

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 165**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03755724 .6**  
96 Fecha de presentación: **11.07.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1585966**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.10.2005**

54 Título: **TRATAMIENTO DEL CÁNCER CON EL ANTICUERPO DIRIGIDO CONTRA ERBB2 RHUMAB 2C4.**

30 Prioridad:  
**15.07.2002 US 396290 P**  
**20.06.2003 US 480043 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.03.2012**

73 Titular/es:  
**F. Hoffmann-La Roche AG**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:  
**KOLL, Hans;**  
**BOSENMAIER, Birgit;**  
**MÜLLER, Hans-Joachim;**  
**SLIWKOWSKI, Mark, X. y**  
**KELSEY, Stephen, Michael**

74 Agente/Representante:  
**Ponti Sales, Adelaida**

**ES 2 376 165 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento del cáncer con el anticuerpo dirigido contra ErbB2 rhumab 2C4

5 **Campo de la invención**

**[0001]** La presente invención se refiere al anticuerpo dirigido contra HER2 humanizado recombinante 2C4 (rhuMab 2C4) para usar en un procedimiento para tratar pacientes que padecen tumores.

10 **Antecedentes de la invención**

**[0002]** La familia de receptores tirosina quinasas ErbB son mediadores importantes del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. La familia de receptores incluye cuatro miembros diferentes que incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o ErbB1), HER2 (ErbB2 o p185<sub>neu</sub>), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2).

**[0003]** El EGFR, codificado por el gen erbB1, se ha implicado causalmente en los tumores malignos humanos. En particular, se ha observado una expresión mayor en el cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y estómago, así como en glioblastomas. La mayor expresión del receptor EGFR se asocia a menudo con una mayor producción del ligando del EGFR, el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), por las mismas células tumorales dando como resultado la activación del receptor por una ruta estimuladora autocrina. Baselga y Mendelsohn, *Pharmac. Ther.*, 64:127-154 (1994). Además, se ha descrito una proteína relacionada con el factor de crecimiento epidérmico (ERRP), con un clon de fragmento de ADNc de 1583 pares de bases con 90-95% de homología de secuencia con el EGFR de ratón y un EGFR de rata truncado (patente de EE.UU. n° 6.399.743; y publicación de EE.UU. n° 2003/0096373). Se han evaluado anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFR o sus ligandos, TGF- $\alpha$  y EGF, como agentes terapéuticos en el tratamiento de dichos tumores malignos. Véase, p. ej. Baselga y Mendelsohn., véase antes; Masui y col., *Cancer Research*, 44:1002-1007 (1984); y Wu y col., *J. Clin. Invest.*, 95:1897-1905 (1995).

**[0004]** El segundo miembro de la familia de ErbB, p185<sub>neu</sub>, se identificó originalmente como el producto del gen transformante de neuroblastomas de ratas tratadas químicamente. La forma activada del protooncogén neu resulta de una mutación puntual (de valina a ácido glutámico) en la región de transmembrana de la proteína codificada. La amplificación del homólogo humano de neu (HBR2) se observa en cánceres de mama y ovario y se correlaciona con un pronóstico pobre (Slamon y col., *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon y col., *Science*, 244:707-712 (1989); y patente de EE.UU. n° 4.968.603). Hasta la fecha, no se ha descrito una mutación puntual análoga a esta en el protooncogén neu para tumores humanos. El exceso de expresión de ErbB2 (con frecuencia pero no de modo uniforme debido a la amplificación génica) también se ha observado en otros carcinomas incluyendo carcinomas de estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. Véase, entre otros King y col., *Science*, 229:974 (1985); Yokota y col., *Lancet*, 1:765-767 (1986); Fukushigi y col., *Mol Cell Biol.*, 6: 955-958 (1986); Geurin y col., *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen y col., *Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura y col., *Cancer Res.*, 51:1034 (1991); Borst y col., *Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990); Weiner y col., *Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern y col., *Cancer Res.*, 50:5184 (1990); Park y col., *Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau y col., *Mol. Carcinog.*, 3:354-357 (1990); Aasland y col., *Br. J. Cancer*, 57:358-363 (1988); Williams y col., *Pathobiology*, 59:46-52 (1991); y McCann y col., *Cancer*, 65:88-92 (1990). ErbB2 puede ser expresado en exceso en el cáncer de próstata (Gu y col., *Cancer Lett.*, 99: 185-9 (1996); Ross y col., *Hum. Pathol.*, 28:827-33 (1997); Ross y col., *Cancer*, 79:2162-70 (1997); y Sadasivan y col., *J. Urol.*, 150:126-31 (1993)). El exceso de expresión de ErbB2 puede conducir al crecimiento tumoral por la activación independiente de ligando de ErbB2 o de homodímeros de ErbB2.

**[0005]** Se han descrito anticuerpos dirigidos contra los productos proteínicos ErbB2 humano y p185<sub>neu</sub> de rata. Drebin y colaboradores han producido anticuerpos dirigidos contra el producto del gen neu de rata, p185<sub>neu</sub>. Véase, por ejemplo, Drebin y col., *Cell*, 41:695-706 (1985); Myers y col., *Meth. Enzym.*, 198:277-290 (1991); y documento WO 94/22478. Drebin y col., *Oncogene*, 2: 273-277 (1988) describen que las mezclas de anticuerpos reactivas con dos regiones distintas de p185<sub>neu</sub> dan como resultado efectos antitumorales sinérgicos en células NIH-3T3 transformadas con neu implantadas en ratones sin pelo. Véase también la patente de EE.UU. 5.824.311 concedida el 20 de octubre, 1998.

**[0006]** Hudziak y col., *Mol. Cell. Biol.*, 9(3):1165-1172 (1989), describen la generación de un panel de anticuerpos dirigidos contra ErbB2 que se caracterizaron usando la línea de células tumorales de cáncer de mama humano SK-BR-3. La proliferación celular relativa de las células SK-BR-3 después de exposición a los anticuerpos, se determinó por tinción con cristal violeta de las monocapas después de 72 horas. Usando este ensayo, se obtuvo una inhibición máxima con el anticuerpo llamado 4D5 que inhibía la proliferación celular en 56%. Otros anticuerpos del panel reducían la proliferación celular en menor extensión en este ensayo. Se encontró además que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba las líneas celulares de tumor de mama que expresaban en exceso ErbB2 frente a los efectos citotóxicos del TNF- $\alpha$ . Véase también la patente de EE.UU. n° 5.677.171 concedida el 14 de octubre, 1997.

Los anticuerpos dirigidos contra ErbB2 discutidos por Hudziak y col. fueron más caracterizados por Fendly y col., *Cancer Research*, 50:1550-1558 (1990); Kotts y col., *In Vitro*, 26(3):59A (1990); Sarup y col., *Growth Regulation*, 1:72-82 (1991); Shepard y col., *J. Clin. Immunol.*, 11(3):117-127 (1991); Kumar y col., *Mol. Cell. Biol.*, 11(2):979-986 (1991); Lewis y col., *Cancer Immunol. Immunother.*, 37:255-263 (1993); Pietras y col., *Oncogene*, 9:1829-1838 (1994); Vitetta y col., *Cancer Research*, 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski y col., *J. Biol. Chem.*, 269 (20): 14661-14665 (1994); Scott y col., *J. Biol. Chem.*, 266:14300-5 (1991); D'souza y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 91:7202-7206 (1994); Lewis y col., *Cancer Research*, 56:1457-1465 (1996); y Schaefer y col., *Oncogene*, 15:1385-1394 (1997).

**[0007]** Una versión humanizada recombinante del anticuerpo dirigido contra ErbB2 murino 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2 o HERCEPTIN®; patente de EE.UU. nº 5.821.337) es clínicamente activa en paciente con cánceres de mama metastáticos que expresan en exceso ErbB2 que han recibido previamente terapia anticancerígena extensa (Baselga y col., *J. Clin. Oncol.*, 14:737-744 (1996)). HERCEPTIN® recibió la aprobación de comercialización de la Agencia de Alimentos y Medicamentos el 25 de septiembre de 1998, para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastático, cuyos tumores expresan en exceso la proteína ErbB2. Sin embargo, no todos los tumores que expresan en exceso ErbB2 responden a HERCEPTIN®. (Brockhoff y col., *Cytometry*, 44:338-48 (2001)). Además, los datos preclínicos sugieren que HERCEPTIN® puede ser terapéuticamente eficaz en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). La proteína HER2 es expresada en exceso en 20-66% de los tumores de CPCNP extirpados y se ha mostrado que predice una respuesta pobre del paciente en series múltiples (Azzoli, C.G. y col., *Semin. Oncol.*, 29(Suppl 4):59-65 (2002)).

**[0008]** Se han descrito otros anticuerpos dirigidos contra ErbB2 con diferentes propiedades en Tagliabue y col., *Int. J. Cancer*, 47: 933-937 (1991); McKenzie y col., *Oncogene*, 4:543-548 (1989); Maier y col., *Cancer Res.*, 51:5361-5369 (1991); Bacus y col., *Molecular Carcinogenesis*, 3:350-362 (1990); Stancovski y col., *PNAS (USA)*, 88:8691-8695 (1991); Bacus y col., *Cancer Research*, 52:2580-2589 (1992); Xu y col., *Int. J. Cancer*, 53:401-408 (1993); documento WO94/00136; Kasprzyk y col., *Cancer Research*, 52:2771-2776 (1992); Hancock y col., *Cancer Res.*, 51:4575-4580 (1991); Shawver et al, *Cancer Res.*, 54:1367-1373 (1994); Arteaga y col., *Cancer Res.*, 54:3758-3765 (1994); Harwerth y col., *J. Biol. Chem.*, 267:15160-15167 (1992); patente de EE.UU. nº 5.783.186; y Klapper y col., *Oncogene*, 14:2099-2109 (1997). El anticuerpo monoclonal 2C4 se describe en el documento WO 01/00245, y se ha mostrado que 2C4 altera la dimerización de HER2 con otros miembros de la familia de receptores ErbB (documento WO 01/00245).

**[0009]** El cribado por homología ha dado como resultado la identificación de otros dos miembros de la familia de receptores ErbB; ErbB23 (patentes de EE.UU. nº 5.183.884 y 5.480.968 así como Kraus y col., *PNAS (USA)*, 86:9193-9197 (1989)) y ErbB4 (solicitud de patente EP nº 599.274; Plowman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); y Plowman y col., *Nature*, 366: 473-475 (1993)), y ambos receptores presentan una mayor expresión en al menos algunas líneas celulares de cáncer de mama.

**[0010]** Los receptores ErbB en general se encuentran en diferentes combinaciones en células y se cree que la heterodimerización aumenta la diversidad de las respuestas celulares a una variedad de ligandos de ErbB (Earp y col., *Breast Cancer Research and Treatment*, 35:115-132 (1995)). Sin embargo, el mecanismo por el cual estos receptores se agregan y cómo contribuye esto a la señalización no se comprende del todo (Brennan, P.J. y col., *Oncogene*, 19:6093-6101 (2000)). Al EGFR se unen 6 ligandos diferentes; el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), anfiregulina, factor de crecimiento epidérmico ligado a la heparina (HB-EGF), betacelulina y epiregulina (Groenen y col., *Growth Factors*, 11:235-257 (1994)). Una familia de proteínas heregulinas que resultan del corte y empalme alternativo de un solo gen, son ligandos para ErbB3 y ErbB4. La familia de heregulinas incluye heregulinas alfa, beta y gamma (Holmes y col., *Science*, 256:1205-1210 (1992); patente de EE.UU. nº 5.641.869; y Schaefer y col., *Oncogene*, 15:1385-1394 (1997)); factores de diferenciación neu (NDF), factores de crecimiento gliales (GGF); proteína inductora de actividad del receptor de acetilcolina (ARIA); y factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF). Para una revisión, véase Groenen y col., *Growth Factors*, 11:235-257 (1994); Lemke, G., *Molec. & Cell. Neurosci.*, 7:247-262 (1996) y Lee y col., *Pharm. Rev.*, 47:51-85 (1995). Recientemente, se han identificado tres ligandos adicionales de ErbB; neuregulina-2 (NRG-2) que se ha publicado que se une a ErbB3 o ErbB4 (Chang y col., *Nature*, 387:509-512 (1997); y Carraway y col., *Nature*, 387:512-516 (1997)); neuregulina-3 que se une a ErbB4 (Zhang y col., *PNAS (USA)*, 94(18):9562-7 (1997)); y neuregulina-4 que se une a ErbB4 (Harari y col., *Oncogene*, 18:2681-89 (1999)) HB-EGF, betacelulina y epiregulina también se unen a ErbB4.

**[0011]** Aunque EGF y TGF $\alpha$  no se unen a ErbB2, el EGF estimula al EGFR y ErbB2 para formar un heterodímero, el cual activa el EGFR y produce la transfosforilación de ErbB2 en el heterodímero. La dimerización y/o transfosforilación parece que activan la tirosina quinasa ErbB2. Véase Earp y col., véase antes. Igualmente, la heregulina no se une a ErbB2, pero cuando ErbB3 es expresado conjuntamente con ErbB2, se forma un complejo de señalización activo (Nagy y col., *Cytometry*, 32:120-31 (1998)). Los anticuerpos dirigidos contra ErbB2 son capaces de alterar este complejo (Sliwkowski y col., *J. Biol. Chem.*, 269 (20):14661-14665 (1994)). ErbB3 es una tirosina quinasa defectuosa y por lo tanto requiere la heterodimerización, preferiblemente con ErbB2, para la capacidad de transducción de señales. (Graus-Porta y col., *EMBO J.*, 16:1647-55 (1995)). Además, la afinidad de ErbB3 por la heregulina (HRG) aumenta a un estado de afinidad mayor cuando es expresada conjuntamente con

ErbB2. Véase también, Levi y col., *Journal of Neuroscience*, 15:1329-1340 (1995); Morrissey y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:1431-1435 (1995); y Lewis y col., *Cancer Res.*, 56:1457-1465 (1996), con respecto al complejo de proteínas ErbB2-ErbB3. Realmente, ErbB2 es la pareja de heterodimerización preferida tanto para EGFR como para ErbB3. (Graus-Porta y col., véase antes). ErbB4, como ErbB3, forma un complejo de señalización activo con ErbB2  
5 (Carraway y Cantley, *Cell*, 78:5-8 (1994)). La heterodimerización dependiente de ligando de ErbB2 con EGFR o ErbB3 puede promover el crecimiento de tumores que expresan ErbB2.

**[0012]** La expresión de los receptores ErbB y la heregulina y el estado de fosforilación de HER2 se ha investigado en muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama primario y carcinoma de vejiga urinaria (Esteva y col.,  
10 *Pathol. Oncol. Res.*, 7:171-177 (2001); Chow y col., *Clin. Cancer Res.*, 7:1957-1962 (2001)). La correlación entre la señalización activa a través de Her2/neu y la bioquímica clínica y la respuesta del paciente en el cáncer de mama se ha descrito en Thor y col., *J. Clin. Oncology*, 18:3230-3239 (2000), y DiGiovanna y col., *Cancer Res.*, 62:6667-6673 (2002).

15 **[0013]** En el presente documento se describe un procedimiento para identificar un tumor que es sensible al tratamiento con un anticuerpo dirigido contra HER-2, rhuMab 2C4.

**[0014]** Se obtiene una muestra del tumor y se detecta en la muestra la presencia del complejo de proteínas HER2/HER3 y/o HER2/HER1 y/o HER2/HER4. Un tumor se identifica como sensible al tratamiento con el anticuerpo  
20 dirigido contra HER2 cuando se detecta un complejo.

**[0015]** La presencia de un complejo se puede detectar por inmunoprecipitación de cualesquiera complejos de proteínas que comprendan HER2 con un anticuerpo dirigido contra HER2. Los complejos inmunoprecipitados después se ponen en contacto con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos dirigidos  
25 contra HER3, anticuerpos dirigidos contra HER1 y anticuerpos dirigidos contra HER4, y se determina cualquier unión. Un complejo HER2/HER3 y/o HER2/HER1 y/o HER2/HER4 se detecta si se determina que los anticuerpos dirigidos contra HER3 y/o contra HER1 y/o contra HER4 se unen a los complejos inmunoprecipitados.

**[0016]** La presencia de un complejo de proteínas HER2/HER3 y/o HER2/HER1 y/o HER2/HER4 se puede detectar  
30 poniendo en contacto la muestra de tumor con un anticuerpo dirigido contra HER2 que comprende un primer fluoróforo. La muestra de tumor después se pone en contacto con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos dirigidos contra HER3 y/o contra HER1 y/o contra HER4, en el que dicho anticuerpo comprende un segundo fluoróforo. Después, se hacen mediciones de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia para determinar si el primer fluoróforo y el segundo fluoróforo están muy cerca. La presencia de un  
35 complejo de proteínas HER2/HER3 y/o HER2/HER1 y/o HER2/HER4 se detecta si se determina que el primer y el segundo fluoróforos están muy cerca.

**[0017]** La presencia de un complejo HER2/HER3 y/o HER2/HER1 y/o HER2/HER4 se puede detectar poniendo en contacto la muestra de tumor con un primer compuesto de unión. El primer compuesto de unión comprende un  
40 primer resto de unión a la diana que se une específicamente a HER2. El primer resto de unión a la diana es preferiblemente un anticuerpo dirigido contra HER2 o fragmento de anticuerpo. El primer compuesto de unión comprende además un resto detectable que se une al primer dominio de unión mediante un conector escindible.

**[0018]** La muestra de tumor se pone en contacto con un segundo compuesto de unión. El segundo compuesto de  
45 unión preferiblemente comprende un segundo resto de unión a la diana que se une específicamente a HER3 o HER1 o HER4 y preferiblemente no se une a HER2.

**[0019]** El segundo compuesto de unión se puede unir a HER3 o HER1, y no se une a HER2 o HER4, o el segundo resto de unión a la diana puede comprender un anticuerpo dirigido contra HER3 o contra HER1 o contra HER4 o un  
50 fragmento de anticuerpo. El segundo compuesto de unión es capaz de escindir el conector escindible en el primer compuesto de unión tras la activación, produciendo así el resto detectable libre si el primer compuesto de unión y el segundo compuesto de unión están muy cerca. La presencia de un complejo de proteínas HER2/HER3 o HER2/HER1 o HER2/HER4 se detecta cuando se identifica la presencia del resto detectable libre. La presencia del resto detectable libre se puede identificar por electroforesis capilar.

55 **[0020]** El primero compuesto de unión puede comprender un primer dominio de unión a la diana que se une específicamente a HER1 o HER3 o HER4, y el segundo compuesto de unión puede comprender un segundo dominio de unión a la diana que se une específicamente a HER2.

60 **[0021]** La presencia de un complejo de proteínas HER2/HER3 y/o HER2/HER1 y/o HER2/HER4, y la activación de HER2 resultante, se pueden detectar evaluando la fosforilación del receptor de ERbB, por ejemplo por inmunoprecipitación de la proteína HER2 seguido de inmunodetección por transferencia Western de la fosfotirosina.

**[0022]** La muestra de tumor en la que se analiza la presencia de los complejos de proteínas HER2/HER3 y/o  
65 HER2/HER1 y/o HER2/HER4 se obtiene preferiblemente de un paciente que padece el tumor. La muestra se puede

obtener, por ejemplo, por biopsia o por purificación de células tumorales circulantes del paciente o durante la cirugía para eliminar el tumor del paciente.

5 [0023] La muestra del tumor se puede obtener de un mamífero distinto del paciente que desarrolló originalmente el tumor. Preferiblemente, la muestra se obtiene de un ratón o de otro roedor. Más preferiblemente, el tumor es un tumor xenotrasplantado. El tumor xenotrasplantado preferiblemente se produce por trasplante de un fragmento de un tumor humano en un ratón u otro roedor.

10 [0024] El tumor puede ser un tumor de pulmón, más preferiblemente un tumor de cáncer de pulmón de células no pequeñas. El tumor puede ser un tumor de mamífero.

[0025] En el presente documento se describe un procedimiento para identificar células tumorales que son sensibles al tratamiento con un anticuerpo que inhibe la asociación de HER2 con otro miembro de la familia de receptores ErbB, que comprende las etapas de (a) proporcionar una muestra biológica que comprende células tumorales positivas para HER2; y (b) detectar la fosforilación de un receptor ErbB en la muestra biológica, en el que dicha fosforilación indica que las células tumorales son sensibles al tratamiento con el anticuerpo. La fosforilación de un receptor ErbB2 (HER2) se puede detectar.

15

[0026] Al igual que antes, el otro miembro asociado con HER2 es HER3, HER1 y/o HER4, tal como HER2 y/o HER1. El procedimiento puede comprender además una etapa de detectar la presencia de un complejo de proteínas HER2/HER3 y/o HER2/HER1 y/o HER2/HER4, esencialmente como se ha descrito antes.

20

[0027] En el presente documento se describe un procedimiento para predecir la respuesta de un sujeto al que se ha diagnosticado un tumor positivo para HER2, al tratamiento con un anticuerpo rhuMab 2C4 que inhibe la asociación de HER2 con otro miembro de la familia de receptores ErbB, detectando la formación de los complejos de proteínas HER2/HER3 y/o HER2/HER1 y/o HER2/HER4 y/o la fosforilación de un receptor ErbB en una muestra biológica obtenida de un sujeto, que comprende células tumorales positivas para HER2. La presencia de dichos complejos de proteínas y/o dicha fosforilación indican que es probable que el sujeto responda al tratamiento con el anticuerpo. La detección de la fosforilación del receptor ErbB2 (HER2) puede indicar que es probable que el sujeto responda al tratamiento con el anticuerpo.

25

30

[0028] En el presente documento se describe un procedimiento para identificar un sujeto que es sensible al tratamiento con un anticuerpo dirigido contra HER2 rhuMab 2C4, detectando la fosforilación de un receptor ErbB en las células tumorales circulantes del sujeto. La presencia de dicha fosforilación indica que es probable que el sujeto responda al tratamiento con el anticuerpo dirigido contra HER2. Se puede detectar la fosforilación de ErbB2 (HER2). El sujeto puede ser un ser humano.

35

[0029] También se describe un artículo de fabricación que comprende un envase que comprende un anticuerpo rhuMab 2C4 e instrucciones para administrar el anticuerpo a un paciente que padece un tumor. Preferiblemente, se ha determinado que el tumor comprende heterodímeros de HER2/HER3 y/o HER2/HER1 y/o HER2/HER4.

40

### **Resumen de la invención**

[0030] La presente invención se define en las reivindicaciones.

45

### **Breve descripción de los dibujos**

#### **[0031]**

Las figuras 1A y 1B representan alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los dominios ligeros variables (VL) (Fig. 1A) y pesados variables (VH) (Fig. 1B) del anticuerpo monoclonal murino 2C4 (SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente); los dominios VL y VH de la versión de 2C4 humanizada 574 (SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente), y las regiones armazón consenso del VL y VH humanas (hum  $\kappa$ 1, ligera subgrupo kappa I; humIII, pesada subgrupo III) (SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente). Los asteriscos identifican las diferencias entre la versión humanizada de 2C4 574 y el anticuerpo monoclonal murino 2C4 o entre la versión humanizada de 2C4 574 y la región armazón humana. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están entre corchetes.

50

55

Las figuras 2A y 2B muestran el efecto del anticuerpo monoclonal 2C4, el anticuerpo HERCEPTIN<sup>®</sup> o un anticuerpo dirigido contra EGFR en la asociación dependiente de la heregulina (HRG) de ErbB2 con ErbB3 en células MCF7 que expresan niveles bajos/normales de ErbB2 (Fig. 2A) y células SK-BR-3 que expresan niveles altos de ErbB2 (Fig. 2B); véase el ejemplo 2 a continuación.

60

La figura 3 es una inmunotransferencia que muestra la presencia de los heterodímeros HER1/HER2 y HER2/HER3 en extractos de proteínas de explantes de xenoinjertos de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

65 La figura 4 es una inmunotransferencia que muestra la presencia de fosforilación de HER2 en extractos de proteínas

de explantes de xenoinjertos de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP).

#### **Descripción detallada de la realización preferida**

5 **[0032]** En el presente documento se describe el descubrimiento experimental de que la sensibilidad al anticuerpo dirigido contra HER2 rhuMab 2C4 se correlaciona con la presencia de heterodímeros HER2/HER3 y/o HER2/HER1 y/o HER2/HER4, y/o la fosforilación de un receptor ErbB en células tumorales. Por lo tanto, un tumor se puede identificar como sensible al tratamiento con un anticuerpo dirigido contra HER2, basándose en la presencia de heterodímeros HER2/HER3 y/o HER2/HER1 y/o HER2/HER4, y/o la fosforilación de un receptor ErbB. Los  
10 heterodímeros HER2/HER3 y/o HER2/HER1 y/o HER2/HER4, y/o la fosforilación de un receptor ErbB, se pueden identificar por cualquier procedimiento conocido en la materia. Mediante la identificación de tumores específicos y de tipos de tumores que son sensibles al tratamiento con anticuerpos dirigidos contra HER2, se podrán identificar los pacientes que es probable que se beneficien más mediante dicho tratamiento. Además, se pueden identificar los pacientes que es probable que no se beneficien de la terapia con el anticuerpo monoclonal 2C4.

15

#### **Definiciones**

**[0033]** Un "receptor ErbB" es un receptor proteína tirosina quinasa que pertenece a la familia de receptores ErbB e incluye los receptores EGFR (ErbB1), ERRP, ErbB2, ErbB3 y ErbB4 y otros miembros de esta familia que se  
20 identifiquen en el futuro. El receptor ErbB en general comprenderá un dominio extracelular, que se puede unir a un ligando de ErbB; un dominio transmembrana lipófilo; un dominio de tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización de carboxilo terminal que alberga varios restos de tirosina que pueden ser fosforilados. El receptor ErbB puede ser un receptor ErbB de "secuencia natural" o una "variante de la secuencia de aminoácidos" de la misma. Preferiblemente, el receptor ErbB es un receptor ErbB humano de secuencia natural. Por consiguiente,  
25 un "miembro de la familia de receptores ErbB" es EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3, ErbB4 o cualquier otro receptor ErbB conocido actualmente o que se identifique en el futuro. Preferiblemente, el miembro es EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3, o ErbB4.

**[0034]** Las expresiones "ErbB 1", "receptor del factor de crecimiento epidérmico", "EGFR" y "HER1" se usan de  
30 forma intercambiable en el presente documento y se refieren al EGFR como se describe, por ejemplo, en Carpenter y col., *Ann. Rev. Biochem.*, 56:881-914 (1987), incluyendo las formas mutantes naturales de los mismos (p. ej., un mutante de EGFR por eliminación, como en Humphrey y col., *PNAS (USA)*, 87:4207-4211 (1990)). erbB1 se refiere al gen que codifica el producto proteínico EGFR. Los anticuerpos contra HER1 se describen, por ejemplo, en Murthy y col., *Arch. Biochem. Biophys.*, 252:549-560 (1987) y en el documento WO 95/25167.

35

**[0035]** Las expresiones "ERRP", "proteína relacionada con el receptor EGF", "proteína relacionada con el EGFR" y "proteína relacionada con el receptor del factor de crecimiento epidérmico" se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refieren a la ERRP como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 6.399.743 y publicación de EE.UU. nº 2003/0096373.

40

**[0036]** Las expresiones "ErbB2" y "HER2" se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refieren a la proteína HER2 humana descrita, por ejemplo, por Semba y col., *PNAS (USA)*, 82:6497-6501 (1985) y Yamamoto y col., *Nature*, 319:230-234 (1986) (número de acceso en Genbank X03363). El término "erbB2" se refiere al gen que codifica el ErbB2 humano y "neu" se refiere al gen que codifica p185neu de rata. El ErbB2  
45 preferido es la secuencia natural de ErbB2 humano.

**[0037]** "ErbB3" y "HER3" se refieren al polipéptido receptor como se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.183.884 y 5.480.968, así como en Kraus y col., *PNAS (USA)*, 86:9193-9197 (1989). Los anticuerpos dirigidos contra ErbB3 son conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº  
50 5.183.884, 5.480.968 y en el documento WO 97/35885.

**[0038]** Los términos "ErbB4" y "HER4" se refieren en el presente documento al polipéptido receptor como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente EP nº 599.274; Plowman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); y Plowman y col., *Nature*, 366: 473-475 (1993), incluyendo las isoformas del mismo, p. ej.,  
55 como se describe en el documento WO 99/19488, publicado el 22 de abril, 1999. Los anticuerpos dirigidos contra HER4 se describen, por ejemplo, en el documento WO 02/18444.

**[0039]** Los anticuerpos contra los receptores ErbB están disponibles en el mercado de una serie de fuentes, incluyendo, por ejemplo, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, EE.UU.

60

**[0040]** Por "ligando de ErbB" se entiende un polipéptido que se une a y/o activa un receptor ErbB. El ligando de ErbB puede ser un ligando de ErbB humano de secuencia natural tal como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Savage y col., *J. Biol. Chem.*, 247:7612-7621 (1972)); factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) (Marquardt y col., *Science*, 223:1079-1082 (1984)); anfieregulina también conocida como factor de crecimiento autocrino de  
65 queratinocitos o schwannoma (Shoyab y col., *Science*, 243:1074-1076 (1989); Kimura y col., *Nature*, 348:257-260

(1990); y Cook y col., *Mol. Cell. Biol.*, 11:2547-2557 (1991)); betacelulina (Shing y col., *Science*, 259:1604-1607 (1993); y Sasada y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190:1173 (1993)); factor de crecimiento epidérmico ligado a la heparina (HB-EGF) (Higashiyama y col., *Science*, 251:936-939 (1991)); epiregulina (Toyoda y col., *J. Biol. Chem.*, 270:7495-7500 (1995); y Komurasaki y col., *Oncogene*, 15:2841-2848 (1997)); una heregulina (véase antes);  
 5 neuregulina-2 (NRG-2) (Carraway y col., *Nature*, 387:512-516 (1997)); neuregulina-3 (NRG-3) (Zhang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:9562-9567 (1997)); neuregulina-4 (NRG-4) (Harari y col., *Oncogene*, 18:2681-89 (1999)) o cripto (CR-1) (Kannan y col., *J. Biol. Chem.*, 272(6):3330-3335 (1997)). Los ligandos de ErbB que se unen al EGFR incluyen EGF, TGF- $\alpha$ , anfiregulina, betacelulina, HB-EGF y epiregulina. Los ligandos de ErbB que se unen al ErbB3 incluyen las heregulinas. Los ligandos de ErbB que pueden unirse al ErbB4 incluyen betacelulina, epiregulina, HB-  
 10 EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 y heregulinas. El ligando de ErbB también puede ser un ligando de ErbB sintético. El ligando sintético puede ser específico para un receptor ErbB particular o puede reconocer complejos de receptores ErbB particulares. Un ejemplo de un ligando sintético es la biregulina quimera heregulina/egf sintética (véase, por ejemplo, Jones y col., *FEBS Letters*, 447:227-231 (1999)).

15 **[0041]** “Heregulina” (HRG) cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido codificado por el producto del gen de la heregulina, como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.641.869 o Marchionni y col., *Nature*, 362:312-318 (1993). Los ejemplos de heregulinas incluyen heregulina- $\alpha$ , heregulina- $\beta$ 1, heregulina- $\beta$ 2 y heregulina- $\beta$ 3 (Holmes y col., *Science*, 256:1205-1210 (1992); y patente de EE.UU. nº 5.641.869); factor de diferenciación de neu (NDF) (Peles y col., *Cell*, 69: 205-216 (1992)); proteína inductora de actividad del receptor de  
 20 acetilcolina (ARIA) (Falls y col., *Cell*, 72:801-815 (1993)); factores de crecimiento gliales (GGF) (Marchionni y col., *Nature*, 362:312-318 (1993)); factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho y col., *J. Biol. Chem.*, 270:14523-14532 (1995));  $\gamma$ -heregulina (Schaefer y col., *Oncogene*, 15:1385-1394 (1997)). El término incluye fragmentos biológicamente activos y/o variantes de secuencias de aminoácidos del polipéptido HRG de secuencia natural, tal como un fragmento del dominio similar a EGF del mismo (p. ej., HRG $\beta$ 1177-244).

25 **[0042]** Un “heterooligómero de ErbB” en el presente documento, es un oligómero asociado de forma no covalente, que comprende al menos dos receptores ErbB diferentes. Un “dímero de ErbB” es un oligómero asociado de forma no covalente que comprende dos receptores ErbB diferentes. Dichos complejos pueden formarse cuando una célula que expresa dos o más receptores ErbB es expuesta a un ligando de ErbB. Los oligómeros de ErbB, tales como los  
 30 dímeros de ErbB, se pueden aislar por inmunoprecipitación y analizar por SDS-PAGE, como describen Sliwkowski y col., *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994), por ejemplo. Los ejemplos de dichos heterooligómeros de ErbB incluyen los complejos EGFR-ErbB2 (denominado también HER1/HER2), ErbB2-ErbB3 (HBR2/HBR3) y ErbB3-ErbB4 (HER3/HER4). Además, el heterooligómeros de ErbB puede comprender dos o más receptores ErbB2 combinados con un receptor ErbB diferente, tal como ErbB3, ErbB4 o EGFR (ErbB1). Pueden estar incluidas otras  
 35 proteínas, tales como una subunidad del receptor de citoquinas (p. ej., gp130) en el heterooligómero.

**[0043]** Por “activación por el ligando de un receptor ErbB” se entiende la transducción de señales (p. ej., que es producida por un dominio de quinasa intracelular de un receptor ErbB que fosforila restos de tirosina en el receptor ErbB o un polipéptido sustrato) mediada por la unión del ligando de ErbB a un heterooligómero de ErbB que  
 40 comprende el receptor ErbB de interés. En general, esto implicará la unión de un ligando de ErbB a un heterooligómero de ErbB que activa un dominio de quinasa de uno o más de los receptores ErbB en el heterooligómero y de esta forma produce la fosforilación de restos de tirosina en uno o más de los receptores ErbB y/o la fosforilación de restos de tirosina en polipéptido(s) sustrato adicional(es). La activación del receptor ErbB se puede cuantificar usando diferentes ensayos de fosforilación de tirosina.

45 **[0044]** Un polipéptido de “secuencia natural” es el que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (p. ej., receptor ErbB o ligando de ErbB) obtenido de la naturaleza. Dichos polipéptidos de secuencia natural se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir por medios recombinantes o sintéticos. Por lo tanto, un polipéptido de secuencia natural puede tener la secuencia de aminoácidos natural del polipéptido humano, el  
 50 polipéptido murino o el polipéptido de cualquier otra especie de mamífero.

**[0045]** La expresión “variante de la secuencia de aminoácidos” se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren en cierta medida de un polipéptido de secuencia natural. Normalmente, las variantes de la secuencia de aminoácidos tendrán una homología de al menos aproximadamente 70% con al menos un dominio de  
 55 unión del receptor de un ligando de ErbB natural, o con al menos un dominio de unión al ligando de un receptor ErbB natural, y preferiblemente, será al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente, al menos aproximadamente 90% homólogo con dichos dominios de unión del receptor o ligando. Las variantes de la secuencia de aminoácidos tienen sustituciones, eliminaciones y/o inserciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos natural.

60 **[0046]** “Homología” se define como el porcentaje de restos en la variante de la secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir huecos, cuando sea necesario, para lograra el porcentaje máximo de homología. Los procedimientos y los programas de ordenador para el alineamiento son bien conocidos en la materia. Uno de dichos programas de ordenador es “Align 2”, del que es autor Genentech, Inc., que se  
 65 presentó con documentación de usuario en la Oficina de los derechos de Autor de Estados Unidos (United States

Copyright Office), Washington, DC 20559, el 10 de diciembre, 1991.

**[0047]** El término “anticuerpo” en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos  
5 biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

**[0048]** La expresión “anticuerpo monoclonal” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que  
10 comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, y están dirigidos contra un solo sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en  
15 cuanto que se pueden sintetizar sin contaminación por otros anticuerpos. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe considerarse que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan de acuerdo con la presente invención se pueden hacer por el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), o se puede hacer por  
20 procedimientos de ADN recombinante (véase, p. ej., la patente de EE.UU. nº 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos sobre fagos usando las técnicas descritas por Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

**[0049]** Los anticuerpos monoclonales del presente documento, incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos”  
25 en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias de anticuerpos obtenidos de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la o las cadenas es idéntico u homólogo a las correspondientes secuencias de anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, con la condición de que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. nº 4.816.567; y  
30 Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés del presente documento incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión al antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (p. ej., monos del viejo mundo, simios etc.) y secuencias de la región constante humana.

**[0050]** Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que comprende preferiblemente la región variable o de unión al antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv; fragmentos bivalentes; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de una sola cadena; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento o fragmentos de anticuerpos.  
40

**[0051]** Un anticuerpo “intacto” es uno que comprende una región variable de unión al antígeno así como un dominio constante de la cadena ligera (CL) y dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (p. ej., dominios constantes de secuencia natural humana) o variantes de la secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo intacto  
45 tiene una o más funciones efectoras.

**[0052]** Las “funciones efectoras” del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o región Fc de variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen la unión a C1q; citotoxicidad dependiente de  
50 complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de los receptores de superficie celular (p. ej., receptor de linfocitos B; BCR), etc.

**[0053]** Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a diferentes “clases”. Hay 5 clases principales de anticuerpos intactos: IgA,  
55 IgD, IgE, IgG, e IgM, y varios de estos se pueden dividir además en “subclases” (isotipos), p. ej., IgG1 IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se llaman  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

**[0054]** La “citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos” y “ADCC” se refieren a una reacción mediada por  
60 células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (p. ej., linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente producen la lisis de la célula diana. Las células principales para la mediación de la ADCC, las células NK, expresan solo FC $\gamma$ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. La expresión de FcR en células  
65 hematopoyéticas se resume en la tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92



(1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede llevar a cabo un ensayo de ADCC in vitro, tal como el que se describe en la patente de EE.UU. n° 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar in vivo, p. ej., en un modelo animal tal como el descrito por Clynes y col., *PNAS (USA)*, 95:652-656 (1998).

**[0055]** Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FC $\gamma$ RIII y realizan la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; siendo las CMSP y las células NK las preferidas. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente natural de las mismas, p. ej., de sangre o CMSP como se describe en el presente documento.

**[0056]** Las expresiones “receptor de Fc” o “FcR” se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye los receptores de las subclases Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, incluyendo variantes alélicas y alternativamente formas cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores Fc $\gamma$ RII incluyen Fc $\gamma$ RIIA (un “receptor activante”) y Fc $\gamma$ RIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor Fc $\gamma$ RIIA activante contiene un patrón de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor Fc $\gamma$ RIIB contiene un patrón de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase la revisión de M. in Daëron. *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel y col., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); y de Haas y col., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están abarcados en el término “FcR” del presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia IgG maternas al feto (Guyer y col., *J. Immunol.*, 117:587 (1976) y Kim y col., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

**[0057]** La “citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refiere a la capacidad de una molécula para producir la lisis en una diana en presencia del complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (p. ej., un anticuerpo) que forma complejo con un antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento se puede llevar a cabo un ensayo de la CDC, p. ej., como describen Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods*, 202: 163 (1996).

**[0058]** Los “anticuerpos naturales” normalmente son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tienen puentes disulfuro entre cadenas espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada.

**[0059]** El término “variable” se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren extensamente en la secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en 3 segmentos llamados regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones de armazón (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina  $\beta$ , conectada por tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina  $\beta$ . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas muy cerca por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase, Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diferentes condiciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

**[0060]** La expresión “de región hipervariable” cuando se usa en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. En general, la región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una “región determinante de la complementariedad” o “CDR” (p. ej., los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera, y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª

Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (p. ej., los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera, y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)). Los restos de la "región almacén" o "FR" son los restos del dominio variable distintos de los  
5 restos de la región hipervariable como se define en el presente documento.

**[0061]** La digestión de anticuerpos por la papaína produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual", cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina da un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que  
10 tiene dos sitios de unión al antígeno y todavía es capaz de unión cruzada con el antígeno.

**[0062]** "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento al antígeno y de unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL.  
15 Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión entero.  
20

**[0063]** El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para el Fab' en el que el o los restos de cisteína de  
25 los dominios constantes soportan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> se produjeron originalmente como parejas de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

**[0064]** Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos de cualquier especie vertebrada se pueden asignar a uno de dos  
30 tipos claramente distintos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

**[0065]** Los fragmentos de anticuerpo "Fv de una sola cadena" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptido. Preferiblemente, el  
35 polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que los scFv formen la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los scFv véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pág. 269-315 (1994). Los fragmentos scFv del anticuerpo dirigido contra ErbB2 se describen en el documento WO 93/16185; patente de EE.UU. n° 5.571.894; y patente de EE.UU. n° 5.587.458.  
40

**[0066]** La expresión "anticuerpos bivalentes" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpo que tienen dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH-VL). Mediante el uso de un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los  
45 dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los anticuerpos bivalentes se describen de forma más completa, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

**[0067]** Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., de roedor) son anticuerpos quiméricos que  
50 contiene la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Para la mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una región hipervariable del que los recibe se sustituyen por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región almacén (FR) de la inmunoglobulina humana son sustituidos por los  
55 correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se hacen para refinar más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y todos o sustancialmente todas las FR son las de una  
60 secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

**[0068]** Los anticuerpos dirigidos contra ErbB2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3,  
65

huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) como se describe en la tabla 3 de la patente de EE.UU. n° 5.821.337; 520C9 humanizado (documento WO 93/21319) y anticuerpos 2C4 humanizados como se describe más adelante en el presente documento.

5 **[0069]** Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico y terapéutico del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de 95% en peso del anticuerpo, determinado por el procedimiento de Lowry, y más preferiblemente hasta más de 99% en peso, (2) hasta un grado  
10 suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminales o internos usando un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras, usando azul Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ en células recombinantes hasta que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no esté presente. Sin embargo, normalmente, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de  
15 purificación.

**[0070]** Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés, p. ej., antígeno ErbB2, es uno que es capaz de unirse a ese antígeno con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil para dirigirse a una célula que expresa el antígeno. Cuando el anticuerpo es uno que se une a ErbB2, normalmente se unirá preferentemente a ErbB2 frente a  
20 otros receptores ErbB, y puede ser uno que no tenga reacciones cruzadas significativas con otras proteínas tales como EGFR, ErbB3 o ErbB4. En dichas realizaciones, la extensión de la unión del anticuerpo a estas proteínas que no son ErbB2 (p. ej., unión de la superficie celular al receptor endógeno) será menos de 10%, determinada por análisis de separación de células activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). A veces, el anticuerpo dirigido contra ErbB2 no tendrá reacción cruzada significativa con la proteína neu de rata, p. ej., como  
25 describen Schecter y col., *Nature*, 312:513 (1984) y Drebin y col., *Nature*, 312:545-548 (1984).

**[0071]** Un anticuerpo que "bloquea" la activación del ligando de un receptor ErbB es uno que reduce o previene dicha activación como se ha definido en lo que antecede, en el que el anticuerpo es capaz de bloquear la activación del ligando del receptor ErbB sustancialmente de forma más eficaz que el anticuerpo monoclonal 4D5, p. ej.,  
30 aproximadamente de forma tan eficaz como los anticuerpos monoclonales 7F3 o 2C4 o fragmentos Fab de los mismos y preferiblemente aproximadamente de forma tan eficaz como el anticuerpo monoclonal 2C4 o un fragmento Fab del mismo. Por ejemplo, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor ErbB puede ser uno que es aproximadamente 50-100% más eficaz que 4D5 en el bloqueo de la formación de un heterooligómero de ErbB. El bloqueo de la activación del ligando de un receptor ErbB se puede producir por cualquier medio, p. ej., por  
35 interferencia con: la unión del ligando a un receptor ErbB, formación del complejo de ErbB, actividad de tirosina quinasa del receptor ErbB en un complejo de ErbB y/o fosforilación del o de los restos de tirosina quinasa en o por un receptor ErbB. Los ejemplos de anticuerpos que bloquean la activación del ligando de un receptor ErbB incluyen los anticuerpos monoclonales 2C4 y 7F3 (que bloquean la activación de HRG de los heterooligómeros ErbB2/ErbB3 y ErbB2/ErbB4; y la activación de EGF, TGF- $\alpha$ , anfiregulina, HB-EGF y/o epiregulina de un heterooligómero  
40 EGFR/ErbB2); y los anticuerpos L26, L96 y L288 (Klapper y col., *Oncogene*, 14:2099-2109 (1997)), que bloquean la unión de EGF y NDF a células T47D que expresan EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4.

**[0072]** Un anticuerpo que tiene una "característica biológica" de un anticuerpo designado, tal como el anticuerpo monoclonal designado 2C4, es uno que tiene una o más características biológicas de ese anticuerpo que lo  
45 distinguen de otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno (p. ej., ErbB2). Por ejemplo, un anticuerpo con una característica biológica de 2C4 puede bloquear la activación de HRG de un heterooligómero de ErbB que comprende ErbB2 y ErbB3, ErbB1 o ErbB4; bloquear la activación de EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF, epiregulina y/o anfiregulina de un receptor ErbB que comprende EGFR y ErbB2; bloquear la activación de MAPK mediada por EGF, TGF- $\alpha$  y/o HRG; y/o unirse al mismo epítipo en el dominio extracelular de ErbB2 al que se une 2C4 (p. ej., que  
50 bloquea la unión del anticuerpo monoclonal 2C4 a ErbB2).

**[0073]** Salvo que se indique otra cosa, la expresión "anticuerpo monoclonal 2C4" se refiere a un anticuerpo que tiene restos de unión al antígeno de, o derivados del anticuerpo 2C4 murino de los ejemplos siguientes. Por ejemplo,  
55 el anticuerpo monoclonal 2C4 puede ser el anticuerpo monoclonal 2C4 murino o una variante del mismo, tal como el anticuerpo 2C4 humanizado, que tienen restos de aminoácidos de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal 2C4 murino. Se proporcionan ejemplos de anticuerpos 2C4 humanizados en el presente documento y en el documento WO 01/00245. Salvo que se indique otra cosa, la expresión "rhuMAb 2C4" cuando se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que comprende las secuencias de la cadena ligera variable (VL) y de la cadena pesada variable (VH) de las SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente, fusionadas con las secuencias de la región constante de  
60 IgG1 (alotipo no A) de las cadenas ligera y pesada humanas, opcionalmente expresadas por una célula de ovario de hámster chino (CHO).

**[0074]** Salvo que se indique otra cosa, la expresión "anticuerpo monoclonal 4D5" se refiere a un anticuerpo que tiene restos de unión al antígeno de, o derivados del anticuerpo 4D5 murino (ATCC CRL 10463). Por ejemplo, el  
65 anticuerpo monoclonal 4D5 puede ser anticuerpo monoclonal 4D5 murino o una variante del mismo, tal como un

4D5 humanizado, que tiene restos de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal 4D5 murino. Los ejemplos de anticuerpos 4D5 humanizados incluyen huMAB4D5-1, huMAB4D5-2, huMAB4D5-3, huMAB4D5-4, huMAB4D5-5, huMAB4D5-6, huMAB4D5-7 y huMAB4D5-8 (HERCEPTIN®) como en la patente de EE.UU. nº 5.821.337, siendo huMAB4D5-8 (HERCEPTIN®) un anticuerpo 4D5 humanizado preferido.

5

**[0075]** Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, en especial una célula de cáncer que expresa ErbB in vitro o in vivo. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan ErbB en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el avance del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S), tal como agentes que inducen la detención en G1 y la detención en la fase M. Los bloqueadores de la fase M clásicos incluyen vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen la fase G1 también se extienden a la detención en la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes del ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Se puede encontrar información adicional en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami y col. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), en especial pág. 13.

**[0076]** Los ejemplos de anticuerpos “inhibidores del crecimiento” son aquellos que se unen a ErbB2 e inhiben el crecimiento de las células cancerígenas que expresan en exceso ErbB2. Los anticuerpos dirigidos contra ErbB2 inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de las células de tumores de mama SK-BR-3 en el cultivo celular en más de 20%, y preferiblemente más de 50% (p. ej., de aproximadamente 50% a aproximadamente 100%) con una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml, en el que la inhibición del crecimiento se determina 6 días después de la exposición de las células SK-BR-3 al anticuerpo (véase la patente de EE.UU. nº 5.677.171 concedida el 14 de octubre, 1997). El ensayo de inhibición del crecimiento de células SK-BR-3 se describe con más detalle en esta patente y en el presente documento más adelante. El anticuerpo inhibidor del crecimiento preferido es el anticuerpo monoclonal 4D5, p. ej., 4D5 humanizado.

**[0077]** Un anticuerpo que “induce la muerte celular” es uno que hace que una célula viable se convierta en no viable. La célula, en general, es una que expresa el receptor ErbB2, en especial en la que la célula expresa en exceso el receptor ErbB2. Preferiblemente, la célula es una célula de cáncer, p. ej., una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreática o de vejiga. In vitro, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. La muerte celular in vitro se puede determinar en ausencia del complemento y células inmunitarias efectoras para distinguir la muerte celular inducida por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por lo tanto, el ensayo para la muerte celular se puede realizar usando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células inmunitarias efectoras. Para determinar si el anticuerpo es capaz de inducir la muerte celular, se puede evaluar la pérdida de la integridad de la membrana por la absorción de yoduro de propidio (PI), azul de trypan (véase, Moore y col., *Cytotechnology*, 17:1-11 (1995)) o 7AAD, con respecto a las células no tratadas. Los anticuerpos inductores de la muerte celular preferidos son los que inducen la absorción de PI en el ensayo de absorción de PI en células BT474 (véase a continuación).

**[0078]** Un anticuerpo que “induce apoptosis” es uno que induce la muerte celular programada determinada por la unión de anexina V, fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (llamadas cuerpos apoptóticos). La célula normalmente es una que expresa en exceso el receptor ErbB2. Preferiblemente, la célula es una célula tumoral, p. ej., una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreática o de vejiga. In vitro, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. Están disponibles diferentes procedimientos para evaluar los sucesos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de la fosfatidil serina (PS) se puede medir mediante la unión de anexina; la fragmentación de ADN se puede evaluar por escalonado del ADN (“*laddering*”); y la condensación nuclear/de cromatina junto con la fragmentación del ADN se pueden evaluar por cualquier aumento de las células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo que induce la apoptosis es uno que produce aproximadamente de 2 a 50 veces, preferiblemente de aproximadamente 5 a 50 veces, y lo más preferiblemente de aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de la unión de anexina con respecto a la célula no tratada, en un ensayo de unión de anexina usando células BT474 (véase a continuación). A veces, el anticuerpo proapoptótico será uno que bloquea además la activación del ligando de ErbB de un receptor ErbB (p. ej., el anticuerpo 7E3); es decir, el anticuerpo comparte una característica biológica con el anticuerpo monoclonal 2C4. En otras situaciones, el anticuerpo es uno que no bloquea significativamente la activación del ligando de ErbB de un receptor ErbB (p. ej., 7C2). Además, el anticuerpo puede ser uno como 7C2, que, aunque induce la apoptosis, no induce una reducción grande del porcentaje de células en la fase S (p. ej., uno que solo induce aproximadamente 0-10% de reducción en el porcentaje de estas células con respecto al control).

**[0079]** El “epítipo 2C4” es la región en el dominio extracelular de ErbB2 a la que se une el anticuerpo 2C4. Con el fin de cribar los anticuerpos que se unen al epítipo 2C4, se puede llevar a cabo un ensayo de bloqueo cruzado rutinario como el descrito en “Antibodies, A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and

David Lane (1988). Alternativamente, se puede llevar a cabo la cartografía del epítopo para evaluar si el anticuerpo se une al epítopo 2C4 de ErbB2 (p. ej., uno cualquiera o más restos de la región desde aproximadamente el resto 22 a aproximadamente el resto 584 de ErbB2, inclusive; véase las figuras 1A-B).

5 **[0080]** El “epítopo 4D5” es la región en el dominio extracelular de ErbB2 a la que se une el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463). Este epítopo está cerca del dominio transmembranario de ErbB2. Para cribar los anticuerpos que se unen al epítopo 4D5, se puede llevar a cabo un ensayo de bloqueo cruzado rutinario como el descrito en “Antibodies, A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, se puede llevar a cabo la cartografía del epítopo para evaluar si el anticuerpo se une al epítopo  
10 4D5 de ErbB2 (p. ej., uno cualquiera o más restos de la región desde aproximadamente el resto 529 a aproximadamente el resto 625 de ErbB2, inclusive; véase las figuras 1A-B).

**[0081]** El “epítopo 3H4” es la región en el dominio extracelular de ErbB2 a la que se une el anticuerpo 3H4. Este epítopo incluye los restos desde aproximadamente el 541 a aproximadamente el 599, inclusive, en la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de ErbB2; véase las figuras 1A-B. El “epítopo 7C2/7F3” es la región en el  
15 extremo N del dominio extracelular de ErbB2 a la que se unen los anticuerpos 7C2 y/o 7F3 (cada uno depositado con ATCC, véase más adelante). Para cribar los anticuerpos que se unen al epítopo 7C2/7F3, se puede llevar a cabo un ensayo de bloqueo cruzado rutinario como el descrito en “Antibodies, A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, se puede llevar a cabo la cartografía del  
20 epítopo para establecer si el anticuerpo se une al epítopo 7C2/7F3 en ErbB2 (p. ej., uno cualquiera o más de los restos de la región desde aproximadamente el resto 22 a aproximadamente el resto 53 de ErbB2; véase las figuras 1A-B).

**[0082]** “Mamífero” para los propósitos de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero,  
25 incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, de deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

**[0083]** Un tumor que es “sensible al tratamiento” muestra una mejora estadísticamente significativa en respuesta al  
tratamiento con el anticuerpo dirigido contra ErbB, cuando se compara con el no tratamiento o el tratamiento con  
30 placebo en un moldeo animal reconocido o un ensayo clínico humano, o que responde al tratamiento inicial con anticuerpos dirigidos contra ErbB, pero crece cuando el tratamiento continua.

**[0084]** Los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en las que el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico  
35 indeseado, tal como el desarrollo o propagación del cáncer. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluye, pero sin limitar, el alivio de los síntomas, la disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, que no empeora) de la enfermedad, retraso o ralentización de la evolución de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico, y remisión (sea parcial o total), sea detectable o indetectable. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia comparada con la supervivencia  
40 esperada si no se recibiera el tratamiento. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen la afección o trastorno así como aquellos propensos a tener la afección o trastorno, o aquellos en los que se va a prevenir la afección o trastorno.

**[0085]** Un “trastorno” es una afección que se beneficiaría del tratamiento de la presente invención. Esto incluye  
45 trastornos o afecciones crónicas y agudas, incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se van a tratar en el presente documento, incluyen tumores benignos y malignos; leucemias y tumores malignos linfoides, en particular cáncer de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreático, próstata o vejiga; trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrofágicos, epiteliales,  
50 estromales y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos. Un trastorno preferido para tratar de acuerdo con la presente invención es el tumor maligno.

**[0086]** La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco  
55 puede reducir el número de células tumorales; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerígenas en los órganos epiteliales; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerígenas existentes, puede ser citostático y/o  
60 citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, evaluando el tiempo de evolución de la enfermedad (TEE) y/o determinando la tasa de respuesta (TR).

**[0087]** Los términos “cáncer” y “cancerígeno” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento celular no regulado. Un “tumor” comprende una o más células  
65 cancerígenas. Los ejemplos de cáncer se incluyen, pero sin limitar, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y

leucemia o tumores malignos linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (p. ej., cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas ("CPCNP"), adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano así como cáncer de cabeza y cuello.

10

**[0088]** Un "cáncer que expresa ErbB" es uno que comprende células que tienen presente la proteína ErbB en su superficie celular. Un "cáncer que expresa ErbB" es uno que produce un nivel suficiente de ErbB en la superficie de sus células, de modo que un anticuerpo dirigido contra ErbB2 puede unirse al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer.

15

**[0089]** Un cáncer "caracterizado por la activación excesiva" de un receptor ErbB es uno en el que la extensión de la activación del receptor ErbB en las células cancerígenas supera significativamente el nivel de activación de ese receptor en células no cancerígenas del mismo tipo de tejido. Dicha activación excesiva puede ser resultado del exceso de expresión del receptor ErbB y/o de niveles mayores de los normales de un ligando de ErbB disponible para la activación del receptor ErbB en las células cancerígenas. Dicha activación excesiva puede producir y/o ser producida por el estado maligno de una célula cancerígena. En algunas realizaciones, el cáncer se someterá a un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si se está produciendo la amplificación y/o el exceso de expresión de un receptor ErbB que da como resultado la activación excesiva del receptor ErbB. Alternativamente, o adicionalmente, el cáncer se puede someter a un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si se está produciendo la amplificación y/o el exceso de expresión de un ligando de ErbB en el cáncer, al que se atribuye la activación excesiva del receptor. En un subconjunto de dichos cánceres, la activación excesiva del receptor puede ser resultado de una ruta estimuladora autocrina.

**[0090]** En una ruta estimuladora "autocrina", se produce la autoestimulación debido a que la célula cancerígena produce tanto un ligando de ErbB como su receptor ErbB cognado. Por ejemplo, el cáncer puede expresar o expresar en exceso el EGFR y también expresar o expresar en exceso un ligando del EGFR (p. ej., EGF, TGF- $\alpha$  o HB-EGF). En otra realización, el cáncer puede expresar o expresar en exceso ErbB2 y también expresar o expresar en exceso un heregulina (p. ej.,  $\gamma$ -HRG).

**[0091]** Un cáncer que "expresa en exceso" un receptor ErbB es uno que tiene niveles significativamente mayores de un receptor ErbB, tal como ErbB2, en su superficie celular, comparado con una célula no cancerígena del mismo tipo de tejido. Dicha expresión en exceso puede ser producida por la amplificación de genes o por la transcripción o traducción aumentadas. La expresión en exceso del receptor ErbB se puede determinar en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando los niveles mayores de la proteína ErbB presente en la superficie de una célula (p. ej., mediante un ensayo inmunohistoquímico; IHC). Alternativa o adicionalmente, se pueden medir los niveles del ácido nucleico que codifica ErbB en la célula, p. ej., por técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH; véase el documento WO 98/45479 publicado en octubre, 1998), transferencia southern, o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). El exceso de expresión del ligando de ErbB se puede determinar mediante diagnóstico por la evaluación de los niveles del ligando (o el ácido nucleico que lo codifica) en el paciente, p. ej., en una biopsia tumoral o por diferentes ensayos de diagnóstico tales como los ensayos de IHC, FISH, transferencia southern, PCR o ensayos in vivo descritos antes. También se puede estudiar la expresión en exceso del receptor ErbB midiendo el antígeno circulante (p. ej., dominio extracelular de ErbB) en un fluido biológico tal como el suero (véase, p. ej., patente de EE.UU. n° 4.933.294 concedida el 12 de junio, 1990; documento WO 91/05264 publicado el 18 de abril, 1991; patente de EE.UU. n° 5.401.638 concedida el 28 de marzo, 1995; y Sias y col., *J. Immunol. Methods*, 132: 73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, están disponibles otros ensayos in vivo diferentes para el experto en la materia. Por ejemplo, se puede exponer a las células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que opcionalmente está marcado con un marcador detectable, p. ej., un isótopo radiactivo, y se puede evaluar en el paciente la unión del anticuerpo a las células, p. ej., mediante escaneo externo de la radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente expuesto previamente al anticuerpo.

55

**[0092]** Los tumores que expresan en exceso HER2 se clasifican por puntuaciones inmunohistoquímicas que corresponden al número de copias de moléculas de HER2 expresadas por célula, y se pueden determinar de forma bioquímica: 0 = 0-10.000 copias/célula, 1+ = al menos aproximadamente 200.000 copias/célula, 2+ = al menos aproximadamente 500.000 copias/célula, 3+ = al menos aproximadamente 2.000.000 copias/célula. El exceso de expresión de HER2 en el nivel 3+, que conduce a la activación independiente del ligando de la tirosina quinasa (Hudziak y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7159-7163 [1987]), se produce en aproximadamente 30% de los cánceres de mama, y en estos pacientes disminuye la supervivencia sin recaídas y la supervivencia general (Slamon y col., *Science*, 244:707-712 [1989]; Slamon y col., *Science*, 235:177-182 [1987]).

**[0093]** A la inversa, un cáncer que "no se caracteriza por la expresión en exceso del receptor ErbB2" es uno que,

65

en un ensayo de diagnóstico, no expresa niveles mayores de los normales de receptor ErbB2 comparado con una célula no cancerígena del mismo tipo de tejido. Un cáncer "independiente de hormonas" es uno en el que su proliferación no depende de la presencia de una hormona que se une a un receptor expresado por las células en el cáncer. Dichos cánceres no sufren remisión clínica tras la administración de las estrategias farmacológicas o quirúrgicas que reducen la concentración hormonal en o cerca del tumor. Los ejemplos de cánceres independientes de hormonas incluyen el cáncer de próstata independiente de andrógenos, cáncer de mama, cáncer endometrial y cáncer de ovario independientes de estrógenos. Dichos cánceres pueden empezar como tumores dependientes de hormonas y evolucionar desde un estado sensible a las hormonas a un tumor refractario a las hormonas después de la terapia antihormonal.

10

**[0094]** La expresión "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o produce la destrucción de células. Se pretende que la expresión incluya isótopos radiactivos (p. ej., At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32 e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos.

15

**[0095]** Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™), sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocuaona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina, mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreuro del óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomicinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimidina, mitotano, trilostano; restablecedores de ácido fólico tales como ácido froilínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defosfamida; demecolcina; diazicuaona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan; lonidainina; mitoguanina; mitoxantrona; mopidanmol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxana; rizoxima; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuaona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, p. ej., paclitaxel (TAXOL®. Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), y docetaxel (TAXOTERE®; Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vonrelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; espermicinas; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. También están incluidos en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los tumores tales como antiestrógenos incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

**[0096]** Como se usa en el presente documento, la expresión "fármaco dirigido al EGFR" se refiere a un agente terapéutico que se une al EGFR y, opcionalmente, inhibe la activación del EGFR. Los ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen al EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen al EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, patente de EE.UU. nº 4.943.533, Mendelsohn y col.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano rediseñado (H225) (véase el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (patente de EE.UU. nº 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF (véase el documento WO 98/50433, Abgenix). El anticuerpo dirigido contra EGFR se puede conjugar con un agente citotóxico, generando así un inmunoconjugado (véase, p. ej., el documento EP 659.439A2, Merck Patent GmbH). Los ejemplos de moléculas pequeñas que se unen a EGFR incluyen ZD1839 o Gefitinib (IRESSA™; Astra Zeneca), CP-358774 (TARCEVA™; Genentech/OSI) y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen). Un "inhibidor de tirosina quinasa" es una molécula que

65

inhibe en cierta medida la actividad de tirosina quinasa de una tirosina quinasa tal como un receptor ErbB. Los ejemplos de dichos inhibidores incluyen los fármacos dirigidos al EGFR indicados en el párrafo precedente, así como las quinazolininas tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino)quinazolinina, piridopirimidinas, pirimidopirimidinas, pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706, y pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidinas, curcumina (diferuloilmetano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida), tirfostinas que contienen restos de nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas de sentido contrario (p. ej., las que se unen al ácido nucleico que codifica ErbB); quinoxalinas (patente de EE.UU. nº 5.804.396); trifostinas (patente de EE.UU. nº 5.804.396); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-ErbB tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de imatinib (Gleevec; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (GlaxoSmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxanib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: patente de EE.UU. nº 5.804.396; WO 99/09016 (American Cyanamid); WO 98/43960 (American Cyanamid); WO 97/38983 (Warner Lambert); WO 99/06378 (Warner Lambert); WO 99/06396 (Warner Lambert); WO 96/30347 (Pfizer, Inc); WO 96/33978 (Zeneca); WO 96/3397 (Zeneca); y WO 96/33980 (Zeneca).

15 **[0097]** Un agente “antiangiogénico” se refiere a un compuesto que bloquea, o interfiere en algún grado, el desarrollo de los vasos sanguíneos. El factor antiangiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o anticuerpo que se une a un factor de crecimiento o receptor de factor de crecimiento implicado en promover la angiogénesis. El factor antiangiogénico preferido en el presente documento es un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

25 **[0098]** El término “citoquina” es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan en otra célula como mediadores intracelulares. Los ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas están incluidas la hormona del crecimiento, tal como la hormona del crecimiento humana, N-metionil-hormona del crecimiento humana y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glicoproteicas tales como la hormona foliculoestimulante (FSH), hormona estimuladora de tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático, factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ ; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado con gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular, integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento de plaquetas, factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factor de crecimiento similar a insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , factores estimuladores de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF);

30 interleuquinas tales como IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ ; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando de kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de citoquinas de secuencia natural.

40 **[0099]** El término “profármaco” como se usa 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 comparada con el fármaco original y es capaz de ser activado enzimáticamente o convertirse en la forma original más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” Biochemical Society Transactions, 14, páginas 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella y col., “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery”, Directed Drug Delivery. Borchardt y col. (ed.), páginas 247-267. Humana Press (1985). Los profármacos incluyen, pero sin limitar, 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  $\beta$ -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, profármacos de 5-fluorocitosina y otros 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 de profármaco se incluyen, pero sin limitar, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

55 **[0100]** Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como los anticuerpos dirigidos contra ErbB2 descritos en el presente documento 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.

60 **[0101]** El término “prospecto” se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias relacionadas con el uso de dichos productos terapéuticos.

65 **[0102]** Un “cardioprotector” es un compuesto o composición que previene o reduce la disfunción miocárdica (es decir, la cardiomiopatía y/o insuficiencia cardíaca congestiva) asociada con la administración de un fármaco, tal como un antibiótico de antraciclina y/o un anticuerpo dirigido contra ErbB2, a un paciente. El cardioprotector puede,



por ejemplo, bloquear o reducir un efecto cardiotoxico mediado por radicales libres y/o prevenir o reducir el daño por estrés oxidativo. Los ejemplos de cardioprotectores abarcados por la presente definición incluyen el agente quelante de hierro dexrazoxano (ICRF-187) (Seifert y col., *The Annals of pharmacotherapy*, 28:1063-1072 (1994)); un agente reductor de lípidos y/o antioxidante tal como probucol (Singal y col., *J. Mol Cell Cardiol.*, 27:1055-1063 (1995));  
 5 amifostina (éster de 2-[(3-aminopropil)amino]etanotiol-dihidrogenofosfato de aminotiol, llamado también WR-2721, y la forma de absorción celular desfosforilada del mismo llamada WR-1065) y el ácido S-3-(3-metilaminopropilamino)propilfosforotioico (WR-151327), véase Green y col., *Cancer Research*, 54: 738-741 (1994); digoxina (Bristow, M.R. In: Bristow MR, ed. *Drug-Induced Heart Disease*. New York: Elsevier 191-215 (1980)); beta-bloqueadores tales como metoprolol (Hjalmarson y col., *Drugs* 47:Suppl 4:31-9 (1994); y Shaddy y col., *Am. Heart J.*,  
 10 129:197-9 (1995)); vitamina E; ácido ascórbico (vitamina C); depuradores de radicales libres tales como ácido oleanólico, ácido ursólico y N-acetilcisteína (NAC); compuestos atrapadores de espín tales como alfa-fenil-terc-butilnitrona (PBN); (Paracchini y col., *Anticancer Res.*, 13:1607-1612 (1993)); compuestos selenoorgánicos tales como P251 (Elbesen); y similares.

15 **[0103]** Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que normalmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada está en una forma o entorno distinto al que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye  
 20 una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el anticuerpo donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en un lugar cromosómico diferente del de las células naturales.

**[0104]** La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son  
 25 adecuadas para procariontes incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

**[0105]** Un ácido nucleico está "operativamente unido" cuando está situado en una relación funcional con otra  
 30 secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está operativamente unido al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está situado de forma que facilita la traducción. En general, "operativamente unido" significa que las secuencias de  
 35 ADN que se unen están contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante el ligado en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan los adaptadores o conectores oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

40 **[0106]** Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de forma intercambiable y todas las denominaciones incluyen la progenie. Así pues, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos derivados de la misma sin considerar el número de transferencias. También debe entenderse que toda la progenie no puede ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la progenie mutante que tiene la  
 45 misma función o actividad biológica cuando se hace el cribado en la célula originalmente transformada. Cuando se proponen designaciones diferentes, serán obvias a partir del contexto.

## **Procedimientos para identificar tumores que son sensibles al tratamiento con anticuerpos dirigidos contra HER2**

50

### **Fuentes de tumores y células tumorales**

**[0107]** Los tumores se pueden caracterizar como sensibles a la terapia con 2CA, basándose en la presencia de heterodímeros EGFR-ErbB2 y/o ErbB2-ErbB3 en la superficie celular, como una medida de la activación de HER2.  
 55 Se puede ensayar en las muestras tumorales la presencia de heterodímeros por cualquier procedimiento conocido en la materia. Preferiblemente, la presencia de heterodímeros se determina por uno o más de los procedimientos descritos a continuación.

**[0108]** Puesto que la activación de HER2 es el resultado de la heterodimerización y fosforilación del receptor, un  
 60 procedimiento particularmente importante para identificar tumores sensibles a la terapia con 2C4 es la detección de la fosforilación del receptor ErbB, tal como la fosforilación del receptor ErbB2 (HER2), como se describe a continuación.

**[0109]** Las fuentes de células tumorales que se pueden ensayar incluyen, pero sin limitar, biopsias de tumores,  
 65 células tumorales circulantes, proteínas plasmáticas circulantes, líquido ascítico, tumores xenotrasplantados y otros

modelos tumorales, y cultivos de células primarias o líneas celulares derivadas de tumores o que presentan propiedades de tipo tumoral, así como muestras tumorales conservadas, tales como muestras tumorales fijadas en formalina, insertadas en parafina. La selección de paneles de diferentes tipos de células tumorales para los heterodímeros EGFR-ErbB2 y/o ErbB2-BrbB3, y/o la fosforilación del receptor ErbB, está contemplada por la presente invención. Las células tumorales del mismo tipo que las células tumorales que dan positivo el ensayo de heterodímeros y/o la fosforilación del receptor ErbB, tal como el receptor ErbB2 (HER2), se pueden someter a terapia con 2C4. Los modelos tumorales descritos a continuación se proporcionan como ejemplos, y no deben considerarse limitantes de la invención.

10 **[0110]** Se puede ensayar la sensibilidad a la terapia con 2C4 de las células tumorales que provienen de un paciente que padece actualmente un tumor. Si se determina que las células son sensibles, basándose en la presencia de los heterodímeros HER2/HER3 y/o HBR2/HBR1 o demostrando la fosforilación del receptor ErbB, posteriormente se puede tratar al paciente con un anticuerpo con una o más de las características biológicas de 2C4. El paciente se trata con rhuMAb 2C4.

15 **[0111]** Se pueden ensayar en células tumorales de un tipo particular de tumor o células que se cree que tienen las características de un tipo particular de tumor, la presencia de heterodímeros EGFR-ErbB2 y/o ErbB2-BrbB3, o la fosforilación del receptor ErbB, preferiblemente el receptor ErbB2 (HER2). Si se detectan los heterodímeros EGFR-ErbB2 y/o ErbB2-BrbB3 y/o la fosforilación del receptor ErbB, se considera que el tipo de tumor es un candidato bueno para el tratamiento con rhuMAb 2C4. Los pacientes que padecen este tipo de tumor se pueden tratar entonces con dicho anticuerpo.

#### **Xenoinjertos de líneas celulares**

25 **[0112]** Las células tumorales propagadas in vitro, tales como células tumorales desarrolladas en cultivo y líneas de células tumorales, se pueden xenotrasplantar en ratones mediante el implante de células directamente en un sitio de interés. Dichos procedimientos son bien conocidos para el experto en la materia. Se ensayan las células para identificar la presencia de los heterodímeros EGFR-ErbB2 y/o ErbB2-BrbB3, o la fosforilación del receptor ErbB, tal como la fosforilación del receptor ErbB2 (HER2).

30 **[0113]** Las células tumorales se pueden implantar por vía subcutánea en un ratón, preferiblemente un ratón sin pelo atímico. Las células tumorales se pueden implantar en un lugar fisiológicamente relevante para crear un modelo tumoral in situ apropiado. Por ejemplo se pueden implantar células de una línea celular de cáncer de mama con diferentes concentraciones, en la almohadilla adiposa mamaria de ratones sin pelo atímicos, para tener un modelo más preciso de la biología del cáncer de mama. Se puede ensayar en las células tumorales la presencia de los heterodímeros EGFR-ErbB2 o ErbB2-BrbB3, o la fosforilación del receptor ErbB sea antes o después del implante. Preferiblemente, las células tumorales se ensayan después de que las células implantadas se han desarrollado en un tumor de un tamaño predeterminado. El ratón también se puede someter a terapia con 2C4 o un anticuerpo funcionalmente equivalente, sirviendo de control los ratones no tratados.

40 **[0114]** Se pueden establecer modelos similares para cualquier tipo de tumor a partir del cual se han obtenido células cultivadas o líneas celulares. Los tipos de tumores incluyen, pero sin limitar, vejiga, cerebro, mama, colon, esófago, riñón, leucemia, hígado, pulmón, melanoma, ovario, páncreas, próstata, sarcoma, estómago, testículo y útero. Las células tumorales o líneas celulares que expresan en exceso ErbB2 se usan para el implante, o se pueden usar para el implante células tumorales o líneas celulares que expresan cantidades normales o inferiores a las normales de ErbB2. Se pueden usar para el implante células tumorales o líneas celulares que no son sensibles a HERCEPTIN®.

50 **[0115]** Se pueden implantar aproximadamente 20 millones de células de tumor de mama MDA-175 en la almohadilla adiposa gonadal de ratón. Se determina la expresión de los dímeros HER2/HBR1 y/o HER2/HER3 en la superficie de las células xenotransplantadas, tal como por uno de los procedimientos descritos a continuación. Los ratones con el implante también se pueden someter a tratamiento con 0,3 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg o 100 mg/kg de 2C4. Otros regímenes de dosificación los puede determinar el experto en la materia.

55 **[0116]** Los tumores sólidos, tales como el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de próstata y cáncer colorrectal, son particularmente adecuados para el análisis y tratamiento.

#### **Xenoinjertos tumorales**

60 **[0117]** Se pueden obtener muestras de tumor de mamífero, preferiblemente muestras de tumor humano, e implantarlas en ratones, preferiblemente ratones sin pelo atímicos. Las muestras de tumor se pueden obtener por cualquier procedimiento conocido en la materia. Las muestras de tumor se pueden extirpar quirúrgicamente, tal como en una biopsia o en un procedimiento quirúrgico para eliminar el tumor del mamífero. La muestra de tumor se puede obtener purificando células tumorales circulantes de la sangre de mamíferos.

65

**[0118]** Se pueden implantar cortes de tumor humano sólido de aproximadamente 5x5x0,5 a 1 mm en los flancos de ratones sin pelo atímicos, en general cuatro fragmentos por ratón. Cuando los tumores implantados alcanzan un diámetro con una mediana de aproximadamente 10-15 mm se pueden someter a pases sucesivos, en general usando fragmentos de tumor más pequeños. Se describen procedimientos para generar y estudiar xenoinjertos de tumor humano en las siguientes referencias: Fiebig y col., "Human Tumor Xenografts: Predictivity, Characterization and Discovery of New Anticancer Agents," en Contributions to Oncology: Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development, Fiebig & Burger, eds. (Basel, Karger, 1999), vol. 54, pág. 29-50; Berger y col., "Establishment and Characterization of Human Tumor Xenografts in Thymus-Aplastic Nude Mice," en Immunodeficient Mice in Oncology, Fiebig & Berger, eds. (Basel, Karger 1992), pág. 23-46; Fiebig & Burger, "Human Tumor Xenografts and Explants," en Models in Cancer Research Teicher, ed. (Humana Press 2002) pág. 113-137.

**[0119]** Los xenoinjertos humanos se consideran muy predictivos del comportamiento tumoral en el paciente donante, ya que el xenoinjerto crece como un tumor sólido, se diferencia y desarrolla un estroma, vasculatura y una necrosis central. En la mayoría de los casos, los xenoinjertos retienen la mayor parte de las características moleculares, histológicas y fisiopatológicas del tumor recién obtenido del paciente. En las células tumorales de ratones que contienen tumores de primer pase o de pases sucesivos, se puede analizar la presencia de heterodímeros EGFR-ErbB2 y/o ErbB2-ErbB3, o la fosforilación del receptor ErbB. Los ratones también se pueden someter a terapia con 2C4 o un anticuerpo funcionalmente equivalente.

**[0120]** Se puede cribar en un panel establecido o de nueva creación, la presencia de heterodímeros EGFR-ErbB2 y/o ErbB2-ErbB3, o la fosforilación del receptor ErbB. Fiebig y Burger, véase antes, describen un panel de alrededor de más de 300 xenoinjertos de tumores humanos establecidos de una variedad de tipos de cáncer comunes, tales como de vejiga, cerebro, mama, colon, esófago, riñón, leucemia, hígado, pulmón, melanoma, ovario, páncreas, próstata, sarcoma, estómago, testículo y útero. Se pueden cribar en el panel entero los heterodímeros o la fosforilación del receptor ErbB, tal como el receptor ErbB2 (HER2). También se pueden cribar los heterodímeros o la fosforilación del receptor ErbB en subconjuntos de este panel, en los que los subconjuntos se basan, por ejemplo, en el tipo de tejido, la expresión superior, inferior o normal de ErbB2, o el fracaso en la respuesta a HERCEPTIN®. De esta forma los tumores se pueden clasificar como candidatos para la terapia con 2C4 basándose en la presencia de heterodímeros, o demostrando la fosforilación del receptor ErbB, tal como el receptor ErbB2 (HER2). De la misma forma, los pacientes que tienen tumores clasificados de esta forma se pueden considerar más rápidamente elegibles para la terapia con 2C4 o un anticuerpo funcionalmente equivalente.

**[0121]** En las muestras tumorales se puede ensayar la presencia de los heterodímeros EGFR-ErbB2 o ErbB2-ErbB3, o la fosforilación del receptor ErbB antes o después del implante. Aproximadamente 1 gramo de tumor de un xenoinjerto de primer pase y/o de pases sucesivos, se puede caracterizar además molecularmente la presencia de heterodímeros, o se puede congelar instantáneamente en nitrógeno líquido y conservar a -80°C para la posterior caracterización. Los tumores de xenoinjertos se pueden analizar además mediante un ensayo de doble capa de agar blando, llamado también un ensayo clonogénico, como describen, por ejemplo Fiebig y Burger, véase antes. Los xenoinjertos de tumores humanos sólidos se desagregan mecánica y proteolíticamente en una suspensión de una sola célula, que se cultiva en placas de multipocillos estratificados con agar blanco, como se describe. El crecimiento de las células tumorales in vitro conduce a la formación de colonias, en las que se puede analizar además las características moleculares, tales como los heterodímeros o la fosforilación del receptor ErbB, u otras características histoquímicas o morfológicas.

#### **45 B. Detección de los heterodímeros EGFR-ErbB2 y ErbB2-ErbB3**

**[0122]** Se puede usar cualquier procedimiento conocido en la técnica para detectar los heterodímeros EGFR-ErbB2 o ErbB2-ErbB3 en tumores. A continuación se describen varios procedimientos preferidos. Estos procedimientos detectan interacciones proteína-proteína no covalentes o indican de otra forma la proximidad entre las proteínas de interés. Estos procedimientos descritos a continuación se proporcionan como ejemplos, y no deben considerarse como limitantes de la invención.

#### **Coinmunoprecipitación e inmunotransferencia**

**[0123]** Se pueden usar procedimientos basados en inmutafinidad, tales como inmunoprecipitación o ELISA, para detectar los heterodímeros EGFR-ErbB2 o ErbB2-ErbB3. Se pueden usar anticuerpos dirigidos contra ErbB2 para la inmunoprecipitación de complejos que comprenden ErbB2 de células tumorales, y después, se examina en el inmunoprecipitado resultante la presencia de EGFR o ErbB3 mediante inmunotransferencia. Los anticuerpos contra EGFR o ErbB3 se pueden usar para la etapa de inmunoprecipitación, y después examinar el inmunoprecipitado con anticuerpos contra ErbB2. Se pueden usar ligandos específicos de ErbB para los complejos de HBR1, HER3, HER2/HER1 o complejos de HER2/HER3 para precipitar los complejos, en los que después se examina la presencia de HER2. Por ejemplo, los ligandos se pueden conjugar con avidina y purificar los complejos en una columna de biotina.

**[0124]** En otros ensayos tales como en ELISA o ensayos de tipo sándwich de anticuerpos, se inmovilizan

anticuerpos contra ErbB2 sobre un soporte sólido, se ponen en contacto con células tumorales o lisato de células tumorales, se lavan y después se exponen al anticuerpo contra EGFR o ErbB3. La unión de este último anticuerpo, que se puede detectar directamente o por un anticuerpo secundario conjugado con un marcador detectable, indica la presencia de heterodímeros. Se puede inmovilizar el anticuerpo contra EGFR o ErbB3, y el anticuerpo contra ErbB2 se usa para la etapa de detección. Los ligandos del receptor ErbB se pueden usar en lugar de, o en combinación con anticuerpos dirigidos contra el receptor ErbB.

**[0125]** A la inmunoprecipitación con el anticuerpo contra EGFR, ErbB2 o ErbB3 le puede seguir un ensayo funcional de los heterodímeros, como una alternativa o complemento a la inmunotransferencia. A la inmunoprecipitación con el anticuerpo contra ErbB3 le puede seguir un ensayo de la actividad de receptor de tirosina quinasa en el inmunoprecipitado. Debido a que ErbB3 no tiene actividad intrínseca de tirosina quinasa, la presencia de actividad de tirosina quinasa en el inmunoprecipitado indica que lo más probable es que ErbB3 esté asociado con ErbB2. Graus-Porta y col., *EMBO J.*, 16:1647-55 (1997); Klapper y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 4995-5000 (1999). Este resultado se puede confirmar por inmunotransferencia con anticuerpos contra ErbB2. A la inmunoprecipitación con el anticuerpo contra ErbB2 le puede seguir un ensayo de la actividad de receptor de tirosina quinasa del EGFR. En este ensayo, el inmunoprecipitado se pone en contacto con ATP radiactivo y un sustrato peptídico que imita el sitio in vivo de transfosforilación de ErbB2 por EGFR. La fosforilación del péptido indica la coimmunoprecipitación y por lo tanto la heterodimerización de EGFR con ErbB2. Los ensayos de la actividad de receptor de tirosina quinasa son bien conocidos en la materia e incluyen ensayos para detectar la fosforilación de sustratos diana, por ejemplo, por anticuerpos contra fosfotirosina, y activación de las rutas de transducción de señales cognadas, tales como la ruta de MAPK.

**[0126]** Las variaciones de los procedimientos y ensayos anteriores serán fácilmente evidentes y rutinarias para el experto en la materia.

**[0127]** También se puede usar la reticulación química o UV para unir los heterodímeros covalentemente en la superficie de las células vivas. Hunter y col., *Biochem. J.*, 320:847-53. Los ejemplos de reticuladores químicos incluyen propionato de ditiobis(succinimidilo) (DSP) y propionato de 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilo) (DTSSP). Los extractos celulares de células tumorales reticuladas químicamente se pueden analizar por SDS-PAGE e inmunotransferir con anticuerpos contra EGFR y/o ErbB3. Una banda en el ensayo en gel Super Shift del peso molecular adecuado representa lo más probablemente heterodímeros EGFR-ErbB2 o ErbB2-ErbB3, ya que ErbB2 es la pareja de heterodimerización preferida para EGFR y ErbB3. Este resultado se puede confirmar por la posterior inmunotransferencia con anticuerpos contra ErbB2.

### 35 Procedimientos basados en fluorescencia y FRET

**[0128]** La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) también se puede usar para detectar los heterodímeros EGFR-ErbB2 o ErbB2-ErbB3. Con FRET se detectan los cambios conformacionales de la proteína y las interacciones proteína-proteína in vivo e in vitro, basándose en la transferencia de energía de un fluoróforo donador a un fluoróforo aceptor. Selvin, *Nat. Struct. Biol.*, 7:730-34 (2000). La transferencia de energía solo tiene lugar si el fluoróforo donador está suficientemente cerca del fluoróforo aceptor. En un experimento de FRET típico, dos proteínas o dos sitios en una sola proteína se marcan con diferentes sondas fluorescentes. Una de las sondas, la sonda donadora, se excita a un estado de energía superior mediante luz incidente a una longitud de onda especificada. Después, la sonda donadora transmite su energía a la segunda sonda, la sonda aceptora, dando como resultado una reducción de la intensidad de la fluorescencia del donador y un aumento de la emisión de fluorescencia del aceptor. Para medir el grado de transferencia de energía, la intensidad del donador en una muestra marcada con sondas donadoras yceptoras, se compara con su intensidad en una muestra marcada solo con la sonda donadora. Opcionalmente, la intensidad del aceptor se compara con muestras de donador/aceptor y aceptor solo. Se conocen sondas adecuadas en la materia e incluyen, por ejemplo, colorantes permanentes de membrana, tales como fluoresceína o rodamina, colorantes orgánicos tales como colorantes de cianina, y átomos lantánidos. Selvin, véase antes. Los procedimientos y la instrumentación para detectar y medir la transferencia de energía también se conocen en la materia. Selvin, véase antes.

**[0129]** Las técnicas basadas en FRET adecuadas para detectar y medir las interacciones proteína-proteína en células individuales son conocidas en la materia. Por ejemplo, se pueden usar la microscopía de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia tras fotoblanqueo (pbFRET) y microscopía de visualización de vida media de fluorescencia (FLIM) del donador, para detectar la dimerización de los receptores de la superficie celular. Selvin, véase antes; Gadella & Jovin, *J. Cell Biol.*, 129:1543-58 (1995). pbFRET se puede usar en células "en suspensión" o "in situ" para detectar y medir la formación de heterodímeros EGFR-ErbB2 o ErbB2-ErbB3, como describen Nagy y col., *Cytometry*, 32:120-131 (1998). Estas técnicas miden la reducción de la vida media de la fluorescencia del donador debido a la transferencia de energía.

**[0130]** Se puede usar una técnica de FRET de tipo Foerster y citometría de flujo (FCET) para investigar la heterodimerización de EGFR-ErbB2 y ErbB2-ErbB3, como describen Nagy y col., véase antes, y Brockhoff y col., *Cytometry*, 44:338-48 (2001).

**[0131]** La técnica FRET se usa preferiblemente junto con las técnicas convencionales de marcaje inmunohistoquímicas. Kenworthy, *Methods*, 24:289-96 (2001). Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos conjugados con colorantes fluorescentes adecuados como sondas para el marcaje de dos proteínas diferentes. Si las proteínas están próximas una a otra, los colorantes fluorescentes actúan como donadores y aceptores para la FRET. La transferencia de energía se detecta por medios convencionales. La transferencia de energía se puede detectar por medio de citometría de flujo o por sistemas de microscopía digital, tales como microscopía confocal o microscopía de fluorescencia de campo amplio acoplada con una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD).

**[0132]** Los anticuerpos contra ErbB2 y los anticuerpos contra EGFR o ErbB3 se pueden marcar directamente con dos fluoróforos diferentes, por ejemplo, como describen Nagy y col., véase antes. Las células tumorales o lisatos de células tumorales se ponen en contacto con los anticuerpos diferentemente marcados, que actúan como donadores y aceptores para FRET en presencia de los heterodímeros EGFR-ErbB2 o ErbB2-ErbB3. Alternativamente, los anticuerpos no marcados contra ErbB2 y EGFR o ErbB3 se usan junto con anticuerpos secundarios diferentemente marcados que sirven como donadores y aceptores. Véase, por ejemplo, Brockhoff y col., véase antes. Se detecta la transferencia de energía y se determina la presencia de heterodímeros si se encuentra que los marcadores están muy próximos.

**[0133]** Los ligandos de receptores ErbB que son específicos para HER2 y HER1 HER3, se pueden marcar con marcadores fluorescentes y usar para los estudios de FRET.

**[0134]** La presencia de heterodímeros en la superficie de las células tumorales se demuestra mediante la localización conjunta de ErbB2 con EGFR o ErbB3 usando técnicas convencionales de inmunofluorescencia directa o indirecta y microscopía de barrido láser confocal. Alternativamente, se usan las imágenes de barrido láser (LSI) para detectar la unión del anticuerpo y la localización conjunta de ErbB2 con EGFR o ErbB3 en un formato de alto rendimiento, tal como una placa de micropocillos, como describen Zuck et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:11122-27 (1999).

**[0135]** La presencia de heterodímeros EGFR-ErbB2 y/o ErbB2-ErbB3 se puede determinar identificando la actividad enzimática que depende de la proximidad de los componentes del heterodímero. Se conjuga un anticuerpo contra ErbB2 con una enzima y se conjuga un anticuerpo contra EGFR o ErbB3 con una segunda enzima. Se añade un primer sustrato para la primera enzima y la reacción produce un segundo sustrato para la segunda enzima. Esto conduce a una reacción con otra molécula para producir un compuesto detectable, tal como un colorante. La presencia de otro producto químico rompe el segundo sustrato, de modo que previene la reacción con la segunda enzima salvo que la primera y la segunda enzimas, y por lo tanto los dos anticuerpos, estén muy próximos. Las células tumorales o lisatos celulares se pueden poner en contacto con un anticuerpo contra ErbB2 que está conjugado con glucosa oxidasa y un anticuerpo contra ErbB3 o ErbB1 que está conjugado con peroxidasa de rábano picante. Se añade glucosa a la reacción, junto con un precursor del colorante, tal como DAB, y catalasa. La presencia de los heterodímeros se determina mediante el desarrollo de color tras la tinción por DAB.

#### 40 **Sistema de ensayo eTag™**

**[0136]** Los heterodímeros se pueden detectar usando procedimientos basados en el sistema de ensayo eTag™ (Aclara Bio Sciences, Mountain View, CA), como se describe, por ejemplo, en el documento WO 83502 y en la solicitud de patente de EE.UU. 2001/0049105, publicada el 6 de diciembre, 2001.

**[0137]** Un eTag™ o "marcador electroforético", comprende un resto indicador detectable, tal como un grupo fluorescente. También puede comprender un "modificador de la movilidad", que consiste esencialmente en un resto que tiene una movilidad electroforética única. Estos restos permiten la separación y la detección del eTag™ de una mezcla compleja en condiciones electroforéticas definidas, tal como por electroforesis capilar (CE). La parte del eTag™ que contiene el resto indicador, y opcionalmente, el modificador de la movilidad, está conectado a un primer resto de unión a la diana mediante un grupo conector escindible para producir un primer compuesto de unión. El primer resto de unión a la diana reconoce específicamente una primera diana particular, tal como un ácido nucleico o proteína. El primer resto de unión a la diana no está limitado de ninguna forma, y puede ser, por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido. Preferiblemente, el primer resto de unión a la diana es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Alternativamente, el primer resto de unión a la diana puede ser un ligando de receptores ErbB o un fragmento del mismo competente para la unión.

**[0138]** El grupo conector preferiblemente comprende un resto escindible, tal como un sustrato de enzima, o cualquier enlace químico que se puede escindir en condiciones definidas. Cuando el primer resto de unión a la diana se une a su diana, se introduce y/o activa el agente de escisión, y el grupo conector se escinde, liberando así la parte del eTag™ que contiene el resto indicador y el modificador de la movilidad. Por lo tanto, la presencia de un eTag™ "libre" indica la unión del resto de unión a la diana a su diana.

**[0139]** Preferiblemente, un segundo compuesto de unión comprende el agente de escisión y un segundo resto de unión a la diana que reconoce específicamente una segunda diana. El segundo resto de unión a la diana tampoco está limitado de ninguna forma y puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o un ligando de receptores ErbB o un fragmento de ligando competente para la unión. El agente de escisión es tal que solo escindirá el grupo conector en el primer compuesto de unión si el primer compuesto de unión y el segundo compuesto de unión están muy cerca.

**[0140]** Un primer compuesto de unión puede comprender un eTag<sup>TM</sup> en el que un anticuerpo contra ErbB2 sirve como el primer resto de unión a la diana. Un segundo compuesto de unión puede comprender un anticuerpo contra EGFR o ErbB3 unido a un agente de escisión capaz de escindir el grupo conector del eTag<sup>TM</sup>. Preferiblemente, el agente de escisión debe ser activado con el fin de poder escindir el grupo conector. Las células tumorales o lisatos de células tumorales se ponen en contacto con el eTag<sup>TM</sup>, que se une a ErbB2, y con el anticuerpo contra EGFR o ErbB3 modificado, que se une a EGFR o ErbB3 en la superficie celular. Preferiblemente se separa el compuesto de unión no unido, y si es necesario, se activa el agente de escisión. Si los heterodímeros EGFR-ErbB2 o ErbB2-ErbB3 están presentes, el agente de escisión escindirá el grupo conector y liberará el eTag<sup>TM</sup> debido a la proximidad del agente de escisión al grupo conector. El eTag<sup>TM</sup> libre se puede entonces detectar por cualquier procedimiento conocido en la materia, tal como por electroforesis capilar.

**[0141]** El agente de escisión puede ser una especie química activable que actúe en el grupo conector. Por ejemplo, el agente de escisión puede ser activado por exposición de la muestra a la luz.

**[0142]** El eTag<sup>TM</sup> se puede construir usando un anticuerpo contra EGFR o ErbB3 como el primer resto de unión a la diana, y el segundo compuesto de unión se construye a partir de un anticuerpo contra ErbB2.

#### **Detección de la fosforilación del receptor ErbB**

**[0143]** La presencia de la fosforilación del receptor ErbB se puede usar para demostrar la activación de HER2.

**[0144]** La fosforilación del receptor ErbB se puede evaluar por inmunoprecipitación de uno o más receptores ErbB, tal como el receptor ErbB2 (HER2), y por análisis de transferencia Western. Por ejemplo, se determina que es positiva, por la presencia de una banda de fosfo-HER2 en el gel, usando un anticuerpo dirigido contra la fosfotirosina para detectar el o los restos de tirosina fosforilados en el o los receptores ErbB inmunoprecipitados. Los anticuerpos dirigidos contra la fosfotirosina están disponibles en el mercado en PanVera (Madison, WI), una filial de Invitrogen, Chemicon International Inc. (Temecula, CA), o Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Se determina que es negativa por la ausencia de la banda.

**[0145]** La fosforilación del receptor ErbB2 (HER2) se puede evaluar por inmunohistoquímica usando un anticuerpo dirigido contra HER2 fosfoespecífico (clone PN2A; Thor y col., *J. Clin. Oncol.*, 18(18):3230-3239 (2000)).

**[0146]** Otros procedimientos para detectar la fosforilación del o de los receptores ErbB incluyen, pero sin limitar, KIRA ELISA (patentes de EE.UU. nº 5.766.863; 5.891.650; 5.914.237; 6.025.145; y 6.287.784), espectrometría de masas (que compara el tamaño de HER2 fosforilado y no fosforilado), y ensayo de proximidad de marcador electroforético con anticuerpo dirigido contra HER2 (p. ej., usando el kit de ensayo de eTag<sup>TM</sup> disponible en Aclara BioSciences (Mountain View, CA). Se describen detalles del ensayo con eTag<sup>TM</sup> en lo que antecede.

#### **Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes**

**[0147]** En el presente documento se describen el ácido nucleico aislado que codifica los vectores de rhu MAb 2C4, el anticuerpo dirigido contra ErbB2 humanizado, y células huésped que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo. Para la producción recombinante de un anticuerpo, se aísla el ácido nucleico que lo codifica y se inserta en un vector que se puede replicar para la posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector en general incluyen, pero sin limitar, 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 la transcripción.

#### **60 Componente secuencia señal**

**[0148]** El rhu MAb 2C4 se puede producir de forma recombinante no solo directamente, sino también como polipéptidos de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o polipéptido. La secuencia señal heteróloga seleccionada, preferiblemente es una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una señal

peptidasa) por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen ni procesan la secuencia señal del anticuerpo dirigido contra ErbB2 natural, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de fosfatasa alcalina, penicilasa, lpp, o secuencias líder de la enterotoxina II térmicamente estables. Para la secreción de levaduras, la secuencia señal natural se puede sustituir, p. ej., por la secuencia líder de invertasa de levadura, secuencia líder de factor  $\alpha$  (incluyendo secuencias líder de factor  $\alpha$  de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o secuencia líder de fosfatasa ácida, la secuencia líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión en células de mamífero, están disponibles las secuencias señal de mamíferos así como las secuencias líder secretoras víricas, por ejemplo, la señal gD de herpes simplex.

**[0149]** El ADN para dichas regiones precursoras está ligado en el marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo dirigido contra ErbB2.

#### *Componente origen de replicación*

Tanto los vectores de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. En general, en los vectores de clonación esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativas, el origen de replicación del plásmido 2 $\mu$  es adecuado para levaduras, y diferentes orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamífero. En general, el componente origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 se puede usar típicamente solo porque contiene el promotor temprano).

#### *Componente gen de selección*

Los vectores de expresión y de clonación pueden contener un gen de selección, denominado también un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p. ej., ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, p. ej., el gen que codifica la D-alanina racemasa para bacilos.

Un ejemplo de un esquema de selección usa un fármaco que detiene el crecimiento de una célula huésped. Estas células que son transformadas satisfactoriamente con un gen heterólogo, producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por lo tanto sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero, son aquellos que permiten la identificación de células competentes para absorber el ácido nucleico del anticuerpo dirigido contra ErbB2, tales como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferiblemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con los genes de selección de DHFR se identifican primero mediante cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped adecuada cuando se usa la DHFR natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en la actividad de DHFR.

Alternativamente, se pueden seleccionar células huésped (en particular, huéspedes naturales que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican el anticuerpo dirigido contra ErbB2, la proteína DHFR natural y otro marcador seleccionable tal como la aminoglicosido 3'-fosfotransferasa (APH), por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicosídico, p. ej., kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE.UU. nº 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para usar es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb y col., *Nature*, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC Nº 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). La presencia de *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura, proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. Igualmente, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) son complementadas por plásmidos conocidos que llevan el gen *Leu2*.

Además, los vectores derivados del plásmido circular de 1,6  $\mu$ m pKD1 se pueden usar para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, se ha publicado un sistema de expresión para la

producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante por *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). También se han descrito vectores de expresión estables de múltiples copias para la secreción de albúmina de suero humana recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleeer y col., *Bio/ Technology*, 9:968-975 (1991).

5

#### Componente promotor

**[0158]** Los vectores de expresión y de clonación normalmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operativamente unido al ácido nucleico del anticuerpo dirigido contra ErbB2. Los promotores adecuados para usar con huéspedes procariotas incluyen el promotor *phoA*, sistemas promotores de  $\beta$ -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 usar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente unida al ADN que codifica el anticuerpo dirigido contra ErbB2.

15

**[0159]** Son conocidas las secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT situada aproximadamente 25 a 30 bases en la dirección 5' desde el sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra 70 a 80 bases en la dirección 5' desde el comienzo 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 los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

20

**[0160]** Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para usar con huéspedes levaduras incluyen los promotores para las enzimas 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, 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.

25

**[0161]** Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables del uso de la maltosa y galactosa. Se describen más vectores y promotores adecuados para usar en la expresión en levaduras en el documento EP 73.657. Los potenciadores de levaduras también se usan ventajosamente con promotores de levaduras.

30

**[0162]** La transcripción del anticuerpo dirigido contra ErbB2 a partir de vectores en células huésped de mamífero, es controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus de polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y más preferiblemente el virus de simio 40 (SV40), de los promotores de mamífero heterólogos, p. ej., el promotor de acción o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células huésped.

40

**[0163]** Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen de forma conveniente como un fragmento de restricción de SV40 que contiene también el origen de replicación vírico de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene de forma conveniente como un fragmento de restricción HindIII E. Se describe un sistema para expresar el ADN en huéspedes mamíferos usando el virus del papiloma bovino como vector, en la patente de EE.UU. nº 4.419.446. Se describe una modificación de este sistema en la patente de EE.UU. nº 4.601.978. Véase también, Reyes y col., *Nature*, 297:598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc de  $\beta$ -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa de virus del herpes simple. Alternativamente, se puede usar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, como promotor.

50

#### Componente elemento potenciador

**[0164]** La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo dirigido contra ErbB2 de esta invención por eucariotas superiores, a menudo se aumenta mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Sin embargo, normalmente se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del papiloma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también, Yaniv, *Nature*, 297:17-18 (1982) sobre los elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede empalmar en el vector en una posición 5' o 3' respecto a la secuencia que codifica el anticuerpo dirigido contra ErbB2, pero preferiblemente está situado en un

65



sitio 5' respecto al promotor.

*Componente de terminación de la transcripción*

5 **[0165]** Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (células de levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están normalmente disponibles de las regiones 5', y ocasionalmente 3', no traducidas, de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos de poliadenilados en la parte no  
10 traducida del ARNm que codifica el anticuerpo dirigido contra ErbB2. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión descrito en el mismo.

*Selección y transformación de células huésped*

15 **[0166]** Las células huésped adecuadas para la clonación y expresión del ADN en los vectores en el presente documento, son las células procariotas, de levaduras o eucariotas superiores descritas antes. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo enterobacteriáceas tales como *Escherichia*, p. ej., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*,  
20 *Salmonella*, p. ej., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, p. ej., *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como bacilos, tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (p. ej., *B. licheniformis* 41P descrito en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537, y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes.

25 **[0167]** Además de los procariotas, son huéspedes adecuados para la clonación o expresión para vectores que codifican el anticuerpo dirigido contra ErbB2, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de panadería común, son los usados más habitualmente entre los microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. Sin embargo, hay una serie de otros géneros, especies y cepas  
30 que están normalmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes *Kluyveromyces* tales como, p. ej., *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y  
35 hongos filamentosos tales como, p. ej., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

**[0168]** Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo dirigido contra ErbB2 glicosilado se obtienen de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas y de  
40 insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células de insecto permisivas de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (caterpillar), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (fruitfly), y *Bombyx mori*. Está disponible al público una variedad de cepas víricas para la transfección, p. ej., la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden usar como el virus del presente documento de acuerdo con la presente  
45 invención, en particular para la transfección de *Spodoptera frugiperda*.

**[0169]** También se pueden usar como huéspedes los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

50 **[0170]** Sin embargo, el mayor interés ha sido el de las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas celulares huéspedes de mamífero útiles son la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., *J. Gen. Viral.*, 36:59 (1977)); células de riñón de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL  
55 10); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. URSA*, 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 de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); 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 y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

**[0171]** Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos antes para la producción del anticuerpo dirigido contra ErbB2, y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea  
60 adecuado para la inducción de promotores, selección de transformantes o amplificación de genes que codifican las

secuencias deseadas.

#### *Cultivo de las células huésped*

5 **[0172]** Las células huésped usadas para producir el anticuerpo dirigido contra ErbB2 de esta invención se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios disponibles en el mercado, tales como medio Ham F10 (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma), son adecuados para el cultivo de células huésped. Además, se puede usar cualquier de los medios descritos en Ham y col., *Meth. Enz.*, 58:44 (1979), Barnes y col., *Anal. Biochem.*, 102:255 (1980), patentes de  
 10 EE.UU. n° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195; o patente de EE.UU. Re. 30.985, como medio de cultivo para las células huésped. Cualquier de estos medios se puede complementar, según sea necesario, con hormonas y/o factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN®),  
 15 oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente en concentraciones finales en el intervalo de micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir cualesquiera otros complementos necesarios en las concentraciones adecuadas, que serán conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones, tales como la temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la células huésped seleccionadas para la expresión, y serán evidentes para el experto en la materia.

20

#### *Purificación de un anticuerpo dirigido contra ErbB2*

**[0173]** Cuando se usan técnicas recombinantes, se pueden producir anticuerpos de forma intracelular, en el espacio periplasmático, o segregar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular,  
 25 como primera etapa, se separan los restos en partículas, sean células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter y col., *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son segregados al espacio periplasmático de *E. coli*. En resumen, se descongela la pasta celular en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a lo largo de aproximadamente 30 min. Los restos celulares se pueden separar por centrifugación. Cuando el anticuerpo es  
 30 segregado al medio, los líquidos sobrenadantes de dichos sistemas de expresión, en general, primero se concentran usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración 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 prevenir el crecimiento de contaminantes inesperados.

35

**[0174]** La composición del anticuerpo preparada a partir de las células, se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La  
 40 proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  o  $\gamma 4$  humanas (Lindmark y col., *J. Immunol. Meth.*, 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para el  $\gamma 3$  humano (Guss y col., *EMBO J.*, 5:15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es los más frecuente de agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices estables mecánicamente tales como el vidrio de poro controlado o el poli(estirenodivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que lo que se puede lograr con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio  
 45 CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. También están disponibles otras técnicas de purificación de proteínas tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía en SEPHAROSE™ o una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de  
 50 poli(ácido aspártico)), cromatografía, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato amónico, dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

**[0175]** Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes, se puede someter a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un  
 55 tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferiblemente realizada con concentraciones de sal bajas (p. ej., sal en aproximadamente 0-0,025 M).

#### **Formulaciones farmacéuticas**

60 **[0176]** Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo usado de acuerdo con la presente invención se preparan para el almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones usadas, e  
 65 incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y

metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil-parabenes tales como metil o propil-parabén; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulina; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trealosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones liofilizadas del anticuerpo dirigido contra ErbB2 preferidas se describen en el documento WO 97/04801.

**[0177]** La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo, según sea necesario, para la indicación particular que se va a tratar, preferiblemente, aquellos con actividades complementarias que no se afectan entre sí de forma adversa. Por ejemplo, puede ser conveniente proporcionar además anticuerpos que se unen a EGFR, ErbB2 (p. ej., un anticuerpo que se une a un epítipo diferente en ErbB2), ErbB3, ErbB4, o factor endotelial vascular (VEGF) en una formulación. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal, fármaco dirigido al EGFR, agente antiangiogénico y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación y en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

**[0178]** Los principios activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (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).

**[0179]** Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, p. ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxi-etilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de  $\gamma$ -etilo, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli-(ácido D-(-)-3-hidroxi-butírico).

**[0180]** Las formulaciones que se van a usar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

#### Tratamiento con anticuerpos dirigidos contra ErbB2

**[0181]** Se contempla que el anticuerpo dirigido contra ErbB2, el rhuMab2C4, se usa para tratar el cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, incluyendo cáncer de ovario avanzado, refractario o recurrente, y cáncer de próstata.

**[0182]** El cáncer, en general, comprenderá células que expresan ErbB2, de modo que el anticuerpo dirigido contra ErbB2 del presente documento sea capaz de unirse al cáncer. Aunque el cáncer se puede caracterizar por el exceso de expresión del receptor ErbB2, la presente solicitud proporciona además el tratamiento del cáncer que no se considera que sea un cáncer que expresa en exceso ErbB2. Para determinar la expresión de ErbB2 en el cáncer, están disponibles diferentes ensayos de diagnóstico/pronóstico. El exceso de expresión de ErbB2 se puede analizar por IHC, p. ej., usando el HERCEPTEST® (Dako). Las secciones de tejido insertadas en parafina de una biopsia de tumor, se pueden someter al ensayo de IHC de acuerdo con un criterio de intensidad de tinción de la proteína ErbB2 como sigue:

Puntuación 0

No se observa tinción o se observa tinción de las membranas en menos de 10% de las células tumorales.

Puntuación +1

Se detecta una tinción de las membranas débil/poco perceptible en más de 10% de las células tumorales. Las células se tiñen sólo en parte de su membrana.

Puntuación +2

Se observa una tinción de las membranas completas de débil a moderada en más de 10% de las células tumorales.

Puntuación +3

Se observa una tinción de las membranas completas de moderada a fuerte en más de 10% de las células tumorales.

**[0183]** Los tumores con puntuaciones 0 o +1 en la evaluación del exceso de expresión de ErbB2 se pueden caracterizar como que no expresan en exceso ErbB2, mientras que los tumores con puntuaciones 2+ o 3+ se pueden caracterizar como que expresan en exceso ErbB2.

5 **[0184]** Alternativamente, o adicionalmente, se pueden llevar a cabo ensayos de FISH tales como INFORM™ (vendido por Ventana, Arizona) o PATHVISION™ (Vysis, Illinois) en tejido tumoral insertado en parafina, fijado en formalina, para determinar la extensión (si la hay) del exceso de expresión de ErbB2 en el tumor.

10 **[0185]** En una realización, el cáncer será uno que expresa (y puede, pero no tiene que, expresar en exceso) el EGFR.

**[0186]** El cáncer que se va a tratar en el presente documento, puede ser uno caracterizado por la activación excesiva de un receptor ErbB, p. ej., EGFR. Dicha activación excesiva se puede atribuir al exceso de expresión o a la producción aumentada del receptor ErbB o un ligando de ErbB.

15 **[0187]** Se puede llevar a cabo un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si el cáncer del paciente se caracteriza por la activación excesiva de un receptor ErbB. Por ejemplo, se puede determinar la amplificación del gen de ErbB y/o el exceso de expresión de un receptor ErbB en el cáncer. Están disponibles en la técnica varios ensayos para determinar dicha amplificación/exceso de expresión, e incluyen los ensayos IHC, FISH y de antígeno  
20 circulante, descritos antes. Alternativamente, o adicionalmente, se pueden determinar los niveles de un ligando de ErbB, tal como TGF- $\alpha$ , en o asociado con el tumor, de acuerdo con procedimientos conocidos. Dichos ensayos pueden detectar la proteína y/o el ácido nucleico que la codifica en la muestra que se va a ensayar. Los niveles de ligando de ErbB en el tumor se pueden determinar usando inmunohistoquímica (IHC); véase, por ejemplo, Scher y col., Clin. Cancer Research, 1: 545-550 (1995). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden evaluar los niveles  
25 del ácido nucleico que codifica el ligando de ErbB en la muestra que se va a ensayar; p. ej., por FISH, transferencia southern o técnicas de PCR.

**[0188]** Además, el exceso de expresión o amplificación del receptor ErbB o el ligando de ErbB se pueden evaluar usando un ensayo de diagnóstico in vivo, p. ej., administrando una molécula (tal como un anticuerpo) que se une a  
30 la molécula que se va a detectar y está marcada con un marcador detectable (p. ej., un isótopo radiactivo) y escaneando externamente al paciente para localizar el marcador.

**[0189]** Cuando el cáncer que se va a tratar es un cáncer independiente de hormonas, se puede ensayar la expresión de la hormona (p. ej., andrógeno) y/o su receptor cognado en el tumor, usando cualquiera de los  
35 diferentes ensayos disponibles, p. ej., como se ha descrito antes. Alternativamente, o adicionalmente, se puede diagnosticar que el paciente tiene un cáncer independiente de hormonas que ya no responde a la terapia antiandrógenos.

**[0190]** Se puede administrar al paciente un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo dirigido contra ErbB2  
40 conjugado con un agente citotóxico. Preferiblemente, el inmunoconjugado y/o la proteína ErbB2 a la que se une son internalizados por la célula, dando como resultado una mayor eficacia terapéutica del inmunoconjugado para matar a la célula cancerígena a la cual está unido. El agente citotóxico se dirige o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerígena. Los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

45 **[0191]** El anticuerpo para la administración es rhuMab 2C4. RhuMab 2C4 es un anticuerpo monoclonal humanizado basado en secuencias de la región armazón de la IgG1 humana y consiste en dos cadenas pesadas (449 restos) y dos cadenas ligeras (214 restos). RhuMab 2C4 difiere significativamente de otro anticuerpo dirigido contra HER2, HERCEPTIN® (Trastuzumab), en las regiones de unión al epítipo de la cadena ligera y la cadena  
50 pesada. Como resultado, rhuMab 2C4 se une a un epítipo completamente diferente en HER2. La presente invención proporciona procedimientos sensibles para identificar cánceres que responden al tratamiento con rhuMab 2C4 o equivalentes funcionales del mismo. Hay que indicar que dichos cánceres que responden al tratamiento con rhuMab 2C4 no es necesario que expresen en exceso HER2.

55 **[0192]** Los anticuerpos dirigidos contra ErbB2 o inmunoconjugados son para la administración a un paciente humano de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa, p. ej., en forma de un bolo o por infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Se prefiere la administración del anticuerpo por vía intravenosa o subcutánea.

60 **[0193]** Se pueden combinar otros regímenes terapéuticos con la administración del anticuerpo dirigido contra ErbB2. La administración combinada incluye la coadministración, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferiblemente hay un periodo de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades  
65 biológicas.

**[0194]** El paciente se puede tratar con dos anticuerpos dirigidos contra ErbB2 diferentes. Por ejemplo, el paciente se pueden tratar con rhu hAb 2C4 como primer anticuerpo dirigido contra ErbB2, así como con un segundo anticuerpo dirigido contra ErbB2 que es inhibidor del crecimiento (p. ej., HERCEPTIN®) o un anticuerpo dirigido  
5 contra ErbB2 que induce la apoptosis de una célula que expresa en exceso ErbB2 (p. ej., 7C2, 7F3 o las versiones humanizadas de los mismos). Preferiblemente, dicha terapia combinada da como resultado un efecto terapéutico sinérgico. Se puede, por ejemplo, tratar al paciente con HERCEPTIN® y después tratarlo con rhuMAb 2C4, p. ej., cuando el paciente no responde a la terapia con HERCEPTIN®. El paciente se puede tratar primero con rhuMAb 2C4 y después recibir terapia con HERCEPTIN®. El paciente se puede tratar tanto con rhuMAb 2C4 como con  
10 HERCEPTIN® simultáneamente.

**[0195]** También puede ser conveniente combinar la administración del anticuerpo dirigido contra ErbB2 con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno asociado a tumor. En este caso, el otro anticuerpo puede, por ejemplo, unirse a EGFR, ErbB3, ErbB4, o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).  
15

**[0196]** El tratamiento puede implicar la administración combinada del anticuerpo dirigido contra ErbB2 y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos preferidos incluyen taxanos (tales como paclitaxel y docetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. Se pueden usar la preparación y los esquemas de dosificación  
20 para dichos agentes quimioterapéuticos de acuerdo con las instrucciones del fabricante, o pueden ser determinadas empíricamente por el experto en la materia. La preparación y los esquemas de dosificación para dicha quimioterapia se describen también en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

**[0197]** El anticuerpo se puede combinar con un compuesto o antihormonal; p. ej., un compuesto antiestrógenos tal  
25 como tamoxifeno; una antiprogesterona tal como onapristona (véase, el documento EP 616812); o un antiandrógeno tal como flutamida, en las dosificaciones conocidas para dichas moléculas. Cuando el cáncer que se va a tratar es un cáncer independiente de hormonas, el paciente se puede haber sometido previamente a terapia antihormonal, y después de que el cáncer se convierta en independiente de hormonas, se puede administrar al paciente el anticuerpo dirigido contra ErbB2 (y opcionalmente otros agentes como se describe en el presente documento).  
30

**[0198]** A veces, puede ser beneficioso coadministrar al paciente también un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción miocárdica asociada con la terapia) o una o más citoquinas. También se puede coadministrar un fármaco dirigido al EGFR o un agente antiangiogénico. Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente se puede someter a eliminación quirúrgica de células cancerígenas y/o a terapia de radiación.  
35

**[0199]** Los anticuerpos dirigidos contra ErbB2 del presente documento, también se pueden combinar con un fármaco dirigido al EGFR tales como los discutidos antes en la sección de definiciones, dando como resultado un efecto terapéutico complementario y potencialmente sinérgico.

**[0200]** Los ejemplos de fármacos adicionales que se pueden combinar con el anticuerpo incluyen agentes quimioterapéuticos tales como carboplatino, un taxano (p. ej., paclitaxel o docetaxel), gemcitabina, navelbina, cisplatino, oxaliplatino, o combinaciones de cualquiera de estos tales como carboplatino/docetaxel; otro anticuerpo dirigido contra HER2 (p. ej., un anticuerpo dirigido contra HER2 inhibidor del crecimiento tal como HERCEPTIN®, o un anticuerpo dirigido contra HER2 que induce apoptosis tal como 7C2 o 7F3, incluyendo las variantes maduras de  
45 afinidad o humanizadas de los mismos); un inhibidor de la farnesil transferasa; un agente antiangiogénico (p. ej., un anticuerpo dirigido contra VEGF); un fármaco dirigido al EGFR (p. ej., C225 o ZD1839); una citoquina (p. ej., IL-2, IL-12, G-CSF o GM-CSF); o combinaciones de los anteriores.

**[0201]** Las dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son las que se usan actualmente y se pueden reducir debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el anticuerpo dirigido  
50 contra ErbB2, rhuMAb 2C4.

**[0202]** Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación adecuada del anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, como se ha definido antes, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con propósito preventivo o terapéutico, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la  
55 respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico que atiende.

**[0203]** Las dosis son para la administración en intervalos de tres semanas (p. ej., de modo que el paciente recibe de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, p. ej., aproximadamente 6 dosis del anticuerpo dirigido contra  
60 ErbB2). Se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguido de una o más dosis menores.

**[0204]** La evolución de esta terapia se puede seguir fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

**[0205]** El rhuMAb 2C4 es para la administración en una dosis fija de 420 mg (equivalente a dosis de 6 mg/kg para un sujeto de 70 kg) cada 3 semanas. El tratamiento puede empezar con una dosis de carga más alta (p. ej., 840 mg,

equivalente a 12 mg/kg de peso corporal) con el fin de lograr concentraciones de estado estacionario en el suero, más rápidamente. En los siguientes ejemplos también se proporcionan regímenes de dosificación específicos.

#### Artículos de fabricación

5

**[0206]** También se describe un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos antes.

**[0207]** El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta o prospecto en o asociado con el envase.

- 10 Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los envases pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo dirigido contra ErbB2. La etiqueta o prospecto indican que la composición se usa para el tratamiento de la afección elegida, tal como el cáncer. La etiqueta o prospecto pueden indicar que la composición que comprende el anticuerpo que se une a ErbB2 se puede usar para tratar a un paciente que padece un tumor, en el que se han identificado la presencia de los complejos HER2/HER1 y/o HER2/HER3 y/o HER2/HER4, y/o se ha detectado la fosforilación del receptor ErbB. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un primer anticuerpo que se une a ErbB2 e inhibe el crecimiento de las células cancerígenas que expresan en exceso ErbB2; y (b) un segundo envase con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un segundo anticuerpo que se une a ErbB2 y bloquea la activación del ligando de un receptor ErbB. El artículo de fabricación puede comprender además un prospecto que indica que la primera y la segunda composiciones de anticuerpos se pueden usar para tratar el cáncer caracterizado por la presencia de los heterodímeros HER2/HER1 y/o HER2/HER3 y/o HER2/HER4, y/o por la fosforilación del receptor ErbB. Además, el prospecto puede enseñar al usuario de la composición (que comprende un anticuerpo que se une a ErbB2 y bloquea la activación del ligando de un receptor ErbB) a combinar la terapia con el anticuerpo y cualquiera de las terapias adjuntas descritas en la sección precedente (p. ej., un agente quimioterapéutico, un fármaco dirigido a EGFR, un agente antiangiogénico, un compuesto antihormonal, un cardioprotector y/o una citoquina).
- 25 Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), disolución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales convenientes desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

35

#### Depósito de materiales

**[0208]** Las siguientes líneas celulares de hibridomas se han depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

40

Denominación del anticuerpo	Nº en ATCC	Fecha de depósito
7C2	ATCC HB-12215	17 de octubre, 1996
7F3	ATCC HB-12216	17 de octubre, 1996
4D5	ATCC CRL 10463	24 de mayo, 1990
2C4	ATCC HB-12697	8 de abril, 1999

**[0209]** Se ilustran más detalles de la invención en los siguientes ejemplos no limitantes.

#### Ejemplo 1

45

#### La asociación de ErbB2 con ErbB3 dependiente de HRG es bloqueada por el anticuerpo monoclonal 2C4

**[0210]** El anticuerpo monoclonal murino 2C4, que se une específicamente al dominio extracelular de ErbB2 se describe en el documento WO 01/89566.

50

**[0211]** Se ensayó la capacidad de ErbB3 para asociarse con ErbB2 en un experimento de inmunoprecipitación conjunta. Se sembraron  $1,0 \times 10^6$  células MCF7 o SK-BR-3 en 6 placas de cultivo tisular en medio DMEM/Ham F12 50:50 que contenía suero de ternero fetal (FBS) al 10% y HEPES 10 mM, pH 7,2 (medio de crecimiento), y se dejó que se unieran durante la noche. Las células se privaron de suero durante dos horas en el medio de crecimiento antes de empezar con el experimento.

55

**[0212]** Las células se lavaron brevemente con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron con el anticuerpo indicado 100 nM diluido en albúmina de suero bovino (BSA) al 0,2% en p/v, medio RPMI, con HERPES 10 mM, pH 7,2 (tampón de unión) o con tampón de unión solo (control). Después de una hora a temperatura ambiente, se añadió HRG hasta una concentración final de 5 nM a la mitad de los pocillos (+). Se añadió un volumen

60

similar de tampón de unión a los otros pocillos (-). La incubación se continuó durante aproximadamente 10 minutos.

**[0213]** Los líquidos sobrenadantes se separaron por aspiración y las células se lisaron en RPMI, HEPES 10 mM, pH 7,2, TRITON X-100™ al 10% en v/v, CHAPS al 1,0% en p/v (tampón de lisis), que contenía PMSF 0,2 mM, 5 leupeptina 10 µg/ml y aprotinina 10 UT/ml. Se eliminó el material insoluble en los lisatos por centrifugación.

**[0214]** ErbB2 se inmunoprecipitó usando un anticuerpo monoclonal acoplado covalentemente a un gel de afinidad (Affi-Prep 10, Bio-Rad). Este anticuerpo (Ab-3, Oncogene Sciences, EE.UU.) reconoce un epítipo del dominio citoplasmático. La inmunoprecipitación se llevó a cabo por adición de 10 µl de suspensión de gel que contenía 10 aproximadamente 8,5 µg de anticuerpo inmovilizado, a cada lisato, y las muestras se dejaron mezclar a temperatura ambiente durante 2 horas. Después los geles se recogieron por centrifugación. Los geles se lavaron en lotes 3 veces con tampón de lisis para separar el material no unido. Después se añadió el tampón de muestra SDS y las muestras se calentaron brevemente en un baño de agua hirviendo.

15 **[0215]** Los líquidos sobrenadantes se desarrollaron en geles de poliacrilamida al 4-12% y se electrotransferieron sobre membranas de nitrocelulosa. La presencia de ErbB3 se evaluó examinando las transferencias con un anticuerpo policlonal contra un epítipo del dominio citoplasmático del mismo (c-17, Santa Cruz Biotech). Las transferencias se visualizaron usando un sustrato quimioluminiscente (ECL, Amersham).

20 **[0216]** Como se muestra en las bandas de control de las figuras 2A y 2B, para las células MCF7 y SK-BR-3, respectivamente, ErbB3 estaba presente en un inmunoprecipitado de ErbB2 solo cuando las células se estimularon con HRG. Si las células se incubaban primero con el anticuerpo monoclonal 2C4, se suprimía la señal de ErbB3 en las células MCF7 (Fig. 5A, banda 2C4 +) o se reducía sustancialmente en las células SK-BR-3 (Fig. 5B, banda 2C4+). Como se muestra en las figuras 2A-B, el anticuerpo monoclonal 2C4 bloquea la asociación de ErbB3 con 25 ErbB2 dependiente de heregulina tanto en las células MCF7 como SK-BR-3 de forma sustancialmente más eficaz que HERCEPTIN®. La preincubación con HERCEPTIN® disminuyó la señal de ErbB3 en los lisatos de MCF7 pero tuvo poco efecto o no tuvo efecto en la cantidad de ErbB3 coprecipitada de los lisatos de SK-BR-3. La preincubación con un anticuerpo contra el receptor EGF (Ab-1, Oncogene Sciences, EE.UU.) no tenía efecto en la capacidad de ErbB3 para inmunoprecipitar conjuntamente con ErbB2 en cualquiera de las líneas celulares.

30

## **Ejemplo 2**

### **Sensibilidad de la línea celular y de los modelos de xenoinjerto de tumor humano a 2C4**

35 **[0217]** Se ha ensayado en aproximadamente 40 modelos tumorales la sensibilidad a 2C4. Estos modelos representan los cánceres principales tales como de mama, pulmón, próstata y colon. 50-60% de los modelos respondían al tratamiento con 2C4. La siguiente tabla 1 lista modelos tumorales seleccionados en los que se ha ensayado la sensibilidad a 2C4. Brevemente, se trasplantaron fragmentos de xenoinjerto de tumor humano de 40 aproximadamente 3 mm de tamaño bajo la piel de ratones sin pelo atímicos. Alternativamente, se desprendieron células tumorales humanas cultivadas in vitro, de las placas de cultivo, se volvieron a suspender en disolución salina tamponada con fosfato y se inyectaron por vía subcutánea en el flanco de los ratones inmunocomprometidos. Se siguió el crecimiento del tumor cada 2 a 3 días usando un calibrador eléctrico. Cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de aproximadamente 30 a 100 mm, los animales se repartieron aleatoriamente en diferentes grupos de 45 control recibieron volúmenes iguales de disolución de vehículo que no contenía anticuerpo con el mismo esquema que los grupos de tratamiento. El estudio se terminó después de aproximadamente 3-6 semanas, cuando los tumores del grupo de control habían alcanzado un tamaño de aproximadamente 1000-1500 mm<sup>3</sup>. La sensibilidad al tratamiento se definió como ≥ 50% de reducción del volumen del tumor.

50 **Tabla 1: Modelos de xenoinjertos**

Modelo nº	Modelo tumoral	Sensibilidad a 2C4	Referencia
1	LXFA 289	No	(Fiebig y col., 1999)
2	LXFA 297	Sí	
3	LXFA 526	No	(Fiebig y col., 1999)
4	LXFA 629	Sí	(Fiebig y Burger, 2002)
5	LXFA 1041	No	
6	LXFE 211	No	(Fiebig y col., 1999)
7	LIFE 397	No	(Fiebig y col., 1999)
8	LXFL 529	No	(Burger y col., 2001)
9	LXFL 1072	Sí	(Fiebig y col., 1999)
10	Calu-3	Sí	(Stein y col., 2001)
11	NCI-H522	Sí	(Yamori y col., 1997)
12	NCI-H322	No	(Zou y col., 2001)

(continuación)

Modelo nº	Modelo tumoral	Sensibilidad a 2C4	Referencia
13	NCI-H441(KAM)	Sí	(Gridley y col., 1996)
14	MAXF MX1	No	
15	MAXF 401	No	(Fiebig y col., 1999)
16	MAXF 449	Sí	(Burger y col., 2001)
17	MAXF 713	No	(Berger y col., 1992)
18	MAXF 857	No	(Fiebig y col., 1999)

- [0218]** Los modelos representan dos tipos de tumores principales, en concreto el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP; modelos nº 1-13) y el cáncer de mama (modelos nº 14-18). Nueve de los modelos de CPCNP (nº 1-9) y todos los modelos de cáncer de mama se obtuvieron por pases sucesivos in vivo de fragmentos de tumor humano en ratones inmunodeficientes. El resto de los modelos de CPCNP (nº 10-13) son modelos basados en células en los que el crecimiento del tumor in vivo se induce por implantación de células propagadas in vitro en ratones inmunocomprometidos.
- 10 **[0219]** Berger, D.P., Winterhalter, B. R., y Fiebig, H.H. (1992). Establishment and Characterization of Human Tumor Xenografts in Thymus-Aplastic Nude Mice. In *Immunodeficient Mice in Oncology*, H.H. Fiebig and D.P. Berger, eds. (Basel: Karger), pág. 23-46.
- [0220]** Burger, A.M., Hartung, G., Stehle, G., Sinn, H., y Fiebig, H.H. (2001). Pre-clinical evaluation of a methotrexate- albumin conjugate (MTX-HSA) in human tumor xenografts in vivo. *Int. J. Cancer*, 92:718-24.
- [0221]** Fiebig, H.H., y Burger, A.M. (2002). Human Tumor Xenografts and Explants. In *Tumor Models in Cancer Research*, B. A. Teicher, ed. (Totowa, New Jersey: Humana Press), pág. 113-137.
- 20 **[0222]** Fiebig, H.H., Dengler, W.A., y Roth, T. (1999). Human Tumor Xenografts: Predictivity, Characterization and Discovery of New Anticancer Agents. In *Contributions to Oncology: Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development*, H.H. Fiebig and A.M. Burger, eds. (Basel: Karger), pág. 29-50.
- [0223]** Gridley, D.S., Andres, M.L., Garner, C., Mao, X.W., y Slater, J.M. (1996). Evaluation of TNF-alpha effects on radiation efficacy in a human lung adenocarcinoma model. *Oncol Res.*, 8:485-95.
- 25 **[0224]** Stein, R., Govindan, S.V., Chen, S., Reed, L., Spiegelman, H., Griffiths, G.L., Hansen, H.J., y Goldenberg, D.M. (2001). Successful therapy of a human lung cancer xenograft using MAb RS7 labeled with residualizing radioiodine. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 39:173-80.
- 30 **[0225]** Yamori, T., Sato, S., Chikazawa, H., y Kadota, T. (1997). Anti-tumor efficacy of paclitaxel against human lung cancer xenografts. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88:1205-10.
- [0226]** Zou, Y., Wu, Q.P., Tansey, W., Chow, D., Hung, M.C., Charnsangavej, C., Wallace, S., y Li, C. (2001). Effectiveness of water soluble poly(L-glutamic acid)-camptothecin conjugate against resistant human lung cancer xenografted in nude mice. *Int. J. Oncol.*, 18:331-6.
- 35

### Ejemplo 3

#### 40 Detección de heterodímeros en tumores sensibles a 2C4 por inmunoprecipitación

- [0227]** Tumores sensibles y no sensibles a 2C4 se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpos dirigidos contra ErbB2 para ensayar la presencia de los heterodímeros ErbB2-ErbB3 y EGFR-ErbB2. Salvo que se indique lo contrario, los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con Maniatis T. y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- 45 **[0228]** Se seleccionaron anticuerpos dirigidos contra HER2, contra HER3 y contra HER1 que no tuvieran reacciones cruzadas. Para determinar si los anticuerpos tenían reacciones cruzadas, los receptores HER1, HER2, HER3 y HER4 se expresaron en células 293 de riñón embrionario humano (HEK). Las células se lisaron usando un tampón HEPES que contenía Triton™ X100 (1% en peso/volumen) (pH 7,5). Aproximadamente 20 µg de proteína celular total de las células de control y las células que expresaban HER1, HER2, HER3 y HER4, se separaron en un gel de SDS y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por un procedimiento de transferencia semiseca. Después de bloquear con gelatina, se ensayó en una variedad de anticuerpos dirigidos contra HER1, contra HER2 y contra HER3 su reactividad cruzada contra otros receptores ErbB. Los anticuerpos seleccionados para usar en los experimentos descritos a continuación no presentaban ninguna reactividad cruzada significativa.
- 55

**[0229]** Las muestras de tumores recientes se trituraron mecánicamente en hielo y se lisaron en un tampón que contenía HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 10% (p/v), Triton™ X-100 al



1% (p/v), PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/ml y ortovanadato 0,4 mM. Los tumores completamente lisados se centrifugaron varias veces hasta que los líquidos sobrenadantes eran completamente transparentes. La inmunoprecipitación se produjo combinando lisatos tumorales clarificados (5-7 mg de proteínas por lisato), 5 µg de anticuerpos dirigido contra ErbB2 (ab-3, monoclonal de ratón; Cat. nº OP15, Oncogene Inc., EE.UU.) y 50 µl de agarosa acoplada a proteína G en tubos de reacción Eppendorf de 1,5 ml. Después de la adición de un volumen de una a dos veces, de tampón HEPES 50 mM, pH 7,5 que contenía Triton™ X-100 al 0,1% (p/v) los tubos se rotaron durante 3-4 horas a 4°C seguido de centrifugación. Los sedimentos se lavaron de 2 a 3 veces con 500 µl de tampón HEPES 50 mM pH 7,5 que contenía Triton™ X-100 al 0,1% (p/v). Se añadió un volumen igual de tampón de muestra Lämmli 2x al inmunoprecipitado lavado y las muestras se calentaron durante 5 min a 95°C. Las muestras se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa. La presencia de los heterodímeros EGFR-ErbB2 y ErbB2-ErbB3 se evaluó examinando las transferencias con anticuerpos contra EGFR (anticuerpo policlonal de conejo contra EGFR, Upstate Inc., EE.UU.; Cat. nº 06-847) y ErbB3 (anticuerpo policlonal contra ErbB3; Santa Cruz Inc., EE.UU.; Cat. nº SC-285). Se usó un anticuerpo dirigido contra Fc de conejo marcado con peroxidasa (POD) (BioRad Laboratories Inc. EE.UU.) como anticuerpo secundario. Las transferencias se visualizaron usando un sustrato quimioluminiscente (ECL plus, Amersham).

**[0230]** La figura 3 muestra los resultados de estos experimentos. Se puede ver la presencia de los heterodímeros ErbB2-ErbB3 y/o EGFR-ErbB2. Se observó una correlación entre la sensibilidad a 2C4, como se muestra en la tabla 1, y la presencia de los heterodímeros ErbB2-ErbB3 y/o EGFR-ErbB2.

20

#### **Ejemplo 4**

##### **Correlación de la sensibilidad a rhuMAb 2C4 con la fosforilación de HER2**

**[0231]** Se ha estudiado el efecto de rhuMAb 2C4 en 14 tumores humanos explantados en ratones (9 cánceres de pulmón y 5 cánceres de mama). La explantación del tumor y el tratamiento se llevaron a cabo como se ha descrito en el ejemplo 2. Se detectaron los heterodímeros de HER2 como se ha descrito en el ejemplo 3.

**[0232]** La fosforilación de HER2 se evaluó por inmunoprecipitación de HER2 y análisis por transferencia Western. Se determinó que era positiva por la presencia de la banda de fosfo-HER2 del gel. Se determinó que era negativa por la ausencia de la banda. La fosforilación de HER2 se confirmó por inmunohistoquímica usando un anticuerpo dirigido contra HER2 fosfoespecífico (clone PN2A, Thor y col., *J. Clin. Oncol.*, 18:3230-9 (2000)).

**[0233]** En 5 de los tumores ensayados (3 de pulmón y 2 de mama), se observó una inhibición significativa del crecimiento tumoral, que se correlacionaba con la presencia de heterodímeros detectables de HER2 con HER1 o HER3, y con una fosforilación fuerte de HER2 en todos los casos. En 9 tumores en los que no se observó una respuesta significativa al tratamiento con rhuMAb 2C4, no se detectaron heterodímeros y no había fosforilación de HER2. La presencia de heterodimerización de HER2 o fosforilación significativa de HER2 es una predicción buena de la respuesta al tratamiento con rhuMAb 2C4 en modelos no clínicos. Se han hecho observaciones similares con xenoinjertos generados a partir de líneas de células tumorales.

#### **Ejemplo 5**

##### **Detección de la fosforilación de HER2 en tumores sensibles a 2C4**

45

**[0234]** La eficacia de rhuMAb 2C4 se evaluó en 9 modelos tumorales xenotrasplantados de carcinomas de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) establecidos (LXFE 211, LXFA 289, LXFA 297, LXFE 397, LXFA 526, LXFL 529, LXFA 629, LXFA 1041, LXFL 1071, Oncotest GmbH, Freiburg, Alemania). Los xenoinjertos de tumores humanos se han considerado los modelos más importantes para el desarrollo de fármacos anticancerígenos puesto que los tumores de los pacientes crecen como un tumor sólido, desarrollan un estroma, vasculatura, una necrosis central y presentan diferenciación. Además, los modelos de tumores xenotrasplantados se parecen mucho a los tumores originales en la histología y quimiosensibilidad.

**[0235]** La inhibición del crecimiento se evaluó como se ha descrito en el ejemplo 2. La actividad inhibidora del crecimiento significativa se definió como >50% de inhibición del crecimiento del grupo de tratamiento con respecto al grupo de control. En 3 de los modelos de CPCNP (LXFA 297, LXFA 629, y LXFL 1072), se observó una respuesta inhibidora del crecimiento significativa al tratamiento con rhuMAb 2C4. También se han investigado varias características de HER2 activado por ligando a nivel de la proteína. Como se muestra en la figura 4, HER2 puede inmunoprecipitar de extractos tumorales de 8 de los 9 tumores de CPCNP. Para determinar el estado de activación de HER2, estas transferencias después se examinaron con anticuerpo dirigido contra fosfotirosina (anti-PY). Como se muestra en el panel inferior de la figura 4, los 3 tumores sensibles (LXFA 297, LXFA 629 y 1072) presentaron una fuerte activación de HER2.

60

**Ejemplo 6****Estudio clínico para identificar los pacientes con cáncer de pulmón para el tratamiento con rhuMAb 2C4 por la detección de heterodímeros de HER2**

5

**[0236]** Se identifica que un paciente tiene cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) que es sensible al tratamiento con rhuMAb 2C4, si se encuentra que un tumor del paciente comprende complejos de HER2/HER3 y/o HER2/HER1 y/o HER2/HER4.

10 **[0237]** Se obtiene una muestra del tumor por biopsia o durante la extirpación quirúrgica del tumor. Después, se analiza en la muestra la presencia de los heterodímeros HER2/HER3 y/o HER2/HER1 y/o HER2/HER4.

15 **[0238]** Las células tumorales o los lisatos celulares se ponen en contacto con un eTag<sup>TM</sup> que se une específicamente a HER2. El eTag<sup>TM</sup> comprende un resto detectable y un primer resto de unión que es específico para HER2. El resto detectable está unido al primer resto de unión con un conector escindible. Después de dejar tiempo para la unión, se elimina el exceso de eTag<sup>TM</sup>.

20 **[0239]** Las células tumorales o los lisatos celulares se ponen en contacto con un segundo compuesto de unión que se une específicamente a HER1 o HER3 o HER4. El compuesto no unido se elimina mediante lavado. Después se activa el segundo compuesto de unión. Si el primer compuesto de unión y el segundo compuesto de unión están muy próximos, el segundo compuesto de unión activado escinde el conector escindible en el eTag<sup>TM</sup> para producir un resto detectable libre. La identificación del resto detectable libre en la muestra indica que el tumor comprende heterodímeros HER2/HER1 y/o HER2/HER3 y/o HER2/HER4.

25 **[0240]** Tras determinar que el paciente padece un tumor que comprende heterodímeros HER2/HER1 y/o HER2/HER3 y/o HER2/HER4, se administra rhuMAb 2C4 por vía intravenosa (IV) cada semana o cada 3 semanas, con 2 ó 4 mg/kg, respectivamente, hasta la evolución de la enfermedad. El anticuerpo se suministra como una formulación líquida de múltiples dosis (20 ml de carga con una concentración de 20 mg/ml o concentración superior). Los criterios de valoración principales de la eficacia incluyen la tasa de respuesta y la seguridad. Los criterios de valoración secundarios de la eficacia incluyen: supervivencia general, tiempo de evolución de la enfermedad, calidad de vida y/o duración de la respuesta.

**Ejemplo 7****35 Estudio clínico para identificar pacientes con cáncer para el tratamiento con rhuMAb 2C4**

**[0241]** Se obtiene una muestra biológica que comprende células cancerígenas de candidatos para el tratamiento, p. ej., por biopsia del tejido tumoral, aspiración de células tumorales del líquido ascítico, o por cualquier otro procedimiento conocido en la práctica clínica. Se analizará en la muestra biológica la fosforilación de HER2, p. ej., por inmunoprecipitación y análisis de transferencia Western, y/o la presencia de los heterodímeros HER2/HER3, HER2/HER1 y/o HER2/HER4 por cualquiera de las técnicas descritas antes. Los sujetos cuya muestra biológica era positiva para la fosforilación de HER2 y/o la presencia de heterodímeros HER2/HER3, HER2/HER1 y/o HER2/HER4, es probable que muestren una mejor respuesta al tratamiento con rhuMAb 2C4 que los pacientes cuya muestra tumoral no presentó fosforilación de HER2 o en la que no se detectaron heterodímeros.

45

**[0242]** Por ejemplo, los sujetos a los que se diagnosticó cáncer de ovario se someterán a biopsia del tejido tumoral o aspiración de las células tumorales del líquido ascítico. Se analizará en este tejido la fosforilación de HER2 por inmunoprecipitación y análisis de transferencia Western. Esto requerirá un mínimo de aproximadamente 250 mg de tejido tumoral.

50 **[0243]** Tras determinar que el paciente padece un cáncer (tal como, cáncer de próstata resistente a la castración - CPRC, o cáncer de ovario) que es positivo para la fosforilación de HER2, el paciente recibirá una dosis de carga de 840 mg de rhuMAb 2C4 el día 1 del ciclo 1 (primer periodo de tratamiento de 21 días), seguido de 420 mg el día 1 de cada ciclo posterior de 21 días, en forma de infusión intravenosa continua. El tratamiento continúa por infusión intravenosa cada 3 semanas durante un año (17 ciclos), para los pacientes que no muestran pruebas de evolución de la enfermedad. El tratamiento se puede interrumpir en cualquier momento anterior, por la falta de respuesta, efectos adversos, u otras razones, según el criterio del médico.

55

## LISTA DE SECUENCIAS

60 **[0244]**

<110> Genentech, Inc.  
Koll, Hans Bossenmaier, Birgit  
Muller, Hans-Joachim  
Sliwkowski,

Mark Kelsey, Stephen

<120> Procedimientos para identificar tumores que son sensibles al tratamiento con anticuerpos dirigidos contra ErbB2

<130> 39766-0114PC

5 <150> US 60/396.290

<151> 2002-07-15

<150> US 60/480.043

<151> 2003-06-20

<160> 6

10 <170> FastSEQ para windows versión 4.0

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Homosapiens

15 <400> 1

```

Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val Gly
 1      5      10      15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
 20      25      30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35      40      45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65      70      75      80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
 85      90      95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100      105
    
```

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

20 <213> Homosapiens

<400> 2

```

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1      5      10      15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20      25      30
Thr Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35      40      45
Gly Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
 50      55      60
Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Arg Ile Val Tyr

65      70      75      80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100      105      110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115
    
```

<210> 3

<211> 107

25 <212> PRT

<213> Homosapiens

<400> 3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
20      25      30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35      40      45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100      105

```

- <210> 4
- <211> 119
- <212> PRT
- 5 <213> Homosapiens
- <400> 4

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20      25      30
Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

- <210> 5
- <211> 107
- 10 <212> PRT
- <213> Homosapiens
- <400> 5

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
20      25      30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35      40      45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100      105

```

- 15 <210> 6
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Homosapiens
- <400> 6

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Val	Ile	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gly	Arg	Val	Gly	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
		115													

**REIVINDICACIONES**

1. Anticuerpo humanizado recombinante 2C4 (rhuMAb 2C4) para usar en un procedimiento para el tratamiento del cáncer de ovario, mama, pulmón o próstata, en un paciente con cáncer, en el que el rhuMAb 2C4 comprende las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera variable y pesada variable de SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente, y las secuencias de las regiones constantes de las cadenas ligera y pesada de la IgG1 humana (alotipo no A), y en el que en el procedimiento el rhuMAb 2C4 se administra como una dosis fija de 420 mg cada 3 semanas.
- 10 2. El anticuerpo humanizado recombinante para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el rhuMAb 2C4 se expresa en células de ovario de hámster chino (CHO).
3. El anticuerpo humanizado recombinante para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el tratamiento con rhuMAb 2C4 empieza con una dosis de carga de 840 mg.
- 15 4. Uso de un anticuerpo humanizado recombinante 2C4 (rhuMAb 2C4) en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de ovario, mama, pulmón o próstata, en un paciente con cáncer, en el que el rhuMAb 2C4 comprende las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera variable y pesada variable de SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente, y las secuencias de las regiones constantes de las cadenas ligera y pesada de la IgG1 humana (alotipo no A), y en el que en el tratamiento el rhuMAb 2C4 se administra como una dosis fija de 420 mg cada 3 semanas.
- 20 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el rhuMAb 2C4 se expresa en células de ovario de hámster chino (CHO).
- 25 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el medicamento es para el tratamiento de un paciente con cáncer, en el que el tratamiento con rhuMAb 2C4 empieza con una dosis de carga de 840 mg.

		10	20	30	40	
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQRP			
	..	****	*		*	
574	DIQMTQSPSSLASVGDRTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQKP			
	.	*	**	***		
hum xI	DIQMTQSPSSLASVGDRTITC	[RASQISNYLA]	WYQQKP			
		50	60	70	80	
2C4	CQSPKLLIY	[SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQA			
	**		*	*	*	*
574	GKAPKLLIY	[SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQP			
	*	*****				
hum xI	GKAPKLLIY	[AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQP			
		90	100			
2C4	EDLAVYYC	[QQYIYPYT]	FGGCTKLEIK	(SEQ ID NO: 1)		
	..	*	*			
574	EDFATYYC	[QQYIYPYT]	FGQGTKVEIK	(SEQ ID NO: 3)		
		***	*			
hum xI	EDFATYYC	[QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIK	(SEQ ID NO: 5)		

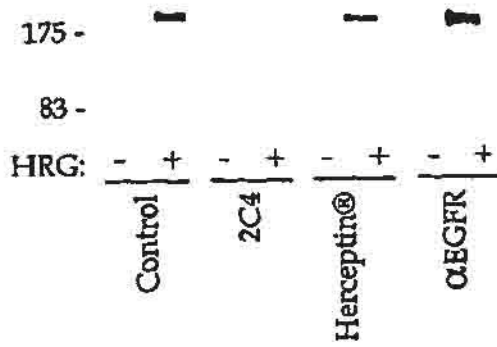
**FIG. 1A: CADENA LIGERA VARIABLE**

		10	20	30	40	
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTQSVKISCKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS			
	**	**	*	*	*	*
574	EVQLVESCGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA			
			**	*	*	
hum III	EVQLVESCGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA			
		50	a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIC	[DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM			
	.*	**		***	*	****
574	PGKLEWVA	[DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL			
		*****	***	****	*	
hum III	PGKLEWVA	[VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL			
	abc	90	100ab	110		
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGLTVVSS	(SEQ ID NO: 2)		
	***	**	**			
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGLTVVSS	(SEQ ID NO: 4)		
		*****				
hum xI	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGLTVVSS	(SEQ ID NO: 6)		

**FIG. 1B: CADENA PESADA VARIABLE**

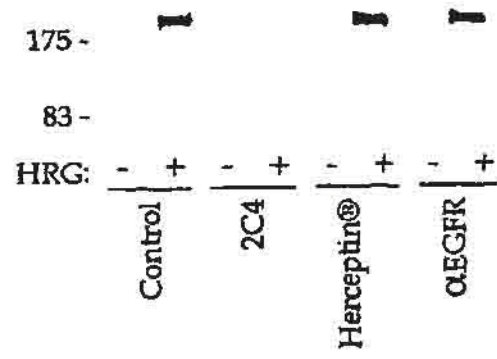
**FIG. 2A**

MCF7  
HER2 bajo/normal



**FIG. 2B**

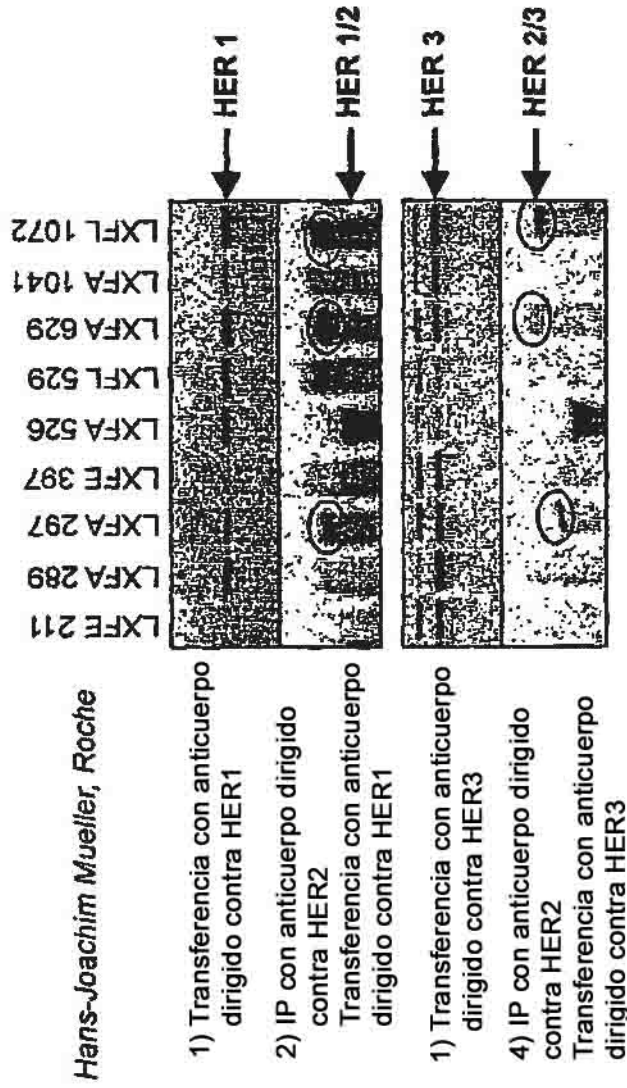
SK-BR-3  
HER2 alto



IP: αHER2  
WB: αHER3



**Dímeros que contienen HER2 en extractos de proteínas de explantes de xenoinjertos de CPCNP de Oncotest**



Los dímeros HER2/HER1 y los dímeros HER2/HER3 son elevados en los xenoinjertos de CPCNP sensibles a rhuMAb 2C4 frente a los no sensibles a rhuMAb 2C4.

**FIG. 3**

Expresión/activación de HER2 en extractos de proteínas de  
explantos de xenoinjertos de CPCNP de Oncotest

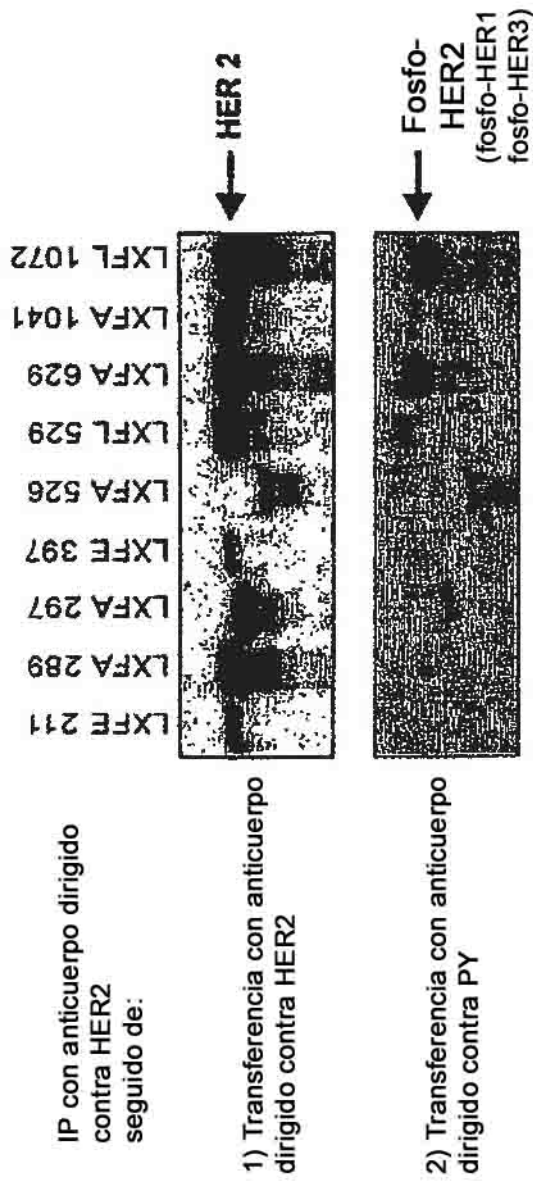


FIG. 4