo inicial se realizó mediante la incubación de cada uno de los anticuerpos purificados a una concentración final de 100 nM con células 4E9H3 en presencia de células ¹²⁵I-HRG 4E9H3, que son transfectantes ErbB3 de la línea de células de leucemia mieloide humana K562. La línea celular K562 no expresa receptores ErbB2 endógeno de HRG. Por lo tanto, la unión de heregulina a células 4E9H3 tiene lugar exclusivamente a través de ErbB3. Después de incubar las muestras durante toda la noche en hielo, los recuentos asociados a las células se midieron tal y como se muestra en la figura 1. Dos de los anticuerpos monoclonales anti-ErbB3 (2F9 y 3E9) redujeron la cantidad de ¹²⁵I-HRG unida a células con respecto al control (sin anticuerpo). Sin embargo, varios otros aumentaron significativamente la unión del ligando. Estos resultados sugerían que estos anticuerpos anti-ErbB3 eran capaces de aumentar la afinidad de la unión de HRG y/o aumentar la disponibilidad de los sitios de unión de HRG. Para caracterizar adicionalmente la influencia de estos anticuerpos en la unión de HRG a ErbB3, se realizaron experimentos de dosis-respuesta utilizando el anticuerpo 3-8D6 que aumentaba la unión de HRG. Las células 4E9H3 se incubaron con 100 pM de ¹²⁵I-HRG en presencia de concentraciones crecientes del anticuerpo 3-8D6. Los recuentos asociados a las células se midieron a continuación después de una incubación durante toda la noche en hielo. Los resultados se muestran en la figura 2 como representaciones de recuentos de células frente a concentraciones de anticuerpo. Existe una correlación entre la unión de HRG aumentada y la concentración de anticuerpo creciente. La unión a heregulina alcanzó la saturación entre 10 y 100 nM de IgG. El valor de EC₅₀ para el anticuerpo 3-8D6 fue de 722 pM. No se observó para ningún anticuerpo un descenso en las curvas de dosis-respuesta en concentraciones elevadas de anticuerpo.

El análisis Scatchard de la unión a HRG se determinó en presencia de estos anticuerpos y los resultados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Grupo de datos	K _d	Sitios/célula
Control	1,2 x 10 ⁻⁹	3,6 x 10 ⁵
Mab 3-8D6	2,1 x 10 ⁻¹⁰	2,4 x 10 ⁵
Fab 3-8D6	2,8 x 10 ⁻¹⁰	2,9 x 10 ⁵

En ausencia del anticuerpo, se midió una K_d de 1200 pM para la unión de HRG a ErbB3 que está de acuerdo con una medición de la afinidad medida previamente de la unión de HRG a ErbB3. El número de sitios de unión por célula se determinó que era 36.000. En presencia del anticuerpo, 3-8D6, la constante de unión medida para la unión de HRG aumenta significativamente hasta 210 pM. Sin embargo, el número de sitios de unión de HRG no aumenta en presencia de 3-8D6.

Para determinar si el aumento en la afinidad de unión del ligando ErbB3 era dependiente del anticuerpo por ser bivalente, se realizaron experimentos de unión de HRG en presencia de 100 nM de un fragmento Fab preparado por digestión con papaína del anticuerpo 3-8D6. Los fragmentos Fab utilizados para estos experimentos se purificaron mediante cromatografía de afinidad de Proteína A y mediante cromatografía de filtración en gel. No se detectó IgG intacta en esta preparación purificada por SDS-PAGE. Tal y como se muestra en la figura 3, la unión de HRG en presencia de anticuerpo intacto o la Fab resultante es casi idéntica. El análisis Scatchard de estos datos produjo una constante de disociación para la unión de HRG en presencia de Fab de 280 pM y el número de receptores por célula determinado a partir de este experimento también fue esencialmente el mismo que el de control. Estos datos concuerdan con los presentados en la figura 2, en la que las curvas de dosis-respuesta con los anticuerpos intactos mostraron una línea recta en lugar de una curva en forma de campana a concentración de anticuerpo más elevada, donde podría tener lugar la unión de anticuerpo univalente. Sin estar relacionado con ninguna teoría, estos datos sugieren que la alteración en la unión de HRG observada en presencia de estos anticuerpos no requiere un anticuerpo divalente.

A continuación se examinó el efecto del anticuerpo 3-8D6 en un ensayo de fosforilación de receptor tirosina, utilizando la línea de células de tumor de ovario Caov3 que coexpresa ErbB2 y ErbB3. Las células se estimularon con 10 nM de HRG tras una preincubación de 60 minutos con el anticuerpo 3-8D6 (a 250 nM) o tampón (control). Se analizaron todos los lisados de células en una transferencia Western sondados con anti-fosfotirosina. El tratamiento con HRG no estimuló la fosforilación en células 4E9H3. El tratamiento de células 4E9H3 con el anticuerpo 3-8D6 no indujo la fosforilación de ErbB3 por sí misma ni tuvo ningún efecto en la fosforilación de tirosina en células Caov3. Tras la estimulación se detectó una señal de fosforilación de tirosina marcada en una proteína con un tamaño molecular de aproximadamente 180 kDa. El tratamiento de células Caov3 con un anticuerpo 2C4 específico de ErbB2, era capaz de bloquear la señal de fosforilación de tirosina mediada por HRG. Cuando las células se trataron con el anticuerpo anti-ErbB3, 3-8D6, antes de la estimulación con HRG, la fosforilación de tirosina también disminuyó. Mediante la densitometría de escaneo de las manchas de anti-fosfotirosina de todos los lisados de células, se observó que el 3-8D6 inhibe la señal de fosfotirosina a 180-185 kDa en aproximadamente un 80% (intervalo de 76-84%). Esta señal está

proporcionada por los residuos de fosfato de tirosina en ErbB3 y ErbB2. El tratamiento de las células Caov3 con los fragmentos Fab preparados del anticuerpo 3-8D6, también redujo la fosforilación estimulada por HRG de la banda de 180 kDa con respecto al control. Sin embargo, la actividad inhibidora del Fab era ligeramente menos potente que el anticuerpo intacto.

5

El incremento mediado por el anticuerpo 3-8D6 en la afinidad del receptor en células que expresan ErbB3 solo es análogo al incremento en la afinidad asociada con la coexpresión de ErbB2 con ErbB3. Además, este anticuerpo bloquea la actividad quinasa de ErbB2 estimulada por HRG en células que expresan ambos receptores. Para determinar si el anticuerpo anti-ErbB3 compite directamente con ErbB2 para unirse a ErbB3, se realizaron una serie de experimentos de coimmunoprecipitación utilizando células Caov3. Las células se preincubaron con anticuerpo, o tampón (control) y, a continuación, se trataron con HRG 10 nM durante 10 minutos. Los lisados de las células se inmunoprecipitaron a continuación con un anticuerpo monoclonal contra ErbB2. A continuación, los inmunoprecipitados se analizaron mediante transferencia Western para la presencia de ErbB3. Los resultados de estos experimentos indicaron que ErbB3 estaba presente en el inmunoprecipitado de ErbB2 del lisado de células estimulado por HRG, pero no en el inmunoprecipitado de lisado no estimulado. Estos datos sugieren que la HRG dirige la formación de un complejo ErbB2-ErbB3 en células Caov3. El ErbB2 no era detectable en el inmunoprecipitado de la muestra tratada con el anticuerpo monoclonal anti-ErbB2, 2C4. Se observó un descenso significativo en la señal de ErbB3 cuando las células se preincubaron con el anticuerpo 3-8D6 o su Fab resultante antes de la estimulación por HRG. Estos datos indican que el anticuerpo 3-8D6 inhibe la formación de un complejo ErbB2-ErbB3 tras el tratamiento con HRG. La desitometría de escaneo de las transferencias Western anti-ErbB3 de inmunoprecipitados anti-ErbB2 reveló que la señal anti-ErbB3 (que indica el número de complejos ErbB2-ErbB3 presentes) también disminuye mediante 3-8D6 en aproximadamente un 80% (intervalo de 71-90%). Cuando se sondaron manchas duplicadas con anti-ErbB2, se encontraron presentes cantidades equivalentes de ErbB2 en todas las bandas.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que se une a la proteína ErbB3 y

5 (i) reduce la formación inducida por heregulina de un complejo de proteínas ErbB2-ErbB3 en una célula que expresa ErbB2 y ErbB3, y

(ii) reduce la activación de ErbB2 inducida por heregulina en una célula que expresa ErbB2 y ErbB3.

10 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, que también incrementa la afinidad de unión de la heregulina por la proteína ErbB3.

3. Anticuerpo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que es un anticuerpo monoclonal.

15 4. Anticuerpo según la reivindicación 3, que está humanizado.

5. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es humano.

20 6. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es un fragmento de anticuerpo.

7. Fragmento de anticuerpo según la reivindicación 6, que es un Fab.

25 8. Anticuerpo que se une al epítipo unido mediante el anticuerpo 8B8 obtenible de la línea de células del hibridoma ATCC no. HB-12070.

9. Anticuerpo según la reivindicación 8, que es obtenible de la línea de células del hibridoma ATCC no. HB-12070.

30 10. Anticuerpo que tiene las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo 8B8 obtenible de la línea de células del hibridoma ATCC no. HB-12070.

11. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que está marcado.

12. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que está inmovilizado en una fase sólida.

35 13. Composición que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un portador farmacéuticamente aceptable.

14. Línea celular que produce el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

40 15. Línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo 8B8 (ATCC no. HB-12070).

16. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la utilización en un procedimiento de tratamiento médico.

45 17. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una condición en la que tiene lugar una activación excesiva del complejo de proteínas ErbB2-ErbB3, tal como tumores benignos y malignos; leucemias y tumores de linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocóelicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

55

60

65

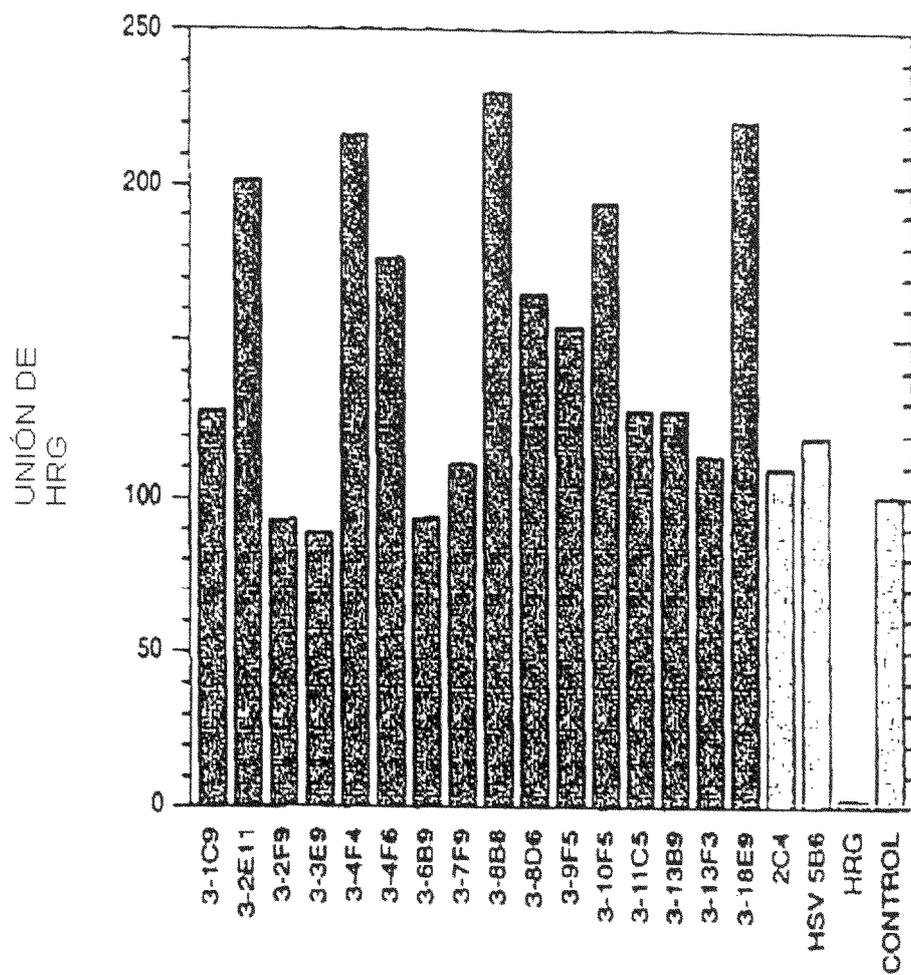


FIG. 1

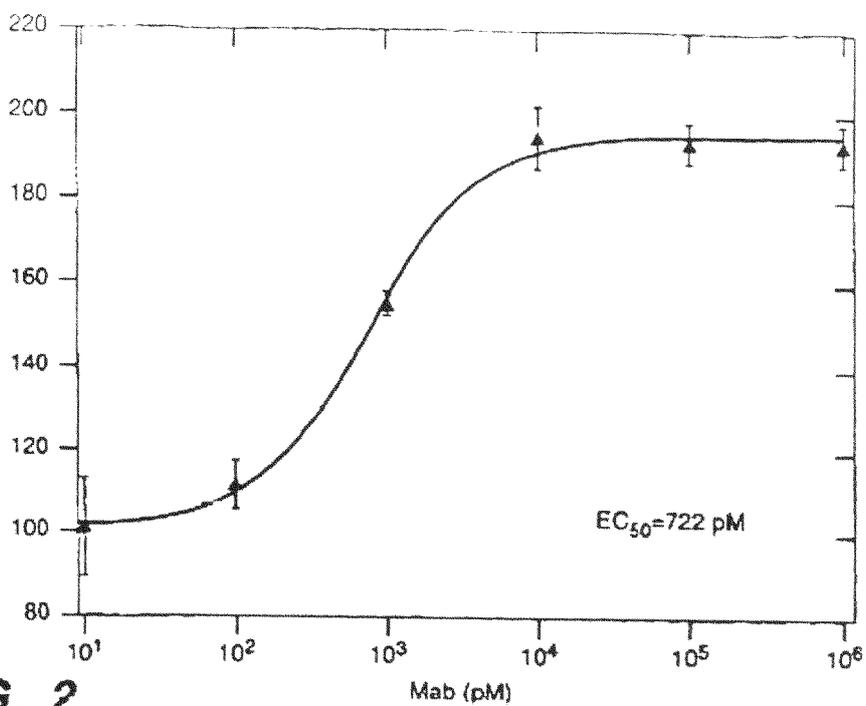


FIG. 2

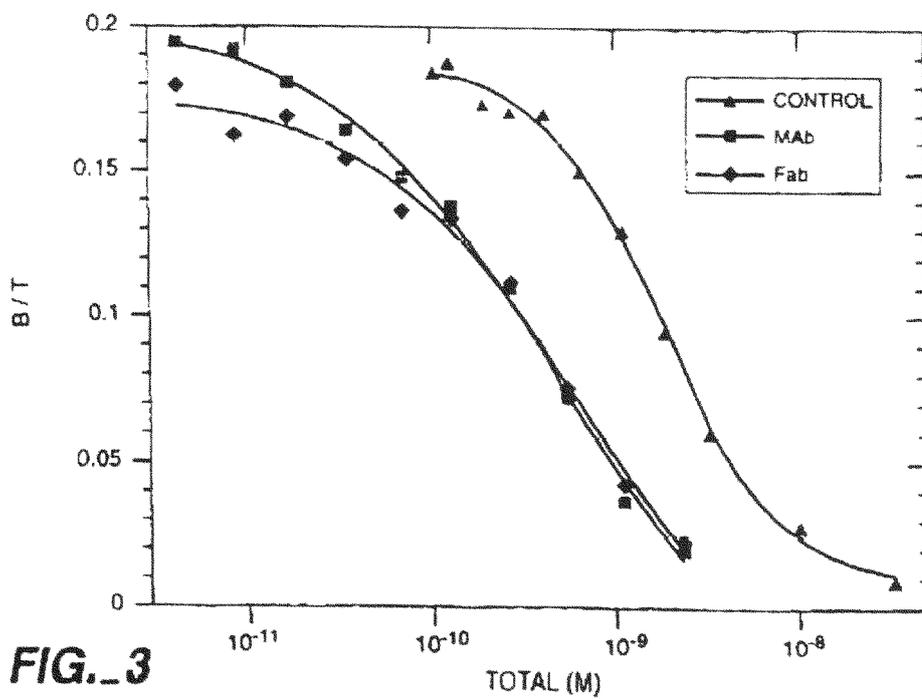


FIG. 3

ES 2 274 537 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Genentech, Inc.
(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Anticuerpos de ErbB3
(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 5
10 (iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:
(A) DESTINATARIO: Genentech, Inc.
(B) CALLE: 460 Point San Bruno Blvd
15 (C) CIUDAD: South San Francisco
(D) ESTADO: California
(E) PAÍS: Estados Unidos
(F) CP: 94080
20 (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
(A) TIPO DE MEDIO: disquete de 3,5 pulgadas, 1,44 Mb
(B) ORDENADOR: PC compatible de IBM
25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: WinPatin (Genentech)
(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
(B) FECHA DE SOLICITUD:
(C) CLASIFICACIÓN:
35 (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
(A) NOMBRE: Lee, Wendy M.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 40.378
40 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: P1003PCT
(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:
(A) TELÉFONO: 415/225-1994
45 (B) FAX: 415/952-9881
(C) TELEX: 910/371-7168

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 1:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 11 aminoácidos
(B) TIPO: Aminoácido
55 (C) TOPOLOGÍA: Lineal
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 1:

60 **Pro Lys Asn Ser Ser Met Ile Ser Asn Thr Pro**
1 5 10 11

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 2:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 7 aminoácidos

ES 2 274 537 T3

(B) TIPO: Aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 2:

His Gln Ser Leu Gly Thr Gln
1 5 7

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: Aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 3:

His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys
1 5 8

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: Aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 4:

His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys
1 5 8

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC. ID No: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: Aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID No: 5:

Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln
1 5 8