

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 689**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2005 E 05761257 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 1755671**

54 Título: **Tratamiento del cáncer resistente al platino**

30 Prioridad:

16.06.2004 US 580333 P

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

21.03.2013

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO
CALIFORNIA 94080- 4990, US**

72 Inventor/es:

KELSEY, STEPHEN, M.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 398 689 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 resistente al platino

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un anticuerpo contra HER2 que inhibe eficazmente la dimerización de HER así como a la gemcitabina, para su uso en un procedimiento para tratar un cáncer de ovarios, un carcinoma peritoneal primario o un carcinoma de las trompas de Falopio resistentes al platino.

10

Antecedentes de la invención

Anticuerpos contra HER

15 **[0002]** La familia de receptores HER de tirosincinasas comprende mediadores importantes en el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celulares. La familia de receptores incluye cuatro miembros distintos que incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1 o HER1), HER2 (ErbB2 o p185^{neu}), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2).

20 **[0003]** El EGFR, codificado por el gen *erbB1*, ha sido implicado de forma causal en la neoplasia maligna humana. En particular, se ha observado un aumento en la expresión de EGFR en el cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y estómago, así como en los glioblastomas. El aumento en la expresión del receptor EGFR se asocia a menudo con el incremento en la producción del ligando de EGFR, el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), por las mismas células tumorales para producir la activación del receptor por una vía de estimulación autocrina. Baselga y Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra
25 el EGFR o sus ligandos, TGF- α y EGF, se han evaluado como agentes terapéuticos en el tratamiento de dichas neoplasias malignas. Véase, por ejemplo, Baselga y Mendelsohn., *supra*; Masui y col. *Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); y Wu y col. *J. Clin. Invest.* 95: 1897-1905 (1995).

30 **[0004]** El segundo miembro de la familia HER, p185^{neu}, fue identificado originalmente como el producto del gen de transformación de neuroblastomas de ratas tratadas químicamente. La forma activada del proto-oncogén *neu* procede de una mutación puntual (valina a ácido glutámico) en la región de transmembrana de la proteína codificada. La amplificación del homólogo humano de *neu* se observa en los cánceres de mama y de ovarios y guarda correlación con un mal pronóstico (Slamon y col., *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon y col., *Science*,
35 244:707-712 (1989); y patente de EE.UU. n° 4.968.603). Hasta la fecha, no se ha comunicado ninguna mutación puntual análoga a la del proto-oncogén *neu* para tumores humanos. También se ha observado la sobreexpresión de HER2 (debida de forma frecuente, pero no uniforme, a amplificación génica) en otros carcinomas que incluyen carcinomas de estómago, endometrio, glándulas salivares, 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); Fukushige y col., *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Guerin 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.*, 3:254-257 (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). HER2 puede mostrar sobreexpresión en el cáncer de
45 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)).

[0005] Se han descrito anticuerpos dirigidos contra los productos de proteínas p185^{neu} de rata y HER2 humano. Drebin y col. han preparado anticuerpos contra el producto génico *neu* de rata, p185^{neu}. Véase, por
50 ejemplo, Drebin y col., *Cell* 41:695-706 (1985); Myers y col., *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991); y el documento WO-94/22.478. Drebin y col. *Oncogene* 2:273-277 (1988) refieren que las mezclas de anticuerpos reactivos con dos regiones distintas de p185^{neu} tienen como resultado efectos antitumorales sinérgicos en células NIH-3T3 transformadas por *neu* implantadas en ratones sin pelo. Véase también la patente de EE.UU. 5.824.311 concedida el 20 de octubre de 1998.

55

[0006] Hudziak y col., *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989), describen la generación de un panel de anticuerpos contra HER2 que se caracterizaban usando la línea celular de tumor mamario humano SK-BR-3. La proliferación celular relativa de las células SK-BR-3 después de la exposición a los anticuerpos se determinó por tinción de cristal violeta de las monocapas después de 72 horas. Usando este ensayo, la inhibición máxima se
60 obtuvo con el anticuerpo denominado 4D5 que inhibió la proliferación celular en el 56%. Otros anticuerpos en el panel redujeron la proliferación celular en menor magnitud en este ensayo. Se encontró además que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba las líneas celulares de tumores mamarios con sobreexpresión de HER2 frente a los efectos citotóxicos de TNF- α . Véase también la patente de EE.UU. n° 5.677.171 concedida el 14 de octubre de 1997. Los anticuerpos contra HER2 expuestos en Hudziak y col. se caracterizan adicionalmente en 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
65 (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).

5

[0007] Existe una versión humanizada recombinante del anticuerpo contra HER2 4D5 murino (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Trastuzumab o HERCEPTIN®; patente de EE.UU. nº 5.821.337) clínicamente activa en pacientes con cánceres de mama metastásicos con sobreexpresión de HER2 que han recibido una terapia anticancerosa anterior extensa (Baselga y col., *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996)). El Trastuzumab recibió la aprobación para su comercialización de la Food and Drug Administration el 25 de septiembre de 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores muestran sobreexpresión de la proteína HER2.

10

[0008] Se han descrito otros anticuerpos contra HER2 con diversas 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 WO-94/00.136; Kasprzyk y col. *Cancer Research* 52:2771-2776 (1992); Hancock y col. *Cancer Res.* 51:4575-4580 (1991); Shawver y col. *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).

15

20

[0009] La detección selectiva de homología ha tenido como resultado la identificación de otros dos miembros de la familia de receptores HER: HER3 (patentes de EE.UU. nº 5.183.584 y 5.480.968 así como Kraus y col. *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)) y HER4 (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)). Estos dos receptores muestran un aumento en la expresión en al menos algunas líneas celulares de cáncer de mama.

25

[0010] Los receptores HER se encuentran generalmente en diversas combinaciones en células y según se cree la heterodimerización incrementa la diversidad de respuestas celulares a una diversidad de ligandos de HER (Earp y col. *Breast Cancer Research and Treatment* 35: 115-132 (1995)). EGFR se une por seis ligandos diferentes; factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), anfirregulina, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), betacelulina y epirregulina (Groenen y col. *Growth Factors* 11:235-257 (1994)). Una familia de proteínas de herregulina que proceden de proceso alternativo de corte y empalme de un único gen son los ligandos para HER3 y HER4. La familia de herregulina incluye herregulinas 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 de *neu* (NDF), factores de crecimiento glial (GGF); actividad inductora del receptor de acetilcolina (ARIA); y factor derivado de las 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 identificaron tres ligandos de HER adicionales: neurregulina-2 (NRG-2) que según se ha comunicado se une a HER3 o a HER4 (Chang y col. *Nature* 387 509-512 (1997); y Carraway y col. *Nature* 387:512-516 (1997)); neurregulina-3 que se une a HER4 (Zhang y col. *PNAS (USA)* 94(18):9562-7 (1997)); y neurregulina-4 que se une a HER4 (Harari y col. *Oncogene* 18:2681-89 (1999)) HB-EGF, betacelulina y epirregulina también se unen a HER4.

30

35

40

[0011] Aunque EGF y TGF- α no se unen a HER2, EGF estimula a EGFR y HER2 para formar un heterodímero, que activa EGFR y tiene como resultado la transfosforilación de HER2 en el heterodímero. La dimerización y/o transfosforilación parece activar la tirosinasa de HER2. Véase Earp y col., *supra*. Análogamente, cuando HER3 se coexpresa con HER2, se forma un complejo activo de señalización y los anticuerpos dirigidos contra HER2 son capaces de alterar este complejo (Sliwkowski y col., *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)). Además, la afinidad de HER3 para la herregulina (HRG) se incrementa hasta un estado de mayor afinidad cuando se coexpresa con HER2. 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 proteico HER2-HER3. HER4, como HER3, forma un complejo activo de señalización con HER2 (Carraway y Cantley, *Cell* 78:5-8 (1994)).

45

50

55

Cáncer de ovarios

[0012] El cáncer de ovarios es la causa más común de muerte por neoplasia maligna del aparato reproductor femenino. En los Estados Unidos se estiman 24.000 nuevos diagnósticos cada año, con aproximadamente 13.000 muertes a causa de la enfermedad. Las pacientes con cáncer de ovarios avanzado son tratadas frecuentemente con quimioterapia a base de platino, a menudo combinada con un taxano. Después del fracaso de estos agentes, existen pocas opciones terapéuticas. Las pacientes con enfermedad sensible al platino a menudo son tratadas nuevamente con platino, pero una proporción sustancial de pacientes presenta una duración de respuesta breve después del re-tratamiento. Para las pacientes con enfermedad resistente al platino el desenlace clínico es menos favorable. El topotecán ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para pacientes con fracaso en la quimioterapia inicial o posteriores; la doxorubicina liposómica ha sido aprobada sólo para pacientes con cáncer de

60

65

ovarios que es refractario a los regímenes de quimioterapia a base de platino y paclitaxel. El topotecán y la doxorubicina liposómica han mostrado una tasa de respuesta parcial del 6% y el 12% respectivamente en pacientes con enfermedad resistente al platino, con una supervivencia media sin progresión de 14 a 18 semanas. Más recientemente, se han comunicado resultados prometedores con gemcitabina en cáncer de ovarios resistente al platino con respuestas parciales en el 16%, lo que lleva a incrementar el uso de este agente como terapia de 2ª línea. Sin embargo, existe una clara necesidad de opciones terapéuticas nuevas y mejoradas para pacientes con cáncer de ovarios avanzado para el cual los tratamientos existentes hayan fracasado.

10 **[0013]** La familia de receptores de ErbB o receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER) de tirosincinasas está implicada en la patogenia del cáncer de ovarios. Para dirigirse a la ruta de señalización de HER, se desarrolló el pertuzumab (rhuMAb 2C4) como un anticuerpo humanizado que inhibe la dimerización de HER2 con otros receptores HER, inhibiendo con ello la fosforilación y activación dirigida por ligando, y la activación descendente de las rutas de RAS y AKT.

15 **[0014]** La gemcitabina se ha usado en una diversidad de tumores y su uso está indicado en cáncer pancreático y de pulmón. Entre las toxicidades más comunes en el uso de la gemcitabina como agente único se incluyen las citopenias, con una incidencia de anemia y neutropenia del 68% y el 63%, respectivamente. Otra toxicidad común es náuseas y vómitos, con una incidencia combinada del 69%, con un 13% de incidencia de grado III y un 1% de grado IV. La diarrea se produce con menos frecuencia, en el 19%. El exantema se produce más comúnmente, en el 30%, con sólo un 1% de incidencia de grado III. La gemcitabina se ha combinado con muchos otros agentes quimioterapéuticos, como los taxanos, las antraciclinas y los platinos, sin ningún aumento significativo o toxicidades inesperadas.

25 **[0015]** El trastuzumab se ha combinado con la gemcitabina en varias combinaciones de diferentes quimioterapias en ensayos de fase II y también fue bien tolerado sin que se observaran toxicidades cardíacas o inesperadas. Safran y col. Proc Am. Soc. Clin. Oncol. 20:130a (2001), Miller y col. Oncology 15(2): 38-40 (2001). Véase, también, Zinner y col. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 20:328a (2001), Nagourney y col. Breast Cancer Res. Treat. 57:116, Abstract 475 (1999), Bun y col. Proc. Am. Assoc. Canc. Res. 41:719, Abstract #4571 (2000), Konecny y col. Breast Cancer Res Treat 57: 114, Abstract 467 (1999), O'Shaughnessy y col. Sem. Oncol 2 (supl. 3):22-26 (2004), Sledge y col. Sem. Oncol. 2 (supl. 3):19-21 (2003), Zinner y col. Lung Cancer 44(1):99-110 (2004), Gatzemeier y col. Ann of Oncol. 15: 19-27 (2004), en relación con la combinación de Trastuzumab y Gemcitabina.

30 **[0016]** En un ensayo de fase I de Omnitarg como agente único para tratar tumores sólidos, 3 sujetos con cáncer de ovarios avanzado recibieron tratamiento con pertuzumab. Uno tuvo una respuesta parcial duradera, y un sujeto adicional tuvo enfermedad estable durante 15 semanas. Agus y col. Proc Am Soc Clin Oncol 22: 192, Abstract 771 (2003).

Resumen de la invención

40 **[0017]** La presente invención se refiere, en un primer aspecto, a un anticuerpo contra HER2 según la reivindicación 1 ó 2.

[0018] En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo contra HER2 según la reivindicación 31.

45 **[0019]** En un aspecto adicional más, la invención se refiere a un anticuerpo contra HER2 según la reivindicación 32.

Breve descripción de los dibujos

50 **[0020]**

Las fig. 1A y 1B representan la cartografía de epítomos de los residuos 22-645 dentro del dominio extracelular (ECD) de HER2 (secuencia de aminoácidos, que incluye secuencia de señal, mostrada en la fig. 1A; SEQ ID NO: 13) según se determina mediante el análisis de mutantes por truncamiento y mutagenia dirigida al sitio (Nakamura y col. J. of Virology 67(10):6179-6191 (1993); y Renz y col. J. Cell Biol. 125(6):1395-1406 (1994)). Los diversos truncamientos de HER2-ECD o mutaciones puntuales se prepararon a partir de ADNc usando la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa. Los mutantes de HER2 se expresaron como proteínas de fusión gD en un plásmido de expresión de mamífero. Este plásmido de expresión usa el promotor/potenciador de citomegalovirus con terminación SV40 y señales de poliadenilación situadas en la dirección 3' del ADNc insertado. Se transfeció ADN de plásmido en 293 células. Un día después de la transfección, las células fueron marcadas metabólicamente durante toda la noche en metionina y DMEM bajo en glucosa y libre de cisteína que contenía suero fetal bovino dializado al 1% y 25 µCi de metionina ³⁵S y cisteína ³⁵S. Se recogieron los sobrenadantes y se añadieron los anticuerpos monoclonales contra HER2 o anticuerpos de control al sobrenadante y se incubaron de 2 a 4 horas a 4°C. Se precipitaron los complejos, se aplicaron a un gel de gradiente de SDS-tricina al 10-20% y se sometieron a electroforesis a 100 V. Se transfirió eléctricamente el gel a una membrana y se analizó por autorradiografía. Tal como se muestra en la fig. 1B, los anticuerpos contra HER2 7C2, 7F3, 2C4, 7D3, 3E8, 4D5, 2H11 y 3H4 se unen a diversos epítomos HER2-ECD.

Las fig. 2A y 2B muestran el efecto de los anticuerpos monoclonales contra HER2 2C4 y 7F3 en la activación rHRG β 1 de las células MCF7. La fig. 2A muestra las curvas de dosis-respuesta para la inhibición por 2C4 o 7F3 de la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina. La fig. 2B muestra las curvas de dosis-respuesta para la inhibición de rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ marcada con ¹²⁵I que se une a las células MCF7 por 2C4 o 7F3.

La fig. 3 representa la inhibición de la unión de rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ marcada con ¹²⁵I específica a un panel de líneas celulares de tumores humanos por los anticuerpos monoclonales contra HER2 2C4 o 7F3. Los controles de anticuerpo monoclonal son anticuerpos monoclonales murinos de isotipo correspondiente que no bloquean la unión a rHRG. La unión de rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ marcada con ¹²⁵I no específica se determinó a partir de incubaciones paralelas realizadas en presencia de rHRG β 1 100 nM. Los valores para unión de rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ marcada con ¹²⁵I no específica fueron inferiores al 1% del total para todas las líneas celulares sometidas a ensayo.

Las fig. 4A y 4B muestran el efecto de los anticuerpos monoclonales 2C4 y 4D5 en la proliferación de células MDA-MB-175 (fig. 4A) y SK-BR-3 (fig. 4B). Se sembraron placas de 96 pocillos con células MDA-MB-175 y SK-BR-3 y se dejó que se adhieran durante 2 horas. El experimento se llevó a cabo en un medio que contenía anticuerpos séricos al 1% contra HER2 o se añadió medio en solitario y se incubaron las células durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se añadió HRG β 1 (1 nM) o medio en solitario y se incubaron las células durante 4 días. Se lavaron las monocapas y se tiñeron/fijaron con cristal violeta al 0,5%. Para determinar la proliferación celular se midió la absorbancia a 540 nm.

Las fig. 5A y 5B muestran el efecto del anticuerpo monoclonal 2C4, el anticuerpo Trastuzumab o un anticuerpo anti-EGFR en la asociación dependiente de herregulina (HRG) de HER2 con HER3 en células MCF7 que expresaban niveles bajos/normales de HER2 (fig. 5A) y células SK-BR-3 que expresaban niveles elevados de HER2 (fig. 5B); véase el Ejemplo 2 más adelante.

Las fig. 6A y 6B comparan las actividades de anticuerpo monoclonal murino intacto 2C4 (2C4 mu) y un fragmento Fab 2C4 quimérico. La fig. 6A muestra la inhibición de unión de ¹²⁵I-HRG a células MCF7 mediante Fab 2C4 quimérico o anticuerpo monoclonal 2C4 murino intacto. Se sembraron placas de 24 pocillos con células MCF7 (1 x 10⁵ células/pocillo) y se cultivaron hasta una confluencia del 85% aproximadamente durante dos días. Se realizaron experimentos de unión tal como se describe en Lewis y col. Cancer Research 56: 1457-1465 (1996). La fig. 6B representa la inhibición de la activación de rHRG β 1 de la fosforilación de las tirosinas de p180 en células MCF7 realizada tal como se describe en Lewis y col. Cancer Research 56:1457-1465 (1996).

Las fig. 7A y 7B ilustran alineaciones de las secuencias de aminoácidos de los dominios variable ligero (V_L) (fig. 7A) y pesado (V_H) (fig. 7B) del anticuerpo monoclonal 2C4 murino (SEQ ID NO. 1 y 2, respectivamente); los dominios V_L y V_H de 2C4 humanizado versión 574 (SEQ ID NO. 3 y 4, respectivamente), y estructuras de consenso de V_L y V_H humanos (hum κ 1, kappa subgrupo ligero I; humIII, subgrupo pesado III) (SEQ ID NO. 5 y 6, respectivamente). Los asteriscos identifican las diferencias entre 2C4 humanizado versión 574 y anticuerpo monoclonal 2C4 murino o entre 2C4 humanizado versión 574 y el marco humano. Las regiones de determinación de complementariedad (CDR) están entre paréntesis.

Las fig. 8A a C muestran la unión de Fab 2C4 quimérico (Fab.v1) y de varias variantes de 2C4 humanizadas al dominio extracelular (ECD) de HER2 según se determina por ELISA en el Ejemplo 3.

La fig. 9 es un diagrama de cintas de los dominios V_L y V_H de anticuerpo monoclonal 2C4 con el esqueleto CDR blanco marcado (L1, L2, L3, H1, H2, H3). También se muestran las cadenas laterales de V_H evaluadas mediante mutagenia durante la humanización (véase el Ejemplo 3, Tabla 2).

La fig. 10 ilustra el efecto del anticuerpo monoclonal 2C4 o el Trastuzumab en la activación mediada por EGF, TGF- α o HRG de la proteincinasa activada por mitógeno (MAPK).

Las fig. 11A y 11B muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de Trastuzumab (SEQ ID NO: 14) y la cadena pesada de Trastuzumab (SEQ ID NO: 15), respectivamente.

Las fig. 12A y 12B muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de Pertuzumab (SEQ ID NO: 16) y la cadena pesada de Pertuzumab (SEQ ID NO: 17), respectivamente.

La fig. 13 ilustra, esquemáticamente, la unión de 2C4 en el sitio de unión heterodimérico de HER2, evitando con ello la heterodimerización con EGFR o HER3 activado.

La fig. 14 ilustra el acoplamiento de HER2/HER3 a las rutas MAPK y Akt.

La fig. 15 compara la actividad del Trastuzumab y el Pertuzumab.

La fig. 16 ilustra esquemáticamente los diversos dominios de HER2.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

5 I. Definiciones

[0021] Un "receptor HER" es un receptor de proteína tirosincinasa que pertenece a la familia de los receptores HER e incluye los receptores EGFR, HER2, HER3 y HER4 y otros miembros de esta familia que se identifiquen en el futuro. El receptor HER comprenderá generalmente un dominio extracelular, que puede unirse a un
10 ligando de HER; un dominio de transmembrana lipófilo; un dominio intracelular conservado de tirosincinasa; y un dominio de señalización carboxilo-terminal que incluye varios residuos de tirosina que pueden fosforilarse. El receptor HER puede ser un receptor HER de "secuencia natural" o una "variante de secuencia de aminoácidos" de la misma. Preferentemente el receptor HER es un receptor HER humano de secuencia natural.

[0022] El dominio extracelular de HER2 comprende cuatro dominios, Dominio I (residuos de aminoácidos de aproximadamente 1-195), Dominio II (residuos de aminoácidos de aproximadamente 196-320), Dominio III (residuos de aminoácidos de aproximadamente 321-488) y Dominio IV (residuos de aminoácidos de aproximadamente 489-632) (numeración de los residuos sin péptido de señal). Véase Garrett y col. Mol. Cell. 11: 495-505 (2003), Cho y col. Nature 421:756-760 (2003), Franklin y col. Cancer Cell 5:317-328 (2004), o Plowman y col. Proc. Natl. Acad. Sci.
15 90:1746-1750 (1993), y la fig. 16 en la presente memoria descriptiva.

[0023] Los términos "ErbB1," "HER1", "receptor del factor de crecimiento epidérmico" y "EGFR" se usan indistintamente en la presente memoria descriptiva y se refieren a EGFR según se desvela, por ejemplo, en
20 Carpenter y col. Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987), que incluye formas mutantes de ocurrencia natural de los mismos (por ejemplo, un EGFR mutante por delección como en Humphrey y col. PNAS (USA) 87:4207-4211 (1990)). *erbB1* se refiere al gen que codifica el producto de proteína EGFR.

[0024] Las expresiones "ErbB2" y "HER2" se usan indistintamente en la presente memoria descriptiva y se refieren a la proteína HER2 humana descrita, por ejemplo, en Semba y col., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985) y
25 Yamamoto y col. Nature 319:230-234 (1986) (número de acceso de Genebank X03363). El término "*erbB2*" se refiere al gen que codifica el ErbB2 humano y "*neu*" se refiere al gen que codifica p185^{neu} de rata. El HER2 preferido es HER2 humano de secuencia natural.

[0025] "ErbB3" y "HER3" se refieren al receptor polipéptido según se desvela, por ejemplo, en las patentes de
30 EE.UU. n° 5.183.884 y 5.480.968 así como en Kraus y col. PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989).

[0026] Los términos "ErbB4" y "HER4" en la presente memoria descriptiva se refieren al receptor polipéptido según se desvela, por ejemplo, en la solicitud de patente EP n° 599.274; Plowman y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
35 90:1746-1750 (1993); y Plowman y col., Nature, 366: 473-475 (1993), que incluye isoformas de los mismos, por ejemplo, según se desvela en el documento WO-99/19.488, publicado el 22 de abril de 1999.

[0027] Por "ligando de HER" se entiende un polipéptido que se une a y/o activa un receptor HER. El ligando de HER de particular interés en la presente memoria descriptiva es un ligando de HER humano de secuencia natural como factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Savage y col., J. Biol. Chem. 247:7612-7621 (1972)); factor de
40 crecimiento transformante alfa (TGF- α) (Marquardt y col., Science 223: 1079-1082 (1984)); anfirregulina también conocida como factor de crecimiento autocrino de 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 de unión a heparina (HB-EGF) (Higashiyama y col., Science
45 251:936-939 (1991)); epirregulina (Toyoda y col., J. Biol. Chem. 270:7495-7500 (1995); y Komurasaki y col. Oncogene 15:2841-2848 (1997)); una herregulina (véase más adelante); neurregulina-2 (NRG-2) (Carraway y col., Nature 387:512-516 (1997)); neurregulina-3 (NRG-3) (Zhang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:9562-9567 (1997)); neurregulina-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)). Entre los ligandos de HER que se unen a EGFR se incluyen EGF, TGF- α , anfirregulina,
50 betacelulina, HB-EGF y epirregulina. Entre los ligandos de HER que se unen a HER3 se incluyen herregulinas. Entre los ligandos de HER capaces de unión a HER4 se incluyen betacelulina, epirregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 y herregulinas.

[0028] "Herregulina" (HRG) cuando se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un polipéptido
55 codificado por el producto génico de herregulina según se desvela en la patente de EE.UU. n° 5.641.869 o Marchionni y col., Nature, 362:312-318 (1993). Entre los ejemplos de herregulinas se incluyen herregulina- α , herregulina- β 1, herregulina- β 2 y herregulina- β 3 (Holmes y col., Science, 256:1205-1210 (1992); y patente de EE.UU. n° 5.641.869); factor de diferenciación *neu* (NDF) (Peles y col. Cell 69: 205-216 (1992)); actividad inductora de receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls y col. Cell 72:801-815 (1993)); factores de crecimiento glial (GGF) (Marchionni
60 y col., Nature, 362:312-318 (1993)); factor derivado de las neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho y col. J. Biol.

Chem. 270:14523-14532 (1995)); γ -herregulina (Schaefer y col. Oncogene 15:1385-1394 (1997)). El término incluye fragmentos biológicamente activos y/o variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido HRG de secuencia natural, como, por ejemplo, un fragmento de dominio de tipo EGF del mismo (por ejemplo, HRG β ₁₁₇₇₋₂₄₄).

5 **[0029]** Un "dímero HER" en la presente memoria descriptiva es un dímero asociado de forma no covalente que comprende al menos dos receptores HER diferentes. Dichos complejos pueden formarse cuando una célula que expresa dos o más receptores HER se expone a un ligando de HER y puede ser aislada por inmunoprecipitación y analizada por SDS-PAGE tal como se describe en Sliwkowski y col., J. Biol. Chem., 269(20): 14661-14665 (1994), por ejemplo. Entre los ejemplos de dichos dímeros HER se incluyen los heterodímeros EGFR-HER2, HER2-HER3 y
10 HER3-HER4. Por otra parte, el dímero HER puede comprender dos o más receptores HER2 combinados con un receptor HER diferente, como HER3, HER4 o EGFR. Con el dímero pueden asociarse otras proteínas, como una subunidad de receptor de citocina (por ejemplo, gp130).

[0030] Un "sitio de unión heterodimérico" en HER2, se refiere a una región en el dominio extracelular de
15 HER2 que se pone en contacto, o interacciona con, una región en el dominio extracelular de EGFR, HER3 o HER4 con la formación así de un dímero. La región se encuentra en el Dominio II de HER2. Franklin y col. Cancer Cell 5:317-328 (2004).

[0031] "Activación de HER" o "activación de HER2" se refiere a la activación, o fosforilación, de uno
20 cualquiera o más receptores HER, o receptores HER2. Generalmente, la activación de HER tiene como resultado una transducción de señal (por ejemplo, la causada por un dominio de cinasa intracelular de un receptor HER que fosforila residuos de tirosina en el receptor HER o un polipéptido de sustrato). La activación de HER puede estar mediada por un ligando de HER que se une a un dímero HER que comprende el receptor HER de interés. El ligando de HER que se une a un dímero HER puede activar un dominio de cinasa de uno o más de los receptores HER en el
25 dímero y con ello tiene como resultado la fosforilación de residuos de tirosina en uno o más de los receptores HER y/o la fosforilación de residuos de tirosina en polipéptido(s) de sustratos adicional(es), como cinasas intracelulares Akt o MAPK.

[0032] Un polipéptido de "secuencia natural" es aquel que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un
30 polipéptido (por ejemplo, receptor HER o ligando de HER) obtenido de la naturaleza. Dichos polipéptidos de secuencia natural pueden aislarse a partir de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos. Así, un polipéptido de secuencia natural puede tener la secuencia de aminoácidos de un polipéptido humano, un polipéptido murino o un polipéptido de cualquier otra especie de mamíferos de ocurrencia natural.

[0033] El término "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de
35 aminoácidos que difieren en alguna medida de un polipéptido de secuencia natural. Por lo común, las variantes de secuencias de aminoácidos poseerán al menos una homología de aproximadamente el 70% con al menos un dominio de unión a receptor de un ligando de HER natural o con al menos un dominio de unión a ligando de un receptor HER natural, y preferentemente, tendrán una homología de al menos aproximadamente el 80%, más
40 preferentemente al menos aproximadamente el 90% con dichos dominios de unión a receptor o a ligando. Las variantes de secuencias de aminoácidos presentan sustituciones, deleciones y/o inserciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos natural.

[0034] "Homología" se define como el porcentaje de residuos en la variante de secuencia de aminoácidos
45 que son idénticos después de la alineación de las secuencias y la introducción de huecos, en caso necesario, para conseguir el porcentaje máximo de homología. Los procedimientos y programas informáticos para la alineación son bien conocidos en la técnica. Uno de dichos programas informáticos es "Align 2", propiedad de Genentech, Inc., que fue registrado con la documentación de usuario en la United States Copyright Office, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

50 **[0035]** El término "anticuerpo" en la presente memoria descriptiva se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) intactos formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpo, con la condición de que muestren la actividad biológica deseada.

[0036] El término "anticuerpo monoclonal" según se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un
55 anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto para posibles variantes que pueden aparecer durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando dichas variantes generalmente presentes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra determinantes (epítipos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente
60 homogénea, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo por algún procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden
65

prepararse mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), o pueden prepararse por procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

[0037] Los anticuerpos monoclonales en la presente memoria descriptiva incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el residuo de la cadena o cadenas es idéntico a un homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, con la condición de que muestren la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. nº 4.816.567; y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Entre los anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria descriptiva se incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, monos del Viejo Mundo, primates, etc.) y secuencias de regiones constantes humanas.

[0038] Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente que comprende la región variable de unión a antígeno del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpo.

[0039] Un "anticuerpo intacto" es aquel que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de cadena ligera (C_L) y dominios constantes de cadena pesada, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de secuencia natural humana) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

[0040] Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o una variante de región Fc de secuencias de aminoácidos) de un anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo se incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complemento; unión de receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), etc.

[0041] Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden asignarse a diferentes "clases". Existen cinco grandes clases de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden subdividirse en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

[0042] "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen los anticuerpos unidos a una célula diana y posteriormente provocan lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar la ADCC, linfocitos NK, expresan sólo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para valorar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo ADCC *in vitro*, tal como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.500.362 ó 5.821.337. Entre las células efectoras útiles para dichos ensayos se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede valorarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el desvelado en Clynes y col. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

[0043] Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan función efectora de ADCC. Entre los ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las células PBMC y los linfocitos NK. Las células efectoras pueden aislarse a partir de una fuente natural de las mismas, por ejemplo, a partir de sangre o células PBMC tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

[0044] Los términos "receptor 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. Por otra parte, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y formas procesadas alternativamente de estos receptores. Entre los receptores FcγRII se

incluyen Fc γ RIIA (un "receptor de activación") y Fc γ RIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren de forma análoga en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor de activación Fc γ RIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosinas (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor de inhibición Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosinas (ITIM) en su dominio citoplasmático. (véase revisión M. en Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los receptores FcR son objeto de revisión 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 receptores FcR, que incluyen los que serán identificados en el futuro, están comprendidos en el término "FcR" en la presente memoria descriptiva. El término incluye también el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer y col., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim y col., J. Immunol. 24:249 (1994)).

[0045] "Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula de lisar una diana en presencia de complemento. La ruta de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) que forma un complejo con un antígeno cognado. Para valorar la activación de complemento puede realizarse un ensayo CDC, por ejemplo, tal como se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

[0046] Los "anticuerpos naturales" son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de 150.000 daltons aproximadamente, compuestas por 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 diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes de disulfuro intracadena separados regularmente. Cada cadena pesada tiene un extremo un dominio variable (V_H) seguido por una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en el otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos en particular forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

[0047] El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren extensivamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular para su antígeno en particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena ligera como en los de cadena pesada. Las partes mejor conservadas de los dominios variables se denominan regiones de entramado (FR). Los dominios variables de dominios variables naturales de cadenas ligeras y pesadas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a 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 muestran diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

[0048] El término "región hipervariable" cuando se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión de antígeno. La región hipervariable comprende generalmente residuos de aminoácidos de una "región de determinación de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de 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 residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Los residuos de la "región de entramado" o "FR" son los residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable tal como se define en la presente memoria descriptiva.

[0049] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de unión a antígeno y sigue siendo capaz de reticulación con antígeno.

[0050] "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al

anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprenda sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y de unirse a antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

5 **[0051]** El fragmento Fab contiene también 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 residuos en el extremo carboxi del dominio de cadena pesada CH1 que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente memoria descriptiva para Fab' en el que el o los
10 F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. Se conocen también otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0052] Las "cadenas ligeras" de anticuerpos de cualquier especie de vertebrados pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos
15 de sus dominios constantes.

[0053] Los fragmentos de anticuerpos "Fv de cadena única" o "scFv" comprenden los dominios de anticuerpos V_H y V_L, en los que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que
20 permite que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de scFv véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994). Los fragmentos scFv de anticuerpos contra HER2 se describen en el documento WO-93/16.185; en la patente de EE.UU. n° 5.571.894; y en la patente de EE.UU. n° 5.587.458.

25 **[0054]** El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, unos fragmentos que comprenden un dominio pesado variable (V_H) conectado a un dominio ligero variable (V_L) en la misma cadena de polipéptidos (V_H-V_L). Usando un ligador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y se crean dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen
30 más en detalle, por ejemplo, en los documentos EP-404.097; WO-93/11.161; y en Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

[0055] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los
35 anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como, por ejemplo, ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de entramado (FR) de la inmunoglobulina humana son sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos
40 humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para afinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos entre al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina
45 humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para ampliar los 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).

50 **[0056]** Entre los anticuerpos humanizados contra HER2 se incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 o Trastuzumab (HERCEPTIN[®]) tal como se describe en la Tabla 3 de la patente de EE.UU. 5.821.337; anticuerpos 520C9 humanizados (documento WO-93/21.319) y anticuerpos 2C4 humanizados tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

55 **[0057]** Para los fines de la presente memoria descriptiva, "Trastuzumab," "HERCEPTIN[®]" y "huMAb4D5-8" se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada en las SEQ ID NO. 14 y 15, respectivamente.

[0058] En la presente memoria descriptiva, "Pertuzumab" y "OMNITARG[™]" se refieren a un anticuerpo que
60 comprende las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera en las SEQ ID NO. 16 y 17, respectivamente.

[0059] Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo (según se define en la presente memoria descriptiva) que no está conjugado con una molécula heteróloga, como una radiomarca o fracción citotóxica.
65

[0060] Un anticuerpo "aislado" es aquel que ha sido identificado y separado y/o recuperado a partir de un

componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En formas de realización preferidas, el anticuerpo será purificado (1) hasta más de un 95% en peso de anticuerpo según se determina mediante el método de Lowry, y con la máxima preferencia más del 99% en peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. Anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, en general, un anticuerpo aislado será preparado mediante al menos una etapa de purificación.

[0061] Un anticuerpo contra HER2 que "inhibe la dimerización de HER más eficazmente que el Trastuzumab" es aquel que reduce o elimina los dímeros HER más eficazmente (por ejemplo, al menos aproximadamente con una eficacia doble) que el Trastuzumab. Preferentemente, dicho anticuerpo inhibe la dimerización de HER2 al menos aproximadamente con la misma eficacia que un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en anticuerpo monoclonal 2C4 murino, un fragmento Fab de anticuerpo monoclonal 2C4 murino, Pertuzumab y un fragmento Fab de Pertuzumab. Es posible evaluar la inhibición de la dimerización de HER estudiando los dímeros HER directamente, o evaluando la activación de HER, o la señalización en la dirección 3', que resulta de la dimerización de HER, y/o evaluando el sitio de unión a anticuerpo-HER2, etc. Se describen ensayos para detección selectiva de anticuerpos con la capacidad de inhibir la dimerización de HER más eficazmente que el Trastuzumab en Agus y col. Cancer Cell 2: 127-137 (2002) y en los Ejemplos 1-2 y 4 en la presente memoria descriptiva. Exclusivamente a modo de ejemplo, se puede realizar un ensayo de inhibición de dimerización de HER evaluando, por ejemplo, la inhibición de formación de dímeros HER (véase, por ejemplo, la fig. 1A-B de Agus y col. Cancer Cell 2: 127-137 (2002); y el Ejemplo 2 en la presente memoria descriptiva); la reducción en el ligando de activación de HER de células que expresan dímeros HER (Ejemplo 1 en la presente memoria descriptiva y fig. 2A-B de Agus y col. Cancer Cell 2: 127-137 (2002), por ejemplo); el bloqueo de la unión de ligando de HER a células que expresan dímeros HER (Ejemplo 1 en la presente memoria descriptiva, y fig. 2E de Agus y col. Cancer Cell 2: 127-137-(2002), por ejemplo); la inhibición del crecimiento celular de células cancerosas (por ejemplo, células MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D) que expresan dímeros HER en presencia (o ausencia) de ligando de HER (Ejemplo 1 en la presente memoria descriptiva y fig. 3A-D de Agus y col. Cancer Cell 2: 127-137 (2002), por ejemplo); la inhibición de señalización en la dirección 3' (por ejemplo, inhibición de fosforilación de AKT dependiente de HRG o inhibición de fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF α) (véase Ejemplo 4 en la presente memoria descriptiva, y fig. 2C-D de Agus y col. Cancer Cell 2: 127-137 (2002), por ejemplo). También se puede evaluar si el anticuerpo inhibe la dimerización de HER estudiando el sitio de unión a anticuerpo-HER2, por ejemplo, evaluando una estructura o modelo, por ejemplo una estructura cristalina, del anticuerpo unido a HER2 (véase, por ejemplo, Franklin y col. Cancer Cell 5:317-328 (2004)).

[0062] El anticuerpo contra HER2 puede "inhibir la fosforilación de AKT dependiente de HRG" y/o inhibir la "fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF α " más eficazmente (por ejemplo, al menos con una eficacia doble) que el Trastuzumab (véase Agus y col. Cancer Cell 2: 127-137 (2002) y el Ejemplo 4 en la presente memoria descriptiva, a modo de ejemplo).

[0063] El anticuerpo contra HER2 puede ser uno que "no inhiba la escisión del ectodominio de HER2" (Molina y col. Cancer Res. 61:4744-4749(2001)).

[0064] Un anticuerpo contra HER2 que "se une a un sitio de unión heterodimérico" de HER2, se une a residuos en el dominio II (y opcionalmente también se une a residuos en otros de los dominios del dominio extracelular del HER2, por ejemplo, los dominios I y III), y puede inducir impedimento estérico, al menos en cierta medida, para la formación de un heterodímero HER2-EGFR, HER2-HER3 o HER2-HER4. Franklin y col. Cancer Cell 5:317-328 (2004) caracterizan la estructura cristalina de HER2-Pertuzumab, depositada en el RCSB Protein Data Bank (Código ID IS78), que ilustra un anticuerpo de ejemplo que se une al sitio de unión heterodimérico de HER2.

[0065] Un anticuerpo que "se une al dominio II" de HER2 se une a residuos en el dominio II y opcionalmente a residuos en otro u otros dominios de HER2, por ejemplo, los dominios I y III. Preferentemente el anticuerpo que se une al dominio II se une a la unión entre los dominios I, II y III de HER2.

[0066] Un "ovario" es uno de los dos pequeños órganos en forma de almendra situados a ambos lados del útero en una hembra.

[0067] Una "trompa de Falopio" u "oviducto" es uno de los dos finos tubos que conducen desde los ovarios de las hembras de mamíferos al útero.

[0068] El "peritoneo" es el recubrimiento epitelial de una cavidad corporal como, por ejemplo, el abdomen.

[0069] "Cáncer de ovarios" es una neoplasia maligna potencialmente mortal, que se desarrolla en uno o los dos ovarios. En el momento en que aparecen los síntomas del cáncer de ovarios, el tumor ovárico puede haber

crecido lo suficiente como para desprender células cancerosas en todo el abdomen. Las células de cáncer de ovarios que se han extendido fuera de los ovarios se refieren como cánceres de ovarios metastásicos. Los tumores ováricos suelen dispersarse hacia el diafragma, el intestino y/o el epiplón (una capa grasa que recubre y acolcha los órganos del abdomen). Las células cancerosas pueden extenderse también a otros órganos a través de los canales linfáticos y el torrente sanguíneo. El cáncer de ovarios que se tratará en la presente memoria descriptiva incluye las tres clases principales de tumores ováricos malignos, que son, tumor epitelial, tumor de las células germinales y tumor estromal.

[0070] "Carcinoma peritoneal primario" se refiere a un cáncer que aparece en el peritoneo. El carcinoma peritoneal primario puede ser muy similar al cáncer de ovarios epitelial en términos de aspecto microscópico, síntomas, patrón de difusión y pronóstico. Una mujer a la que se le hayan extirpado los ovarios puede tener aún carcinoma peritoneal primario.

[0071] "Carcinoma de las trompas de Falopio" se refiere a cáncer de la trompa de Falopio y/o el ligamento ancho.

[0072] Un "tumor epitelial" se desarrolla en una capa de células de forma cúbica conocidas como epitelio germinal, que rodea al exterior de los ovarios. Los tumores epiteliales representan hasta el 90% de todos los cánceres de ovarios.

[0073] Un "tumor de las células germinales" se encuentra en la o las células de maduración de ovocitos del ovario. Los tumores de las células germinales, que representan aproximadamente el 3% de todos los cánceres de ovarios, se producen con la máxima frecuencia en adolescentes y mujeres jóvenes.

[0074] Un "tumor estromal" se desarrolla a partir de células del tejido conjuntivo que mantienen unido el ovario y que producen las hormonas femeninas, estrógeno y progesterona. Los tumores estromales representan el 6% de todos los cánceres de ovarios.

[0075] Una "muestra de tumor" en la presente memoria descriptiva es una muestra obtenida de, o que comprende células tumorales de, un tumor de un paciente. Entre los ejemplos de muestras de tumores en la presente memoria descriptiva se incluyen, pero no se limitan a, biopsias de tumores, células de tumor circulantes, proteínas plasmáticas circulantes, líquido ascítico, cultivos de células primarias o líneas celulares obtenidas de tumores o que muestran propiedades de tipo tumoral, así como muestras de tumores conservadas, como muestras de tumores integradas en parafina y fijadas con formalina.

[0076] Un "agente de inhibición del crecimiento" cuando se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa HER *in vitro* o *in vivo*. Así, el agente de inhibición del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células que expresan HER en fase S. Entre los ejemplos de agentes de inhibición del crecimiento se incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto que en la fase S), como, por ejemplo, agentes que inducen cese G1 y cese de la fase M. Entre los agentes clásicos de bloqueo de la fase M se incluyen los inhibidores de las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y topo II como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que realizan cese de G1 también se extienden al cese de la fase S, por ejemplo, agentes de alquilación de ADN como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn y Israel, ed., capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami y col. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente pág. 13.

[0077] Los ejemplos de anticuerpos "inhibidores del crecimiento" son aquellos que se unen a HER2 e inhiben el crecimiento de células cancerosas que sobreexpresan HER2. Los anticuerpos inhibidores del crecimiento preferidos contra HER2 inhiben el crecimiento de células tumorales de tumor mamario de SK-BR-3 en cultivo celular en más del 20%, y preferentemente más del 50% (por ejemplo, de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 100%) en una concentración de anticuerpos de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml, en el que la inhibición del crecimiento se determina seis días después de la exposición de las células SK-BR3 al anticuerpo (véase la patente de EE.UU. nº 5.677.171 concedida el 4 de octubre de 1997). El ensayo de inhibición del crecimiento de células SK-BR-3 se describe en más detalle en dicha patente y más adelante. El anticuerpo inhibidor del crecimiento preferido es una variante humanizada del anticuerpo monoclonal 4D5 murino, por ejemplo, Trastuzumab.

[0078] Un anticuerpo que "induce apoptosis" es aquel que induce una muerte celular programada según se determina por unión de anexina V, fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). La célula es habitualmente una célula que sobreexpresa el receptor HER2. Preferentemente la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula mamaria, ovárica, del estómago, endometrial, de la glándula salivar, del pulmón, del riñón, del colon, tiroidea, pancreática o de la vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, célula Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. Se dispone de varios procedimientos para evaluar los episodios celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de fosfatidilserina (PS) puede medirse mediante la unión a

anexina; la fragmentación de ADN puede evaluarse a través de disposición en escala de ADN; y la concentración nuclear/de cromatina junto con fragmentación de ADN puede evaluarse mediante cualquier incremento en las células hipodiploideas. Preferentemente, el anticuerpo que induce apoptosis es aquel que tiene como resultado aproximadamente de 2 a 50 veces, preferentemente aproximadamente de 5 a 50 veces, y con la máxima preferencia aproximadamente de 10 a 50 veces, la inducción de unión a anexina con respecto a una célula no tratada en un ensayo de unión a anexina que usa células BT474 (véase más adelante). Los ejemplos de anticuerpos contra HER2 que inducen apoptosis son 7C2 y 7F3.

[0079] El "epítipo 2C4" es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se une el anticuerpo 2C4. Con el fin de realizar la detección selectiva de anticuerpos que se unen al epítipo 2C4, puede realizarse un ensayo rutinario de interbloqueo como el que se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Alternativamente, puede realizarse cartografía de epítipos para valorar si el anticuerpo se une al epítipo 2C4 de HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más residuos en la región de aproximadamente el residuo 22 a aproximadamente el residuo 584 de HER2, inclusive; véanse las figs. 1A-B). El epítipo 2C4 comprende residuos del dominio II en el dominio extracelular de HER2.2C4 y Pertuzumab se une al dominio extracelular de HER2 en la unión de los dominios I, II y III. Franklin y col. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

[0080] El "epítipo 4D5" es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se une el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y Trastuzumab. Este epítipo es cercano al dominio de transmembrana de HER2, y está dentro del Dominio IV de HER2. Para realizar la detección selectiva de anticuerpos que se unen al epítipo 4D5, puede realizarse un ensayo rutinario de interbloqueo como se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Alternativamente, puede realizarse una cartografía de epítipos para valorar si el anticuerpo se une al epítipo 4D5 de HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más residuos en la región de aproximadamente el residuo 529 a aproximadamente el residuo 625, inclusive; véanse las fig. 1A-B).

[0081] El "epítipo 7C2/7F3" es la región en el extremo N, dentro del Dominio I, del dominio extracelular de HER2 a la que se unen los anticuerpos 7C2 y/o 7F3 (ambos depositados en la ATCC, véase más adelante). Para realizar la detección selectiva de anticuerpos que se unen al epítipo 7C2/7F3, puede realizarse un ensayo rutinario de interbloqueo tal como se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Alternativamente, puede realizarse una cartografía de epítipos para establecer si el anticuerpo se une al epítipo 7C2/7F3 en HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más entre residuos en la región de aproximadamente el residuo 22 a aproximadamente el residuo 53 de HER2; véanse las fig. 1A-B).

[0082] "Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Las personas que necesitan tratamiento incluyen las que ya padecen el cáncer así como aquellas en las que el cáncer debe prevenirse. Por ello, el paciente destinado a tratamiento según la presente memoria descriptiva puede haber recibido un diagnóstico de cáncer o mostrar predisposición o susceptibilidad al cáncer.

[0083] El término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar el cáncer en el paciente. La cantidad eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferentemente detener) metástasis tumorales; 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 destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La cantidad eficaz puede prolongar la supervivencia sin progresión (por ejemplo, según se mide por los Criterios de Evaluación de Respuestas para Tumores Sólidos, RECIST, o cambios CA-125), lo que tiene como resultado una respuesta objetiva (que incluye una respuesta parcial, PR, o una respuesta completa, CR), aumenta el tiempo total de supervivencia y/o mejora uno o más síntomas de cáncer (por ejemplo, según ha sido evaluado por FOCI).

[0084] "Supervivencia total" se refiere al paciente que sigue con vida durante un periodo de tiempo predefinido, por ejemplo, 1 año, 5 años, etc., por ejemplo, desde el momento del diagnóstico o el tratamiento.

[0085] "Supervivencia sin progresión" se refiere al paciente que sigue con vida, sin que el cáncer empeore.

[0086] Una "respuesta objetiva" se refiere a una respuesta mensurable, que incluye respuesta completa (CR) o respuesta parcial (PR).

[0087] Por "respuesta completa" o "remisión completa" se alude a la desaparición de todos los signos de cáncer como respuesta al tratamiento. Esto no siempre significa que el cáncer se haya curado.

[0088] "Respuesta parcial" se refiere a una disminución en el tamaño de uno o más tumores o lesiones, o en la extensión del cáncer en el cuerpo, como respuesta al tratamiento.

[0089] Un "cáncer que expresa HER" es aquel que comprende células que tienen proteína HER presente en su superficie celular.

[0090] Un "cáncer que expresa HER2" es aquel que produce niveles suficientes de HER2 en la superficie de las células del mismo, de manera que un anticuerpo contra HER2 puede unirse al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer.

5

[0091] Un cáncer que "sobrescribe" un receptor HER es aquel que tiene niveles significativamente superiores de un receptor HER, por ejemplo HER2, en la superficie celular del mismo, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar causada por amplificación génica o por aumento en la transcripción o la traducción. La sobreexpresión del receptor HER puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando el aumento en los niveles de la proteína HER presente en la superficie de una célula (por ejemplo, por medio de un ensayo de inmunohistoquímica; IHQ). Alternativamente, o adicionalmente, es posible medir los niveles de ácido nucleico que codifica HER en la célula, por ejemplo mediante técnicas de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH; véase el documento WO-98/4.547 publicado en octubre de 1998), transferencia Southern o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión de receptor HER midiendo el antígeno desprendido (por ejemplo, dominio extracelular HER) en un fluido biológico como el suero (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.933.294 concedida el 12 de junio de 1990; el documento WO-91/05.264 publicado el 18 de abril de 1991; la patente de EE.UU. 5.401.638 concedida el 28 de marzo de 1995; y Sias y col. J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, se dispone de diversos ensayos *in vivo* para el experto en la materia. Por ejemplo, es posible exponer células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que esté marcado opcionalmente con una marca detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y puede evaluarse la unión del anticuerpo a células en el paciente, por ejemplo, mediante barrido externo para radioactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente expuesto previamente al anticuerpo.

[0092] Por el contrario, un cáncer que "no presenta sobreexpresión de receptor HER2" es aquel que no expresa niveles superiores a los normales de receptor HER2 en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido.

[0093] Un cáncer que "sobrescribe" un ligando de HER es aquel que produce niveles significativamente superiores de ese ligando en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar causada por amplificación génica o por aumento en la transcripción o traducción. La sobreexpresión del ligando de HER puede determinarse de forma diagnóstica evaluando los niveles del ligando (o del ácido nucleico que lo codifica) en el paciente, por ejemplo en una biopsia de tumor o por diversos ensayos de diagnóstico como IHQ, FISH, transferencia Southern, PCR o ensayos *in vivo* descritos anteriormente.

35

[0094] El término "agente citotóxico" según se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o causa la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153 Bi212, P32 e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de las mismas.

40

[0095] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes de alquilación como tiotepa y ciclosfosfamida CYTOXAN[®]; sulfonatos de alquilo como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL[®]); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (que incluye el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN[®]), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR[®]), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; caliestatina; CC-1065 (que incluye sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiestatina; mostazas nitrogenadas como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos como los antibióticos de enedina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omega11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, que incluye dinemicina A; bisfosfonatos, como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enedina de cromoproteína relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMICINA[®] doxorubicina (que incluye morfolino-doxorrubicina, cianomorfolinodoxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como fludarabina, 6-mercaptapurina,

65

tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-suprarrenales como antinoglutetimida, mitotano, trilostano; regenerador de ácido fólico como ácido frolinico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; 5 amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinán; lonidainina; maytansinoides como maytansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-
 10 trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ sin cromóforo, formulación de nanopartículas diseñadas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc
 15 Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides como ácido retinoico; capecitabina; sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de
 20 cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores como CHOP, una abreviación para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviación para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

[0096] También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la
 25 acción de las hormonas en tumores como anti-estrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (que incluye tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®,
 30 formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDAX®, y antiandrógenos como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolide y goserelina; así como troxacitabina (un análogo del nucleósido citosina 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en proliferación celular aberrante, como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas como vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna
 35 ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rMRH; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

[0097] Un "agente quimioterapéutico antimetabolito" es un agente que es estructuralmente similar a un
 40 metabolito, pero no puede ser usado por el cuerpo de una forma productiva. Muchos agentes quimioterapéuticos antimetabolito interfieren con la producción de los ácidos nucleicos, ARN y ADN. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos antimetabolito se incluyen gemcitabina (GEMZAR®), 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina (XELODA™), 6-mercaptopurina, metotrexato, 6-tioguanina, pemetrexed, raltitrexed, arabinosilcitosina ARA-C citarabina (CYTOSAR-U®), dacarbazina (DTIC-DOME®), azocitosina, desoxicitosina, piridimidenol, fludarabina
 45 (FLUDARA®), cladribina, 2-desoxi-D-glucosa, etc. El agente quimioterapéutico antimetabolito preferido es la gemcitabina.

[0098] "Gemcitabina" o "monoclorhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero b)" es un análogo de
 50 nucleósido que muestra actividad antitumoral. La fórmula empírica para la gemcitabina HCl es C₉H₁₁F₂N₃O₄ · HCl. El HCl de gemcitabina es comercializado por Eli Lilly con el nombre comercial GEMZAR®.

[0099] Un "agente quimioterapéutico a base de platino" comprende un compuesto orgánico que contiene
 platino como parte integral de la molécula. Entre los ejemplos de agente quimioterapéutico a base de platino se incluyen carboplatino, cisplatino y oxaliplatino.

[0100] Por "quimioterapia a base de platino" se entiende terapia con uno o más agentes quimioterapéuticos a
 base de platino, opcionalmente en combinación con uno o más de otros agentes quimioterapéuticos.

[0101] Por cáncer "resistente al platino" se entiende que el paciente de cáncer ha progresado mientras
 60 recibía quimioterapia a base de platino (es decir, el paciente es "refractario al platino"), o el paciente ha progresado en un plazo de 12 meses (por ejemplo, en 6 meses) después de completar un régimen de quimioterapia basado en platino.

[0102] Según se usa en la presente memoria descriptiva, el término "fármaco dirigido contra EGFR" se refiere
 65 a un agente terapéutico que se une a EGFR y, opcionalmente, inhibe la activación de EGFR. Entre los ejemplos de dichos agentes se incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Entre los ejemplos de

anticuerpos que se unen a EGFR se incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase la patente de EE.UU. n° 4.943.533, Mendelsohn y col.) y variantes de los mismos, como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX[®]) y 225 humano reformado (H225) (véase documento WO-96/40.210, Imclone Systems Inc.); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (patente de EE.UU. n° 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR tal como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, como ABX-EGF (véase documento WO-98/50.433, Abgenix). El anticuerpo anti-EGFR puede estar conjugado con un agente citotóxico, generando así un inmunoconjugado (véase, por ejemplo, el documento EP-659.439-A2, Merck Patent GmbH). Entre los ejemplos de moléculas pequeñas que se unen a EGFR se incluyen ZD1839 o Gefitinib (IRESSA[™]); AstraZeneca), CP-358774 o Erlotinib HCL (TARCEVA[™]; Genentech/OSI) y AG 1478, AG1571 (SU 5271; Sugen).

[0103] Un "inhibidor de tirosincinasa" es una molécula que inhibe en cierta medida la actividad de tirosincinasa de una tirosincinasa como, por ejemplo, un receptor HER. Entre los ejemplos de dichos inhibidores se incluyen los fármacos dirigidos contra EGFR observados en el párrafo precedente así como un inhibidor de tirosincinasa HER2 de moléculas pequeñas como TAK165 disponible en Takeda, inhibidores HER duales como EKB-569 (disponible en Wyeth) que se unen preferentemente a EGFR pero inhiben células de sobreexpresión de HER2 y EGFR, GW572016 (disponible en Glaxo) un inhibidor de tirosincinasa de HER2 y EGFR oral, y PKI-166 (disponible en Novartis); inhibidores pan-HER como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de Raf-1 como agente antisentido ISIS-5132 disponible en ISIS Pharmaceuticals que inhibe la señalización de Raf-1; inhibidores TK no dirigidos a HER como mesilato de Imatinib (Gleevec[™]) disponible en Glaxo; inhibidor de cinasa I regulado extracelular de MAPK I CI-1040 (disponible en Pharmacia); quinazolininas, como PD 153035, 4-(3-cloroanilino)quinazolinina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidinas; curcumina (diferuloilmetano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen fracciones de nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (por ejemplo, las que se unen a ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (patente de EE.UU. n° 5.804.396); trifostinas (patente de EE.UU. n° 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores pan-HER como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de Imatinib (Gleevac; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o tal como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patentes: patente de EE.UU. n° 5.804.396; WO-99/09.016 (American Cyanamid); WO-98/43.960 (American Cyanamid); WO-97/38.983 (Warner Lambert); WO-99/06.378 (Warner Lambert); WO-99/06.396 (Warner Lambert); WO-96/30.347 (Pfizer, Inc); WO-96/33.978 (Zeneca); WO-96/3.397 (Zeneca); y WO-96/33.980 (Zeneca).

[0104] Un "agente antiangiogénico" se refiere a un compuesto que bloquea, o interfiere con, en cierto grado, el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor antiangiogénico puede, por ejemplo, ser una molécula pequeña o un anticuerpo que se une a un factor de crecimiento o un receptor de factor de crecimiento implicado en la promoción de la angiogenia. El factor antiangiogénico preferido en la presente memoria descriptiva es un anticuerpo que se une a Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), como Bevacizumab (AVASTIN[®]).

[0105] El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Son ejemplos de dichas citocinas las linfocinas, las monocinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen la hormona del crecimiento como hormona del crecimiento humana, hormona del crecimiento humana de N-metionilo y hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas de glucoproteínas como hormona foliculoestimulante (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral α y β ; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento de tipo insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones como interferón α , β y γ ; factores estimulantes de colonias (CSF) como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) como IL-1, IL-1 α , 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 como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando de kit (KL). Según se usa en la presente memoria descriptiva, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural.

II. Producción de anticuerpos contra HER2

[0106] A continuación se proporciona una descripción sobre técnicas ilustrativas para la producción de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención. El antígeno HER2 que se usará para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de HER2 o una parte del mismo, que contiene el epítipo deseado. Alternativamente, pueden usarse células que expresan HER2 en su superficie celular (por ejemplo, células NIH-3T3 transformadas para mostrar sobreexpresión HER2; o una línea celular de carcinoma

tal como las células SK-BR-3, véase Stancovski y col. PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991)) para generar anticuerpos. Otras formas de HER2 útiles para generar anticuerpos serán evidentes para el experto en la materia.

(i) *Anticuerpos policlonales*

5

[0107] Los anticuerpos policlonales se cultivan preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que sea inmunógena en la especie que se someterá a inmunización, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o de derivación, por ejemplo, el éster de maleimidobenzosulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en los que R y R^1 son diferentes grupos alquilo.

[0108] Los animales son inmunizados contra el antígeno, los conjugados inmunógenos o sus derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde se proporciona una administración de refuerzo a los animales con de 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De 7 a 14 días más tarde, se extrae sangre a los animales y se somete a ensayo el suero en cuanto a valoración de anticuerpos. Se proporciona una administración de refuerzo a los animales hasta el nivel de saturación de la valoración. Preferentemente, se administra el refuerzo al animal con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado para una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también pueden prepararse en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, se usan de forma adecuada agentes de agregación como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria.

25

(ii) *Anticuerpos monoclonales*

[0109] Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones de ocurrencia natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Así, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como distinto de una mezcla de anticuerpos discretos.

[0110] Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., Nature, 256:495 (1975), o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (patente de EE.UU. n° 4.816.567).

[0111] En el procedimiento de hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal hospedador apropiado, como un hámster, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento para inducir que los linfocitos produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente a la proteína usada para inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma que usan un agente de fusión adecuado, como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

[0112] Las células de hibridoma así preparadas se siembran en placa y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parental carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

50

[0113] Las células de mieloma preferidas son las que se fusionan con eficacia, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpo mediante las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio como medio HAT. Entre ellas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y células SP-2 o cX63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EE.UU. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); y Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

60

[0114] Se somete a ensayo el medio de cultivo en el que se cultivan células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de la unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

65

[0115] La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de

Scatchard de Munson y col., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

- [0116]** Después de que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse limitando los procedimientos de dilución y cultivándolos mediante procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Entre los medios de cultivo adecuados para este fin se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.
- 10 **[0117]** Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, el líquido de ascitis o el suero por procedimientos convencionales de purificación de anticuerpos como, por ejemplo, proteína A-Sepharosa, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía por afinidad.
- 15 **[0118]** El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales es fácil de aislar y secuenciar usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son susceptibles de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma actúan como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que a continuación son transfectados en células hospedadoras como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producen proteína de anticuerpos, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y col., *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).
- 25 **[0119]** En una forma de realización adicional, pueden aislarse anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks y col., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Así, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para aislamiento de anticuerpos monoclonales.
- 30 **[0120]** El ADN puede ser modificado también, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación para dominios constantes de cadenas pesadas y cadenas ligeras humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. nº 4.816.567; y Morrison, y col., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o por unión covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulinas de parte o la totalidad de la secuencia de codificación para un polipéptido de no inmunoglobulina.
- 35 **[0121]** Normalmente dichos polipéptidos de no inmunoglobulina están sustituidos para los dominios constantes de un anticuerpo, o están sustituidos para los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.
- 40 **[0122]** Normalmente dichos polipéptidos de no inmunoglobulina están sustituidos para los dominios constantes de un anticuerpo, o están sustituidos para los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.
- 45 **[0123]** Normalmente dichos polipéptidos de no inmunoglobulina están sustituidos para los dominios constantes de un anticuerpo, o están sustituidos para los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

(iii) Anticuerpos humanizados

- [0122]** Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos se han descrito en la técnica. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él para formar una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se refieren a menudo como residuos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y col. (Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. nº 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de región hipervariable y posiblemente algunos residuos FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.
- 50 **[0123]** La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se usarán para preparar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el procedimiento denominado de "ajuste óptimo", se realiza una detección selectiva de la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor frente a la biblioteca completa de secuencias conocidas de dominios variables humanos. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como región de entramado (FR) humana para el
- 55 **[0123]** La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se usarán para preparar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el procedimiento denominado de "ajuste óptimo", se realiza una detección selectiva de la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor frente a la biblioteca completa de secuencias conocidas de dominios variables humanos. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como región de entramado (FR) humana para el
- 60 **[0123]** La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se usarán para preparar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el procedimiento denominado de "ajuste óptimo", se realiza una detección selectiva de la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor frente a la biblioteca completa de secuencias conocidas de dominios variables humanos. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como región de entramado (FR) humana para el

anticuerpo humanizado (Sims y col., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia y col., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Otro procedimiento usa una región de entramado particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede usarse el mismo entramado para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta y col., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

[0124] Es importante además que los anticuerpos sean humanizados con conservación de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Los modelos de inmunoglobulinas tridimensionales están disponibles comúnmente y resultan familiares para el experto en la materia. Se dispone de programas informáticos que ilustran y visualizan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas muestras permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulinas candidatas, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptora e importada de manera que se consiga la característica deseada del anticuerpo, como un aumento de la afinidad para el o los antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable se encuentran implicados directamente y de la forma más sustancial en la influencia en la unión a antígeno.

[0125] El Ejemplo 3 mostrado a continuación describe la producción de anticuerpos humanizados de ejemplo contra HER2 que se unen a HER2 y bloquean la activación de ligando de un receptor HER. El anticuerpo humanizado de particular interés en la presente memoria descriptiva bloquea la activación mediada por EGF, TGF- α y/o HRG de MAPK esencialmente con la misma eficacia que el anticuerpo monoclonal 2C4 murino (o un fragmento Fab del mismo) y/o se une a HER2 esencialmente con la misma eficacia que el anticuerpo monoclonal 2C4 murino (o un fragmento Fab del mismo). El anticuerpo humanizado en la presente memoria descriptiva puede comprender, por ejemplo, residuos de región hipervariable no humana incorporados en un dominio pesado variable humano y puede comprender además una sustitución de la región de entramado (FR) en una posición seleccionada entre el grupo que consiste en 69H, 71H y 73H usando el sistema de numeración de dominios variables expuesto en Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una forma de realización, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones de FR en dos o en las tres posiciones 69H, 71H y 73H.

[0126] Un anticuerpo humanizado de interés ilustrativo en la presente memoria descriptiva comprende residuos de determinación de complementariedad de dominio pesado variable GFTFTDYTMX, en el que X es preferentemente D o S (SEQ ID NO: 7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID NO: 8); y/o NLGPSFYFDY (SEQ ID NO: 9), que comprende opcionalmente modificaciones de aminoácidos de esos residuos CDR, por ejemplo, en los que las modificaciones mantienen o mejoran esencialmente la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias CDR pesadas variables anteriores. Dichas variantes de anticuerpo pueden prepararse mediante maduración de afinidad, por ejemplo, tal como se describe más adelante. El anticuerpo humanizado más preferido comprende la secuencia de aminoácidos de dominio pesado variable en SEQ ID NO: 4.

[0127] El anticuerpo humanizado puede comprender residuos de determinación de complementariedad de dominio ligero variable KASQDVSIGVA (SEQ ID NO: 10); SASYX1X2X3, en los que X1 es preferentemente R o L, X2 es preferentemente Y o E, y X3 es preferentemente T o S (SEQ ID NO: 11); y/o QQYYIYPYT (SEQ ID NO: 12), por ejemplo, además de los residuos CDR de dominio pesado variable del párrafo anterior. Dichos anticuerpos humanizados comprenden opcionalmente modificaciones de aminoácidos de los residuos CDR anteriores, por ejemplo, en los que las modificaciones mantienen o mejoran esencialmente la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante del anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos de las secuencias CDR ligeras variables anteriores. Dichas variantes de anticuerpos pueden prepararse mediante maduración de afinidad, por ejemplo, tal como se describe más adelante. El anticuerpo humanizado más preferido comprende la secuencia de aminoácidos de dominio ligero variable en SEQ ID NO: 3.

[0128] La presente solicitud contempla también anticuerpos madurados por afinidad que se unen a HER2 y bloquean la activación de ligando de un receptor HER. El anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, por ejemplo, uno que comprende las secuencias variables ligera y/o pesada de SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente (es decir, variante 574). El anticuerpo madurado por afinidad se une preferentemente al receptor HER2 con una afinidad superior a la de 2C4 murino o variante 574 (por ejemplo, de aproximadamente dos o aproximadamente cuatro veces, hasta aproximadamente 100 veces o aproximadamente 1.000 veces de mejora de la afinidad, por ejemplo, según se valora usando una ELISA de HER2-dominio extracelular (ECD)). Entre los residuos CDR pesados de ejemplo para la sustitución se incluyen H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, o combinaciones de dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de estos residuos). Entre los ejemplos de residuos CDR ligeros variables para la alteración se incluyen L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94,

L96, L97 o combinaciones de dos o más (por ejemplo, dos a tres, cuatro, cinco o hasta aproximadamente diez de estos residuos).

[0129] Se contemplan varias formas del anticuerpo humanizado o el anticuerpo madurado por afinidad. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o el anticuerpo madurado por afinidad puede ser un fragmento de anticuerpo, como un Fab, que está conjugado opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un anticuerpo intacto, como un anticuerpo IgG1 intacto.

10 (iv) *Anticuerpos humanos*

[0130] Como una alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión (J_H) de cadena pesada de anticuerpo en ratones mutantes de línea germinal o quiméricos tiene como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la serie génica de inmunoglobulinas de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal tiene como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la prueba de provocación de antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann y col., Year in Immuno., 7:33 (1993); y las patentes de EE.UU. nº 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

[0131] Alternativamente, puede usarse la tecnología de expresión de fagos (McCafferty y col., Nature 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios génicos de dominio variable (V) de inmunoglobulinas de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpos son clonados en el mismo marco de lectura en un gen de proteína de envoltura mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, como M13 o fd, y se expresa como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula fágica. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma fágico, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo tienen también como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Así, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La expresión fágica puede realizarse en una diversidad de formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Para la expresión fágica pueden usarse varias fuentes de segmentos de gen V. Clackson y col., Nature, 352:624-628 (1991) aislaron una serie diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V obtenidos de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V a partir de donantes humanos inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (que incluyen autoantígenos) esencialmente según las técnicas descritas por Marks y col., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), o Griffith y col., EMBO J. 12:725-734 (1993). Véanse, también, las patentes de EE.UU. nº 5.565.332 y 5.573.905.

[0132] Tal como se expone anteriormente, también pueden generarse anticuerpos humanos mediante linfocitos B activados *in vitro* (véanse patentes de EE.UU. 5.567.610 y 5.229.275).

[0133] Se describen anticuerpos contra HER2 humanos en la patente de EE.UU. nº 5.772.997 concedida el 30 de junio de 1998 y en el documento WO-97/00.271 publicado el 3 de enero de 1997.

(v) *Fragmentos de anticuerpos*

[0134] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan y col., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ser producidos actualmente de forma directa por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos expuestas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter y col., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otro planteamiento, los fragmentos $F(ab')_2$ pueden aislarse directamente de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la materia. En otras formas de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO-93/16.185; la patente de EE.UU. nº 5.571.894; y la patente de EE.UU. nº 5.587.458. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la patente de EE.UU. 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) *Anticuerpos biespecíficos*

[0135] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos

epítomos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos pueden unirse a dos epítomos diferentes de la proteína HER2. Otros de estos anticuerpos pueden combinarse en un sitio de unión de HER2 con sitio o sitios de unión para EGFR, HER3 y/o HER4. Alternativamente, un brazo HER2 puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores Fc para IgG (Fc γ R), como Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16) de manera que se centran los mecanismos de defensa celulares en la célula que expresa HER2. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos para células que expresan HER2. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a HER2 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloide derivado de vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno de isótopo radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

[0136] El documento WO-96/16.673 describe un anticuerpo contra HER2/Fc γ RIII biespecífico y la patente de EE.UU. n° 5.837.234 desvela un anticuerpo contra HER2/Fc γ RI biespecífico IDM1 (Osidem). Se muestra un anticuerpo contra HER2/Fc α biespecífico en el documento WO-98/02.463. La patente de EE.UU. n° 5.821.337 enseña un anticuerpo contra HER2/CD3 biespecífico. MDX-210 es un Ac contra HER2-Fc γ RIII biespecífico.

[0137] Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein y col., Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la selección aleatoria de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía por afinidad, es bastante pesada, y los rendimientos del producto son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO-93/08.829, y en Trauneker y col., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

[0138] Según un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, las regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las funciones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y son cotransfectados, en un organismo hospedador adecuado. Así se proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en formas de realización cuando proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usados en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o para las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en proporciones iguales tiene como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no tienen una importancia especial.

[0139] En una forma de realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas, debido a que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo la mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se desvela en el documento WO-94/04.690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

[0140] Según otro enfoque descrito en la patente de EE.UU. n° 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse de modo que se eleve al máximo el porcentaje de heterodímeros que son recuperados del cultivo celular recombinante. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, se sustituye una o más pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo por cadenas laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensadoras de tamaño idéntico o similar de la o las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las grandes cadenas laterales de aminoácidos por cadenas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Así se proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto al de otros productos finales no deseados como los homodímeros.

[0141] Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede estar acoplado a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente de EE.UU. n° 4.676.980), y para tratamiento de infección por VIH (documentos WO-91/00.360, WO-92/200.373 y EP-03.089). Los

anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica, y se desvelan en la patente de EE.UU. nº 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

5 **[0142]** En la literatura especializada se han descrito también técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando el enlace químico. Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos son reducidos en presencia de agente de formación de complejo de ditioi arsenito de sodio para estabilizar los ditioles próximos y
10 evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

15

[0143] Los últimos avances han facilitado la recuperación directa de fragmentos de Fab'-SH a partir de *E. coli*, que puede acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico totalmente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento de Fab' fue secretado por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo
20 *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado pudo unirse a células que sobreexpresan el receptor HER2 y a linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra las dianas del tumor mamario humano.

[0144] Se han descrito también diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny y col., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Se ligaron los péptidos de cremalleras de leucina a partir de las proteínas Fos y Jun a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y a continuación se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede usarse
30 para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) por medio de un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios V_H y V_L de un
35 fragmento son forzados a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando con ello dos sitios de unión a antígeno. Se ha comunicado también otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv (sFv) monocatenarios. Véase Gruber y col., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

40 **[0145]** Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt y col. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(vii) Otras modificaciones de secuencias de aminoácidos

45 **[0146]** Se contempla una o varias modificaciones de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos contra HER2 descritos en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo contra HER2 mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo contra HER2, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o
50 inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo contra HER2. Se realiza cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre y cuando la construcción final cuente con las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo contra HER2, como el cambio en el número o la posición de los sitios de glucosilación.

55

[0147] Un procedimiento útil para la identificación de determinados residuos o regiones del anticuerpo contra HER2 que son localizaciones preferidas para la mutagenia se denomina "mutagenia de barrido de alanina" tal como se describe en Cunningham y Wells *Science*, 244: 1081-1085 (1989). En este caso, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido
60 neutro o cargado negativamente (con la máxima preferencia, alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con antígeno HER2. Aquellas localizaciones de aminoácidos que muestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación mediante la introducción de variantes adicionales u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Así, mientras el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación en sí no tiene por qué estar predeterminada. Por ejemplo, para
65 analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo barrido de alaninas o mutagenia aleatoria en el codón o la región diana y las variantes expresadas de anticuerpo contra HER2 se someten a detección

selectiva en cuando a la actividad deseada.

[0148] Entre las inserciones de secuencias de aminoácidos se incluyen fusiones amino-terminales y/o carboxilo-terminales que oscilan en longitud entre un residuo y polipéptidos que contienen un centenar o más de 5 residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Entre los ejemplos de inserciones terminales se incluye un anticuerpo contra HER2 con un residuo de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Entre otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo contra HER2 se incluye la fusión en el extremo N o C del anticuerpo contra HER2 con una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

10

[0149] Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo contra HER2 sustituido por un residuo diferente. Entre los sitios de mayor interés para mutagenia de sustitución se incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. En la Tabla 1 se muestran las sustituciones conservadoras en la columna de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse 15 cambios más sustanciales, denominados "sustituciones de ejemplo" en la Tabla 1, o tal como se describe adicionalmente más adelante en referencia a las clases de aminoácidos, y someterse los productos a detección selectiva.

20

Tabla 1

Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

[0150] Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) 25 la carga o naturaleza hidrófoba de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse según las semejanzas en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, 2ª ed., pág. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975):

- 30 (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
 (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
 (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
 (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His(H)

35 **[0151]** Alternativamente, los residuos de ocurrencia natural pueden dividirse en grupos basándose en propiedades comunes de las cadenas laterales:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
 (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
 40 (3) ácidos: Asp, Glu;
 (4) básicos: His, Lys, Arg;
 (5) residuos que incluyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
 (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

[0152] Las sustituciones no conservadoras conllevan el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

[0153] Todo residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo contra HER2 también puede ser sustituido, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir una reticulación aberrante. A la inversa, pueden añadirse uno o varios enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (en particular cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo como un fragmento Fv).

[0154] Un tipo especialmente preferido de variante por sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de regiones hipervariables de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). Generalmente, la o las variantes resultantes seleccionadas para ulterior desarrollo tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental a partir del cual se generan. Una forma cómoda de generar dichas variantes por sustitución implica la maduración de afinidad usando expresión fágica. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, los sitios 6-7) para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpos así generadas se expresan en una forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosas como fusiones para el producto de gen III de M 13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes expresadas en fago se someten a continuación a detección selectiva en cuanto a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se desvela en la presente memoria descriptiva. Con el fin de identificar los sitios de región hipervariable candidatos para modificación, puede realizarse mutagenia de barrido de alanina para identificar residuos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el HER2 humano. Dichos residuos de contacto y los residuos vecinos son candidatos para sustitución según las técnicas elaboradas en la presente memoria descriptiva. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a detección selectiva tal como se describe en la presente memoria descriptiva y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para su desarrollo adicional.

[0155] Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón original de glucosilación del anticuerpo. Por alterar se entiende suprimir una o más fracciones de hidratos de carbono presentes en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

[0156] La glucosilación de anticuerpos está normalmente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la fijación de la fracción de hidratos de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para fijación enzimática de la fracción de hidratos de carbono a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La glucosilación ligada a O se refiere a la fijación de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[0157] La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración puede realizarse también mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

[0158] Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo contra HER2 se preparan mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento desde una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de ocurrencia natural) o preparación por mutagenia mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagenia por PCR y mutagenia por inserción de casete de una variante preparada anterior o una versión no variante del anticuerpo contra HER2.

[0159] Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, de manera que se potencie la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígenos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o además, puede introducirse uno o varios residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo con ello la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad mejorada de internalización y/o eliminación celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementadas. Véase Caron y col., J Exp Med. 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B.J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral mejorada también pueden prepararse usando ligadores cruzados heterobifuncionales tal como se describe en Wolff y col. Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, puede diseñarse un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y con ello puede tener capacidades mejoradas de lisis de complemento y ADCC. Véase Stevenson y col. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

[0160] Para incrementar la vida media en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor de recuperación en el anticuerpo (especialmente, un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la patente de EE.UU. 5.739.277, por ejemplo. Según se usa en la presente memoria descriptiva, el término "epítipo de unión a receptor de recuperación" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄, que es responsable de incrementar la vida media en suero *in vivo* de la molécula IgG).

(viii) Detección selectiva de anticuerpos con las propiedades deseadas

10 **[0161]** Las técnicas para generar anticuerpos se han descrito anteriormente. Es posible seleccionar además anticuerpos con características biológicas determinadas, según se desee.

[0162] Para identificar un anticuerpo que bloquea la activación de ligando de un receptor HER, puede determinarse la capacidad del anticuerpo de bloquear la unión del ligando de HER a células que expresan el receptor HER (por ejemplo, en conjugación con otro receptor HER con el que el receptor HER de interés forma un heterooligómero HER). Por ejemplo, pueden incubarse células que expresan naturalmente, o que han sido transfectadas para expresar, receptores HER del heterooligómero HER con el anticuerpo y a continuación exponerse a un ligando de HER marcado. A continuación puede evaluarse la capacidad del anticuerpo contra HER2 de bloquear la unión del ligando al receptor HER en el heterooligómero HER.

20 **[0163]** Por ejemplo, la inhibición de unión de HRG a líneas celulares de tumor mamario MCF7 por los anticuerpos contra HER2 puede realizarse usando cultivos de MCF7 monocapa en hielo en un formato de placa de 24 pocillos esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 1 más adelante. Pueden añadirse anticuerpos monoclonales contra HER2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos. A continuación puede añadirse rHRGβ₁₁₇₇₋₂₂₄ marcado con ¹²⁵I (25 pm), y puede continuarse con la incubación durante 4 a 16 horas. Pueden prepararse curvas de dosis-respuesta y puede calcularse un valor IC₅₀ para el anticuerpo de interés. En una forma de realización, el anticuerpo que bloquea la activación de ligando de un receptor HER tendrá un IC₅₀ para inhibir la unión de HRG a células MCF7 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferentemente 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo como un fragmento Fab, el valor de IC₅₀ para inhibir la unión de HRG a células MCF7 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menos, más preferentemente 50 nM o menos.

[0164] Alternativamente, o adicionalmente, puede evaluarse la capacidad del anticuerpo contra HER2 de bloquear la fosforilación de tirosina estimulada por ligando de HER de un receptor HER presente en un heterooligómero HER. Por ejemplo, las células que expresan endógenamente los receptores HER o que son transfectadas para expresarlos pueden incubarse con el anticuerpo y a continuación someterse a ensayo en cuanto a actividad de fosforilación de tirosina dependiente de ligando de HER usando un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (que está conjugado opcionalmente con una marca detectable). También está disponible el ensayo de activación del receptor cinasa descrito en la patente de EE.UU. nº 5.766.863 para determinar la activación de HER del receptor y el bloqueo de esta actividad por un anticuerpo.

[0165] En una forma de realización, se puede realizar la detección selectiva para un anticuerpo que inhibe la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina de p180 en células MCF7 esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 1 mostrado más adelante. Por ejemplo, las células MCF7 pueden sembrarse en placas de 24 pocillos y pueden añadirse anticuerpos monoclonales contra HER2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente; a continuación puede añadirse rHRGβ₁₁₇₇₋₂₄₄ a cada pocillo hasta una concentración final de 0,2 nM, y puede proseguirse con la incubación durante 8 minutos. Puede aspirarse medio de cada pocillo, y las reacciones pueden interrumpirse mediante la adición de 100 µl de tampón de muestra de SDS (SDS al 5%, DTT 25 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25 µl) puede someterse a electroforesis en un gel de gradiente del 4 al 12% (Novex) y a continuación transferirse electroforéticamente a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Pueden desarrollarse membranas de inmunotransferencia de antifosfotirosina (a 1 µg/ml), y puede cuantificarse la intensidad de la banda reactiva predominante a M_r ~ 180.000 mediante densitometría de reflectancia. El anticuerpo seleccionado inhibirá preferentemente de forma significativa la estimulación por HRG de la estimulación de tirosina de p180 a aproximadamente del 0 al 35% del control en este ensayo. Puede prepararse una curva de dosis-respuesta sobre inhibición de estimulación por HRG de fosforilación de tirosina de p180 según se determina mediante densitometría de reflectancia y puede calcularse un valor IC₅₀ para el anticuerpo de interés. En una forma de realización, el anticuerpo que bloquea la activación de ligando de un receptor HER tendrá un IC₅₀ para inhibir la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina de p180 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferentemente 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo como un fragmento Fab, el valor IC₅₀ para inhibir la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina de p180 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menos, más preferentemente 50 nM o menos.

[0166] Se pueden valorar también los efectos inhibidores del crecimiento del anticuerpo en células MDA-MB-175, por ejemplo, esencialmente tal como se describe en Schaefer y col. Oncogene 15:1385-1394 (1997). Según este ensayo, las células MDA-MB-175 pueden tratarse con un anticuerpo monoclonal contra HER2 (10 µg/ml)

durante 4 días y tefirse con cristal violeta. La incubación con un anticuerpo contra HER2 puede mostrar un efecto inhibitor del crecimiento en esta línea celular similar al mostrado por el anticuerpo monoclonal 2C4. En una forma de realización adicional, la HRG exógena no invertirá significativamente esta inhibición. Preferentemente, el anticuerpo podrá inhibir la proliferación celular de las células MDA-MB-175 en mayor medida que el anticuerpo monoclonal 4D5 (y opcionalmente en mayor medida que el anticuerpo monoclonal 7F3), tanto en presencia como en ausencia de HRG exógena.

[0167] En una forma de realización, el anticuerpo contra HER2 de interés puede bloquear la asociación dependiente de herregulina de HER2 con HER3 en células MCF7 y SK-BR-3 según se determina en un experimento de coimmunoprecipitación como el descrito en el Ejemplo 2 sustancialmente con más eficacia que el anticuerpo monoclonal 4D5, y preferentemente sustancialmente con más eficacia que el anticuerpo monoclonal 7F3.

[0168] Para identificar anticuerpos inhibidores del crecimiento contra HER2, se puede realizar una detección selectiva de anticuerpos que inhiben el crecimiento de células cancerosas que muestran sobreexpresión de HER2. En una forma de realización, el anticuerpo inhibitor del crecimiento de elección es capaz de inhibir el crecimiento de las células SK-BR-3 en cultivo celular en aproximadamente del 20 al 100% y preferentemente en aproximadamente del 50 al 100% para una concentración de anticuerpos de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. Para identificar dichos anticuerpos, puede realizarse el ensayo SK-BR-3 descrito en la patente de EE.UU. nº 5.677.171. Según este ensayo, las células SK-BR-3 se cultivan en una mezcla 1:1 de medio F12 y DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, glutamina y penicilina-estreptomina. Las células SK-BR-3 se siembran en placa a 20.000 células en una placa de cultivo celular de 35 mm (placa 2 mls/35 mm). Se añaden de 0,5 a 30 µg/ml del anticuerpo contra HER2 por placa. Después de seis días, se cuenta el número de células, en comparación con células no tratadas usando un contador celular electrónico COULTER™. Aquellos anticuerpos que inhiban el crecimiento de las células SK-BR-3 en aproximadamente del 20 al 100% o aproximadamente del 50 al 100% pueden seleccionarse como anticuerpos inhibidores del crecimiento. Véase la patente de EE.UU. nº 5.677.171 para ensayos para detección selectiva para anticuerpos inhibidores del crecimiento, como 4D5 y 3E8.

[0169] Con el fin de seleccionar anticuerpos que inducen la apoptosis, se dispone de un ensayo de unión a anexina que usa células BT474. Las células BT474 se cultivan y siembran en placas tal como se expone en el párrafo precedente. A continuación se retira el medio y se sustituye por medio nuevo en solitario o medio que contiene 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal. Después de un periodo de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se desprenden por tripsinización. A continuación las células se centrifugan, se ponen nuevamente en suspensión con tampón de unión de Ca²⁺ y se distribuyen en partes alícuotas en tubos tal como se expuso anteriormente para el ensayo de muerte celular. A continuación, los tubos reciben anexina marcada (por ejemplo, anexina V-FTIC) (1 µg/ml). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y el software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Aquellos anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina con respecto al control se seleccionan como anticuerpos inductores de apoptosis. Además del ensayo de unión a anexina, se dispone de un ensayo de tinción de ADN que usa células BT474. Con el fin de realizar este ensayo, las células BT474 que han sido tratadas con el anticuerpo de interés tal como se describe en los dos párrafos precedentes se incuban con 9 µg/ml de HOECHST 33342™ durante 2 h a 37°C, a continuación se analizan en un citómetro de flujo EPICS ELITE™ (Coulter Corporation) usando el software MODFITLT™ (Verity Software House). Los anticuerpos que inducen un cambio en el porcentaje de células apoptóticas que es 2 o más veces (y preferentemente 3 o más veces) el de las células no tratadas (hasta el 100% de células apoptóticas) pueden seleccionarse como anticuerpos proapoptóticos usando este ensayo. Véase el documento WO-98/17.797 sobre ensayos para detección selectiva para anticuerpos que inducen apoptosis, como 7C2 y 7F3.

[0170] Para realizar la detección selectiva de anticuerpos que se unen a un epítipo en HER2 ligado por un anticuerpo de interés, puede realizarse un ensayo rutinario de interbloqueo como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988), para valorar si el anticuerpo interbloquea la unión de un anticuerpo, como 2C4 o Pertuzumab, a HER2. Alternativamente, o adicionalmente, puede realizarse cartografía de epítipos por procedimientos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las fig. 1A y 1B en la presente memoria descriptiva) y/o se puede estudiar la estructura anticuerpo-HER2 (Franklin y col. Cancer Cell 5:317-328 (2004)) para ver qué dominio o dominios de HER2 están unidos por el anticuerpo.

(ix) *Inmunoconjugados*

[0171] La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico como un agente quimioterapéutico, una toxina (por ejemplo, una toxina de molécula pequeña o una toxina activa enzimáticamente de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluye fragmentos y/o variantes del mismo) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

[0172] Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados se han descrito anteriormente. En la presente memoria descriptiva se contemplan también conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, como una caliqueamicina, una maytansina (patente de EE.UU. nº 5.208.020), un

tricoteno y CC1065.

[0173] En una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo se conjuga con una o más moléculas de maytansina (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maytansina por molécula de anticuerpo). La maytansina puede convertirse, por ejemplo, en May-SS-Me que puede reducirse a May-SH3 y hacerse reaccionar con anticuerpo modificado (Chari y col. *Cancer Research*. 52: 127-131 (1992)) para generar un inmunoc conjugado maytansinoide-anticuerpo.

[0174] Otro inmunoc conjugado de interés comprende un anticuerpo contra HER2 conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina es capaz de producir roturas del ADN bicatenario en concentraciones sub-picomolares. Entre los análogos estructurales de caliqueamicina que pueden usarse se incluyen, pero no se limitan a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman y col. *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993) y Lode y col. *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)). Véanse, también, las patentes de EE.UU. nº 5.714.586; 5.712.374; 5.264.586; y 5.773.001.

[0175] Entre las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden usarse se incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, cureína, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO-93/21.232 publicado el 28 de octubre de 1993.

[0176] La presente invención contempla además un inmunoc conjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN como una desoxirribonucleasa; ADNasa).

[0177] Se encuentra disponible una diversidad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados contra HER2. Entre los ejemplos se incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radiactivos de Lu.

[0178] Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico pueden prepararse usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (como glutaraldehído), compuestos bis-azido (como bis(pazidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como 2,6-diisocianato de tolieno) y compuestos de flúor bis-activos (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta y col. *Science* 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente de quelación ilustrativo para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO-94/11.026. El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un ligador lábil para ácidos, un ligador sensible a la peptidasa, un ligador de dimetilo o un ligador que contiene disulfuro (Chari y col. *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)).

[0179] Alternativamente, puede prepararse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo contra HER2 y el agente citotóxico, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos.

[0180] En otra forma de realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como estreptavidina) para su uso en la predianización tumoral en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido por la eliminación del conjugado no ligado de la circulación usando un agente de limpieza y a continuación la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

55 (x) *Terapia con profármaco mediado por enzima dependiente de anticuerpo (ADEPT)*

[0181] Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse también en ADEPT mediante conjugación del anticuerpo con una enzima de activación de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO-81/01.145) en un fármaco anticanceroso activo. Véase, por ejemplo, el documento WO-88/07.378 y la patente de EE.UU. nº 4.975.278.

[0182] El componente enzimático del inmunoc conjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de manera tal que lo convierta en su forma citotóxica más activa.

65 **[0183]** Las enzimas que son útiles en el procedimiento de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para

- convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina-desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas, como la proteasa de Serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas de escisión de hidratos de carbono como β -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilin-amidasas, como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de aminas con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, pueden usarse anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse tal como se describe en la presente memoria descriptiva para suministro de la abzima a una población de células tumorales.
- 15 **[0184]** Las enzimas de la presente invención puede unirse de forma covalente a los anticuerpos contra HER2 mediante técnicas bien conocidas en la técnica como el uso de los reactivos de reticulación heterobifuncionales expuestos anteriormente. Alternativamente, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión de antígeno de un anticuerpo de la invención unidos a al menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la invención usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger y col., Nature, 312: 604-608 (1984)).

(xi) Otras modificaciones de anticuerpos

- [0185]** En la presente memoria descriptiva se contemplan otras modificaciones de anticuerpos. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a uno de una diversidad de polímeros no proteicos como, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede quedar atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

- [0186]** Los anticuerpos contra HER2 desvelados en la presente memoria descriptiva también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); patentes de EE.UU. n° 4.485.045 y 4.544.545; y el documento WO-97/38.731 publicado el 23 de octubre de 1997. Se desvelan liposomas con tiempo de circulación mejorado en la patente de EE.UU. n° 5.013.556.

- [0187]** En particular, pueden generarse liposomas útiles mediante el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse con los liposomas tal como se describe en Martin y col. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) por medio de una reacción de intercambio de disulfuro. Dentro del liposoma está contenido opcionalmente un agente quimioterapéutico. Véase Gabizon y col. J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989).

III. Formulaciones farmacéuticas

- [0188]** Se preparan formulaciones terapéuticas de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención para su almacenamiento mediante el mezclado de un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Oslo, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro amónico de octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, mannososa o dextrinas; agentes de quelación como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones de formación de sales como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). En el documento WO-97/04.801 se describen formulaciones liofilizadas preferidas de anticuerpos contra HER2.

[0189] La formulación en la presente memoria descriptiva puede contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación que está siendo tratada en particular, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se influyen entre sí de modo adverso. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar adicionalmente anticuerpos que se unen a EGFR, HER2 (por ejemplo, un anticuerpo que se une a un epítipo diferente en HER2), HER3, HER4, o factor endotelial vascular (VEGF) en la formulación. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente de inhibición del crecimiento, agente anti-hormonal, fármaco dirigido contra EGFR, agente antiangiogénico y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para la finalidad pretendida.

10

[0190] Los ingredientes activos pueden quedar también 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-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se exponen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Oslo, A. Ed. (1980).

15

[0191] Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, unas matrices que están en la forma de artículos conformados como, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. n° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

25

[0192] Las formulaciones que se usarán para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril.

30 IV. Detección selectiva de pacientes para terapia

[0193] Según una forma de realización preferida de la invención en la presente memoria descriptiva, el paciente seleccionado para terapia tiene un tumor que muestra activación por HER (y preferentemente HER2). En una forma de realización, la extensión de la activación por HER (o HER2) en células cancerosas supera significativamente el nivel de activación de ese receptor en células no cancerosas del mismo tipo de tejido. Dicha activación excesiva puede ser resultado de la sobreexpresión del receptor HER y/o superior a los niveles normales de un ligando de HER disponible para activación del receptor HER en las células cancerosas. Dicha activación excesiva puede causar y/o estar provocada por el estado maligno de una célula cancerosa. En algunas formas de realización, el cáncer estará sujeto a un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si está ocurriendo una amplificación y/o sobreexpresión de un receptor HER que tiene como resultado dicha activación excesiva del receptor HER. Alternativamente, o adicionalmente, el cáncer puede estar sujeto a un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si está ocurriendo una amplificación y/o sobreexpresión de un ligando de HER en el cáncer que se atribuye a una activación excesiva del receptor. En un subconjunto de dichos cánceres, la activación excesiva del receptor puede proceder de una vía de estimulación autocrina. A continuación se describirán en más detalle varios ensayos para determinar la activación de HER.

45

(i) Dímeros HER

[0194] Pueden valorarse muestras tumorales en cuanto a la presencia de dímeros HER, como indicación de activación por HER o HER2. Puede usarse cualquier procedimiento conocido en la técnica para detectar dímeros HER2, como EGFR-HER2, HER2-HER3, en tumores. A continuación se describen varios procedimientos preferidos. Estos procedimientos detectan interacciones proteína-proteína no covalentes u otras que indican proximidad entre proteínas de interés.

50

[0195] Pueden usarse procedimientos basados en inmunoafinidad, como inmunoprecipitación o ELISA, para detectar dímeros HER. En una forma de realización, se usan anticuerpos contra HER2 para inmunoprecipitar complejos que comprenden HER2 de células tumorales, y a continuación se sondea el inmunoprecipitado resultante para detectar la presencia de EGFR o HER3 por inmunotransferencia. En otra forma de realización, pueden usarse anticuerpos EGFR o HER3 para la etapa de inmunoprecipitación y a continuación se sondea el inmunoprecipitado con anticuerpos contra HER2. En una forma de realización adicional, pueden usarse ligandos de HER específicos para EGFR, HER3, complejos EGFR/HER2 o complejos HER2/HER3 para precipitar complejos, que a continuación se sondean en busca de la presencia de HER2. Por ejemplo, pueden conjugarse ligandos con avidina y complejos purificados en una columna de biotina.

60

[0196] En otras formas de realización, como ELISA o ensayos de tipo "sándwich" de anticuerpos, se inmovilizan anticuerpos a HER2 sobre un soporte sólido, se ponen en contacto con células tumorales o lisado de

65

células tumorales, se lavan, y a continuación se exponen a anticuerpo contra EGFR o HER3. La unión del último anticuerpo, que puede detectarse directamente o mediante un anticuerpo secundario conjugado con una marca detectable, indica la presencia de heterodímeros. En ciertas formas de realización, se inmoviliza el anticuerpo contra EGFR o HER3, y se usa el anticuerpo contra HER2 para la etapa de detección. En otras formas de realización
5 pueden usarse ligandos de HER en lugar de, o en combinación con, anticuerpos contra HER.

[0197] También puede usarse reticulación química o por UV para unir de forma covalente dímeros en la superficie de células vivas. Hunter y col., *Biochem J.*, 320:847-53. Entre los ejemplos de agentes de reticulación química se incluyen ditiobis(succinimidil)propionato (DSP) y 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidil)propionato (DTSSP). En
10 una forma de realización, se analizan mediante SDS-PAGE extractos celulares de células tumorales reticuladas químicamente y se someten a inmunotransferencia con anticuerpos contra EGFR y/o HER3. Una banda superdesplazada del peso molecular apropiado representa con la máxima probabilidad a los dímeros EGFR-HER2 o HER2-HER3, ya que HER2 es la pareja de dimerización preferida para EGFR y HER3. Este resultado puede confirmarse mediante inmunotransferencia posterior con anticuerpos contra HER2.

[0198] También puede usarse transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) para detectar dímeros EGFR-HER2 o HER2-HER3. FRET detecta cambios conformacionales de proteínas e interacciones proteína-proteína *in vivo* e *in vitro* basándose en la transferencia de energía desde un fluoróforo donante a un fluoróforo aceptor. Selvin, *Nat. Struct. Biol.*, 7:730-34 (2000). La transferencia de energía tiene lugar
20 sólo si el fluoróforo donante está en proximidad suficiente con el fluoróforo aceptor. En un experimento FRET típico, se marcan dos proteínas o dos sitios de una única proteína con diferentes sondas fluorescentes. Una de las sondas, la sonda donante, se excita a un estado de energía superior mediante luz incidente de una longitud de onda especificada. La sonda donante transmite a continuación su energía a la segunda sonda, la sonda aceptora, lo que da como resultado una reducción en la intensidad de fluorescencia del donante y un aumento en la emisión de
25 fluorescencia del aceptor. Para medir la magnitud de la transferencia de energía, se compara la intensidad del donante en una muestra marcada con sondas donante y aceptora con su intensidad en una muestra marcada sólo con sonda donante. Opcionalmente, se compara la intensidad del aceptor en las muestras de donante/aceptor y sólo aceptor. En la técnica se conocen sondas adecuadas e incluyen, por ejemplo, tintes permeantes a membrana, como fluoresceína y rodamina, tintes orgánicos, como los tintes de cianina, y átomos de lantánidos. Selvin, *supra*. En la
30 técnica se conocen también procedimientos e instrumentación para detectar y medir la transferencia de energía. Selvin, *supra*.

[0199] Las técnicas basadas en FRET adecuadas para detectar y medir las interacciones proteína-proteína en células individuales son conocidas también en la técnica. Por ejemplo, puede usarse microscopia de
35 transferencia de energía fluorescente mediante resonancia tras fotoblanqueo del donante (pbFRET) y microscopia de imagen de duración de fluorescencia (FLIM) para detectar la dimerización de receptores de superficie celular. Selvin, *supra*; Gadella & Jovin, *J. Cell Biol.*, 129:1543-58 (1995). En una forma de realización, pbFRET se usa en células "en suspensión" o "*in situ*" para detectar y medir la formación de dímeros EGFR-HER2 o HER2-HER3, tal como se describe en Nagy y col., *Cytometry*, 32:120-131 (1998). Estas técnicas miden la reducción en el tiempo de
40 vida de fluorescencia de un donante para transferir energía. En una forma de realización en particular, puede usarse una técnica FRET de tipo Foerster con citometría de flujo (FCET) para investigar la dimerización EGFR-HER2 y HER2-HER3, tal como se describe en Nagy y col., *supra*, y Brockhoff y col., *Cytometry*, 44:338-48 (2001).

[0200] FRET se usa preferentemente en conjunción con técnicas estándar de marcaje inmunohistoquímico.
45 Kenworthy, *Methods*, 24: 289-96 (2001). Por ejemplo, los anticuerpos conjugados con tintes fluorescentes adecuados pueden usarse como sondas para marcar dos proteínas diferentes. Si las proteínas están en proximidad una con otra, los tintes fluorescentes actúan como donantes y aceptores para FRET. La transferencia de energía se detecta por medios estándar. La transferencia de energía puede detectarse mediante medios de citometría de flujo o por sistemas de microscopia digital, como microscopia confocal o microscopia de fluorescencia de campo amplio
50 acoplada a una cámara de dispositivo de acoplamiento de carga (CCD).

[0201] En una forma de realización de la presente invención, los anticuerpos contra HER2 y los anticuerpos contra EGFR o HER3 se marcan directamente con dos fluoróforos diferentes, por ejemplo tal como se describe en Nagy y col., *supra*. Se ponen en contacto las células tumorales o los lisados de células tumorales con los
55 anticuerpos marcados de forma diferencial, que actúan como donantes y aceptores para FRET en presencia de dímeros EGFR-HER2 o HER2-HER3. Alternativamente, se usan anticuerpos contra HER2 y EGFR o HER3 sin marcar junto con anticuerpos secundarios marcados de forma diferencial que sirven como donantes y aceptores. Véase, por ejemplo, Brockhoff y col., *supra*. Se detecta la transferencia de energía y se determina la presencia de dímeros si se encuentra que las marcas están en estrecha proximidad.

[0202] En otras formas de realización se marcan de forma fluorescente ligandos del receptor HER que son específicos para HER2 y para HER1 o HER3 y se usan para estudios FRET.
60

[0203] En otras formas de realización adicionales de la presente invención, la presencia de dímeros en la
65 superficie de células tumorales se demuestra por colocalización de HER2 con EGFR o HER3 usando técnicas estándar de inmunofluorescencia directa o indirecta y microscopia de barrido por láser confocal. Alternativamente, se

usan imágenes de barrido por láser (LSI) para detectar la unión a anticuerpos y la colocalización de HER2 con EGFR o HER3 en un formato de alto rendimiento, como una placa de micropocillos, tal como se describe en Zuck y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:11122-27 (1999).

5 **[0204]** En formas de realización adicionales, la presencia de dímeros EGFR-HER2 y/o HER2-HER3 se determina identificando la actividad enzimática que depende de la proximidad de los componentes del dímero. Se conjuga un anticuerpo contra HER2 con una enzima y se conjuga un anticuerpo contra EGFR o HER3 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,
10 como un tinte. La presencia de otro producto químico descompone el segundo sustrato, de manera que se impide la reacción con la segunda enzima salvo que las enzimas primera y segunda, y con ello los dos anticuerpos, se encuentren en estrecha proximidad. En una forma de realización en particular se ponen en contacto lisados de células o células tumorales con un anticuerpo contra HER2 que se conjuga con glucosa-oxidasa y un anticuerpo contra HER3 o HER1 que se conjuga con peroxidasa del rábano. Se añade glucosa a la reacción, junto con un
15 precursor de tinte, como DAB, y catalasa. La presencia de dímeros se determina por el desarrollo de color bajo tinción para DAB.

[0205] Los dímeros pueden detectarse también usando procedimientos basados en el sistema de ensayo de eTag™ (Aclara Bio Sciences, Mountain View, CA), tal como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente de
20 EE.UU. 2001/0.049.105, publicada el 6 de diciembre de 2001. Una eTag™, o "etiqueta electroforética", comprende una fracción indicadora detectable, como, por ejemplo, un grupo fluorescente. Puede comprender también un "modificador de movilidad", que consiste esencialmente en una fracción que tiene una movilidad electroforética especial. Estas fracciones permiten la separación y la detección de la eTag™ a partir de una mezcla compleja en condiciones electroforéticas definidas, como electroforesis capilar (CE). La parte de la eTag™ que contiene la
25 fracción indicadora y, opcionalmente, el modificador de movilidad se une a una primera fracción de unión diana mediante un grupo de unión escindible para producir un primer compuesto de unión. La primera fracción de unión diana reconoce específicamente una primera diana en particular, como un ácido nucleico o proteína. La primera fracción de unión diana no está limitada en ningún modo, y puede ser, por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido. Preferentemente, la primera fracción de unión diana es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
30 Alternativamente, la primera fracción de unión diana puede ser un ligando del receptor HER o un fragmento del mismo competente para la unión.

[0206] El grupo de unión comprende preferentemente una fracción escindible, como un sustrato enzimático, o cualquier enlace químico que pueda ser escindido en condiciones definidas. Cuando a esta diana se le une la
35 primera fracción de unión diana, se introduce y/o se activa el agente de escisión, y el grupo de unión se escinde, liberando así la parte de la eTag™ que contiene la fracción indicadora y el modificador de movilidad. Así, la presencia de una eTag™ "libre" indica la unión de la fracción de unión diana a su diana.

[0207] Preferentemente, un segundo compuesto de unión comprende el agente de escisión y una segunda
40 fracción de unión diana que reconoce específicamente una segunda diana. La segunda fracción de unión diana tampoco está limitada en ningún modo y puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo o un ligando del receptor HER o un fragmento de ligando competente para la unión. El agente de escisión es tal que sólo escindiré el grupo de unión en el primer compuesto de unión si el primer compuesto de unión y el segundo compuesto de unión se encuentran en estrecha proximidad.
45

[0208] En una forma de realización de la presente invención, un primer compuesto de unión comprende una eTag™ en la que un anticuerpo contra HER2 actúa como primera fracción de unión diana. Un segundo compuesto de unión comprende un anticuerpo contra EGFR o HER3 unido a un agente de escisión capaz de escindir el grupo de unión de la eTag™. Preferentemente el agente de escisión debe activarse con el fin de poder escindir el grupo de
50 unión. Las células tumorales o los lisados de células tumorales se ponen en contacto con la eTag™, que se une a HER2, y con el anticuerpo contra EGFR o HER3 modificado, que se une a EGFR o HER3 en la superficie celular. Preferentemente se elimina el compuesto de unión no ligado, y se activa el agente de escisión, si fuera necesario. Si están presentes los dímeros EGFR-HER2 o HER2-HER3, el agente de escisión escindiré el grupo de unión y liberará la eTag™ debido a la proximidad del agente de escisión con el grupo de unión. A continuación puede
55 detectarse la eTag™ libre mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, como electroforesis capilar.

[0209] En una forma de realización, el agente de escisión es una especie química activable que actúa sobre el grupo de unión. Por ejemplo, el agente de escisión puede activarse mediante exposición de la muestra a la luz.

60 **[0210]** En otra forma de realización, la eTag™ se construye usando un anticuerpo contra EGFR o HER3 como la primera fracción de unión diana, y el segundo compuesto de unión se construye a partir de un anticuerpo contra HER2.

[0211] En otra forma de realización más, el dímero HER se detecta usando un anticuerpo u otro reactivo que
65 se une de forma específica o preferente al dímero en comparación con la unión del mismo al receptor HER en el dímero.

(ii) Fosforilación de HER2

[0212] A la inmunoprecipitación con anticuerpo contra EGFR, HER2 o HER3 tal como se expone en la sección anterior puede seguirle opcionalmente un ensayo funcional para dímeros, como alternativa o complemento a la inmunotransferencia. En una forma de realización, a la inmunoprecipitación con anticuerpo contra HER3 le sigue un ensayo de actividad de tirosinasa del receptor en el inmunoprecipitante. Dado que HER3 no tiene actividad de tirosinasa intrínseca, la presencia de actividad de tirosinasa en el inmunoprecipitante indica que HER3 está asociado con la máxima probabilidad con HER2. Graus-Porta y col., EMBO J., 16:1647-55 (1997); Klapper y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:4995-5000 (1999). Este resultado puede confirmarse mediante inmunotransferencia con anticuerpos contra HER2. En otra forma de realización, a la inmunoprecipitación con anticuerpo contra HER2 le sigue un ensayo de actividad de tirosinasa del receptor EGFR. En este ensayo, el inmunoprecipitante se pone en contacto con ATP radioactiva y un sustrato peptídico que imita el sitio de transfosforilación *in vivo* de HER2 por EGFR. La fosforilación del péptido indica coimmunoprecipitación y, así, dimerización de EGFR con HER2. Los ensayos de actividad de tirosinasa del receptor son bien conocidos en la técnica e incluyen ensayos que detectan fosforilación de sustratos diana, por ejemplo, por el anticuerpo anti-fosfotirosina, y la activación de rutas transducción de señal de cognado, como la ruta MAPK.

[0213] La fosforilación del receptor HER puede evaluarse mediante inmunoprecipitación de uno o más receptores HER, como receptor HER2 (HER2), y análisis de transferencia Western. Por ejemplo, la positividad está determinada por la presencia de una banda fosfo-HER2 en el gel, usando un anticuerpo antifosfotirosina para detectar el o los residuos de tirosina fosforilados en el o los receptores inmunoprecipitados. Los anticuerpos antifosfotirosina están disponibles comercialmente en Pan Vera (Madison, WI), una filial de Invitrogen, Chemicon International Inc. (Temecula, CA), o Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). La negatividad se determina por la ausencia de la banda.

[0214] En otra forma de realización, la fosforilación del receptor HER2 (HER2) se evalúa mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo contra HER2 fosfoespecífico (clon PN2A; Thor y col., J. Clin. Oncol., 18(18):3230-3239 (2000)).

[0215] Otros procedimientos para detectar la fosforilación del receptor o los receptores HER incluyen, pero no se limitan a, 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 (comparación de tamaño de HER2 fosforilado y no fosforilado) y ensayo de proximidad de e-tag con un anticuerpo contra HER (por ejemplo, HER2) y un anticuerpo fosfoespecífico o específico contra fosfotirosina (por ejemplo, usando el kit de ensayo eTag™ disponible en Aclara BioSciences (Mountain View, CA). Los detalles del ensayo eTag se describen más arriba.

[0216] También se pueden usar anticuerpos fosfoespecíficos en matriz celular para detectar el estado de fosforilación en una muestra celular de proteína de transducción de señal (documento US-2003/0.190.689).

(iii) Ligandos de HER2

[0217] Los niveles de un ligando de HER, como TGF- α , en o asociado con el tumor pueden determinarse según procedimientos conocidos. Dichos ensayos pueden detectar proteínas y/o ácidos nucleicos que lo codifican en la muestra que se someterá a ensayo. En una forma de realización, los niveles de ligandos de HER en el tumor pueden determinarse usando inmunohistoquímica (IHQ); véase, por ejemplo, Scher y col. Clin. Cancer Research 1:545-550 (1995). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden evaluar los niveles de ácidos nucleicos que codifican ligandos de HER en la muestra que se someterá a ensayo; por ejemplo, mediante FISH, transferencia Southern o técnicas de PCR.

(iv) Cáncer sin sobreexpresión de HER2

[0218] Si bien el cáncer puede estar caracterizado por la sobreexpresión del receptor HER2, la presente descripción se refiere además al tratamiento de un cáncer que no se considera relacionado con la sobreexpresión de HER2.

[0219] Para determinar la expresión de HER2 en el cáncer se dispone de varios ensayos de diagnóstico/pronóstico. En una forma de realización, la sobreexpresión de HER2 puede analizarse mediante IHQ, por ejemplo, usando HERCEPTEST® (Dako). Pueden someterse a ensayo de IHQ secciones de tejido integradas en parafina de una biopsia tumoral y de acuerdo con criterios de intensidad de tinción de proteína HER2 del modo siguiente:

Puntuación 0 no se observa tinción o se observa tinción de membrana en menos del 10% de las células tumorales.

Puntuación 1+ se detecta tinción de membrana débil/apenas perceptible en más del 10% de las células tumorales. Las células sólo se tiñen en parte de su membrana.

Puntuación 2+ se observa una tinción de membrana completa débil o moderada en más del 10% de las células tumorales.

5 Puntuación 3+ se observa una tinción de membrana completa moderada o intensa en más del 10% de las células tumorales.

[0220] Los tumores con puntuaciones 0 o 1+ para valoración de sobreexpresión de HER2 pueden caracterizarse como que no sobreexpresan HER2, mientras que los tumores con puntuaciones 2+ o 3+ pueden
10 caracterizarse como que sobreexpresan HER2.

[0221] Los tumores que sobreexpresan HER2 pueden calificarse mediante puntuaciones inmunohistoquímicas correspondientes al número de copias de moléculas HER2 expresadas por célula, y pueden determinarse bioquímicamente:

15
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.

[0222] La sobreexpresión de HER2 en el nivel 3+, que conduce a la activación independiente del ligando de la tirosinasa (Hudziak y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7159-7163 (1987)), tiene lugar aproximadamente en el 30% de los cánceres de mama, y en estas pacientes disminuyen la supervivencia sin recaídas y la supervivencia total (Slamon y col., Science, 244:707-712 (1989); Slamon y col., Science, 235:177-182 (1987)).

25
[0223] Alternativamente, o adicionalmente, pueden llevarse a cabo ensayos FISH como INFORM™ (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION™ (Vysis, Illinois) en tejido tumoral integrado en parafina y fijado con formalina para determinar la magnitud (si existiera) de la sobreexpresión de HER2 en el tumor.

30 **[0224]** En una forma de realización, el cáncer será aquel que expresa (y puede sobreexpresar) EGFR, y dicha expresión puede evaluarse del mismo modo que en los procedimientos para evaluar la expresión de HER2 según se observa anteriormente.

[0225] La sobreexpresión o amplificación del receptor HER o el ligando de HER puede evaluarse también
35 usando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo, administrando una molécula (como un anticuerpo) que se une a la molécula que será detectada y que se marca con una marca detectable (por ejemplo, un isótopo radiactivo) y examinando externamente al paciente para la localización de la marca.

V. Tratamiento con los anticuerpos contra HER2

40
[0226] Se contempla que, según la presente invención, los anticuerpos contra HER2 pueden usarse para tratar cáncer resistente a la quimioterapia o cáncer resistente al platino, como, por ejemplo, el cáncer resistente al platino en un procedimiento según se expone en las reivindicaciones. El cáncer comprenderá generalmente células que expresan HER2, de manera que el anticuerpo contra HER2 en la presente memoria descriptiva es capaz de
45 unirse a las células cancerosas.

[0227] El paciente es tratado con una combinación del anticuerpo contra HER2, preferentemente Pertuzumab, y un agente quimioterapéutico antimetabolito, preferentemente gemcitabina. La administración combinada incluye la coadministración o administración concurrente, usando formulaciones separadas o una única
50 formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferentemente existe un periodo de tiempo en el que ambos (o todos los) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Así, el agente quimioterapéutico antimetabolito puede administrarse antes, o después, de la administración del anticuerpo contra HER2. En esta forma de realización, el tiempo entre al menos una administración del agente quimioterapéutico antimetabolito y al menos una administración del anticuerpo contra
55 HER2 es preferentemente de aproximadamente 1 mes o menos, y con la máxima preferencia de aproximadamente 2 semanas o menos. Alternativamente, el agente quimioterapéutico antimetabolito y el anticuerpo contra HER2 se administran concurrentemente al paciente, en una formulación única o en formulaciones separadas.

[0228] El tratamiento con la combinación tendrá como resultado una mejoría en los signos o síntomas del
60 cáncer. Por ejemplo, dicha terapia puede tener como resultado una mejora en la supervivencia (supervivencia total y/o supervivencia sin progresión) con respecto a un paciente tratado sólo con el agente quimioterapéutico antimetabolito, y/o puede tener como resultado una respuesta clínica objetiva (parcial o completa). Por otra parte, el tratamiento con la combinación del agente quimioterapéutico antimetabolito (por ejemplo, gemcitabina) y el anticuerpo contra HER2 (por ejemplo, Pertuzumab) puede tener como resultado un beneficio terapéutico sinérgico, o
65 más que aditivo, en el paciente.

[0229] Preferentemente, el anticuerpo contra HER2 administrado es un anticuerpo desnudo. Sin embargo, el anticuerpo contra HER2 administrado puede estar conjugado con un agente citotóxico. Preferentemente, el inmunoconjugado y/o la proteína HER2 a la que está unido está/están internalizado/s por la célula, lo que tiene como resultado un aumento en la eficacia terapéutica del inmunoconjugado para la destrucción de la célula cancerosa a la que está unido. En una forma de realización preferida, el agente citotóxico se dirige o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Entre los ejemplos de dichos agentes citotóxicos se incluyen maytansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN-endonucleasas.

[0230] El anticuerpo contra HER2 (o anticuerpo contra inmunoconjugado de HER2) y el agente quimioterapéutico antimetabolito se administran a un paciente humano de acuerdo con procedimientos conocidos, como administración intravenosa, por ejemplo, en forma de bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o de inhalación. El anticuerpo contra HER2 y el agente quimioterapéutico antimetabolito pueden administrarse, aunque no obligatoriamente, por la misma vía de administración. Se prefiere la administración intravenosa del anticuerpo y el agente quimioterapéutico antimetabolito.

[0231] Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de anticuerpo contra HER2 dependerá del tipo de enfermedad que debe tratarse, según se define anteriormente, de la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el anticuerpo contra HER2 se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia anterior, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo contra HER2, y de la discreción del médico responsable. El anticuerpo contra HER2 se administra de forma adecuada al paciente de una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, de 0,1 a 20 mg/kg) de anticuerpo contra HER2 es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o por infusión continua. En una forma de realización, el tiempo de infusión inicial para el anticuerpo contra HER2 puede ser mayor que los tiempos de infusión posteriores, por ejemplo, de aproximadamente 90 minutos para la infusión inicial, y de aproximadamente 30 minutos para las infusiones posteriores (si la infusión inicial se tolera bien). La dosis preferida del anticuerpo contra HER2 estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Así, puede administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de manera que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo contra HER2). Puede administrarse una dosis de carga inicial más alta, seguida por una o más dosis más bajas. En una forma de realización, el anticuerpo contra HER2 se administra en forma de una dosis de carga de aproximadamente 840 mg seguida por aproximadamente 420 mg aproximadamente cada 3 semanas. En otra forma de realización, el anticuerpo contra HER2 se administra en forma de una dosis de aproximadamente 1.050 mg administrada aproximadamente cada 3 semanas.

[0232] El agente quimioterapéutico antimetabolito se administra comúnmente en dosis conocidas, u opcionalmente reducidas debido a la acción combinada de los fármacos o a los efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico antimetabolito. Los planes de preparación y dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse según las instrucciones de los fabricantes o según sea determinado empíricamente por el médico experto. Los planes de preparación y dosificación para dicha quimioterapia se describen también en *Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)*. Cuando el agente quimioterapéutico antimetabolito es gemcitabina, preferentemente, se administra en una dosis comprendida entre aproximadamente 600 mg/m² y 1.250 mg/m² (por ejemplo, aproximadamente 1.000 mg/m²), por ejemplo, en los días 1 y 8 de un ciclo de 3 semanas.

[0233] Aparte del anticuerpo contra HER2 y el agente quimioterapéutico antimetabolito, pueden combinarse con ellos otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, puede administrarse un segundo (o tercero, cuarto, etc.) agente quimioterapéutico, en el que el segundo agente quimioterapéutico es o bien otro agente quimioterapéutico antimetabolito diferente o bien un agente quimioterapéutico que no es un antimetabolito. Por ejemplo, el segundo agente quimioterapéutico puede ser un taxano (por ejemplo, Paclitaxel o Docetaxel), capecitabina o un agente quimioterapéutico a base de platino (como Carboplatino, Cisplatino u Oxaliplatino), antraciclina (por ejemplo, doxorubicina, que incluye, doxorubicina liposómica), topotecán, pemetrexed, un alcaloide derivado de vinca (como vinorelbina) y TLK 286. Pueden administrarse "cócteles" de diferentes agentes quimioterapéuticos.

[0234] Otros agentes terapéuticos que pueden combinarse con el anticuerpo contra HER2 y el agente quimioterapéutico antimetabolito incluyen uno cualquiera o más entre: un segundo anticuerpo contra HER2 diferente (por ejemplo, un anticuerpo contra HER2 inhibidor del crecimiento como Trastuzumab, o un anticuerpo contra HER2 que induzca la apoptosis de una célula que sobreexpresa HER2, como 7C2, 7F3 o variantes humanizadas del mismo); un segundo anticuerpo dirigido contra otro antígeno asociado a tumor, como EGFR, HER3, HER4; un compuesto antihormonal como, por ejemplo, un compuesto antiestrógenos como tamoxifeno, o un inhibidor de la aromatasas; un cardioprotector (para prevenir o reducir cualquier disfunción miocárdica asociada con la terapia); una citocina; un fármaco dirigido a EGFR (como TARCEVA[®], IRESSA[®] o Cetuximab); un agente antiangiogénico (especialmente Bevacizumab comercializado por Genentech con el nombre comercial AVASTIN[™]); un inhibidor de

tirosincinasa; un inhibidor de COX (por ejemplo, un inhibidor de COX-1 o COX-2); fármaco antiinflamatorio no esteroideo, Celecoxib (CELEBREX®); un inhibidor de la farnesil-transferasa (por ejemplo, Tipifarnib/ZARNESTRA® R115777 disponible en Johnson y Johnson o Lonafarnib SCH66336 disponible en Schering-Plough); un anticuerpo que se une a la proteína oncofetal CA 125 como Oregovomab (AcMo B43.13); una vacuna contra HER2 (como la 5 vacuna contra HER2 AutoVac de Pharmexia, o la vacuna proteica APC8024 de Dendreon, o una vacuna contra péptido HER2 de GSK/Corixa); otra terapia dirigida a HER (por ejemplo, trastuzumab, cetuximab, gefitinib, erlotinib, C11033, GW2016 etc.); un inhibidor de Raf y/o ras (véase, por ejemplo, el documento WO-2003/86.467); Doxilo; Topotecán; taxano; GW572016; TLK286; EMD-7200; un medicamento para el tratamiento de las náuseas como un antagonista de la serotonina, un esteroide o benzodiazepina; un medicamento que prevenga o trate el exantema 10 cutáneo o terapias estándar contra el acné, que incluyen un antibiótico tópico u oral; un medicamento para reducir la temperatura corporal como paracetamol, difenhidramina o meperidina; un factor de crecimiento hematopoyético, etc.

[0235] Las dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son las que se usan en la actualidad y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el anticuerpo 15 contra HER2.

[0236] Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede someterse a extirpación quirúrgica de las células cancerosas y/o a radioterapia.

20 **[0237]** Además de la administración de la proteína del anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo por terapia génica. Dicha administración del ácido nucleico que codifica el anticuerpo está comprendida en la expresión "administración de un anticuerpo". Véase, por ejemplo, el documento WO-96/07.321 publicado el 14 de marzo de 1996 en relación con el uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

25 **[0238]** Existen dos grandes formas de introducir el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células del paciente; *in vivo* y *ex vivo*. Para suministro *in vivo* se inyecta el ácido nucleico directamente en el paciente, usualmente en el sitio en el que se requiere el anticuerpo. Para tratamiento *ex vivo*, se extraen las células del paciente, se introduce el ácido nucleico en estas células aisladas y se administran las células modificadas al 30 paciente directamente o, por ejemplo, encapsuladas en membranas porosas que se implantan en el paciente (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.892.538 y 5.283.187). Existen diversas técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico es transferido en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del hospedador de destino. Entre las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico a células de mamífero *in vitro* se incluye el uso de liposomas, electroporación, 35 microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio, etc. Un vector usado comúnmente para suministro *ex vivo* del gen es un retrovirus.

[0239] Entre las técnicas de transferencia de ácido nucleico *in vivo* preferidas en la actualidad se incluyen transfección con vectores virales (como adenovirus, virus del Herpes simple I o virus adenoasociados) y sistemas 40 basados en lípidos (algunos lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). En algunas situaciones es deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que se dirija a las células diana, como, por ejemplo, un anticuerpo específico para una proteína de membrana de superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se emplean liposomas, pueden usarse proteínas que se unen a una proteína de membrana de superficie celular asociada con 45 endocitosis para dirigirse a y/o para facilitar la captación como, por ejemplo, proteínas de cápside o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo celular en particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en ciclado, y proteínas que dirigen la localización intracelular y potencian la vida media intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor se describe, por ejemplo, en Wu y col., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987); y Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos conocidos en la 50 actualidad de marcado génico y terapia génica véase Anderson y col., Science 256:808-813 (1992). Véase también el documento WO-93/25.673 y las referencias citadas en el mismo.

VI. Depósito de materiales

55 **[0240]** Las líneas celulares de hibridoma siguientes se han depositado en la American Type Culture Collection, 10801 Universidad Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

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

60 **[0241]** En los Ejemplos no limitativos siguientes se ilustran detalles de la invención.

Ejemplo 1**Producción y caracterización del anticuerpo monoclonal 2C4**

5 **[0242]** Los anticuerpos monoclonales murinos 2C4, 7F3 y 4D5 que se unen específicamente al dominio extracelular de HER2 se produjeron tal como se describe en Fendly y col., Cancer Research 50:1550-1558 (1990). Brevemente, las células NIH 3T3/HER2-3₄₀₀ (que expresan aproximadamente 1×10^5 HER2 moléculas/célula) producidas tal como se describe en Hudziak y col. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84:7159-7163 (1987) se recogieron con solución salina de tampón de fosfato (PBS) que contenía EDTA 25 mM y se usaron para inmunizar ratones
10 BALB/c. Se suministraron a los ratones inyecciones i.p. de 10^7 células en 0,5 ml de PBS en las semanas 0, 2, 5 y 7. Se suministraron a los ratones antisueros que inmunoprecipitaron HER2 marcado con ³²P inyecciones i.p. de un extracto membranario de HER2 purificado con aglutinina de germen de trigo-Sefarosa (WGA) en las semanas 9 y 13. A continuación se suministró una inyección i.v. de 0,1 ml de la preparación de HER2 y los esplenocitos se fusionaron con la línea de mieloma de ratón X63-Ag8.653.

15 **[0243]** Se realizó detección selectiva de los sobrenadantes de hibridoma para unión a HER2 mediante ELISA y radioinmunoprecipitación.

[0244] Los epítomos de HER2 ligados por los anticuerpos monoclonales 4D5, 7F3 y 2C4 se determinaron por
20 análisis de unión competitiva (Fendly y col. Cancer Research 50:1550-1558 (1990)). Se realizaron estudios de interbloqueo en anticuerpos mediante fluorescencia directa en células intactas usando la máquina de detección selectiva PANDEX™ para cuantificar la fluorescencia. Cada anticuerpo monoclonal se conjugó con isocianato de fluoresceína (FITC), usando procedimientos establecidos (Wofsy y col. Selected Methods in Cellular Immunology, pág. 287, Mishel y Schiigi (eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980)). Se tripsinizaron monocapas confluentes
25 de células NIH 3T3/HER2-3₄₀₀, se lavaron una vez y se resuspendieron a $1,75 \times 10^6$ células/ml en PBS frío que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5% y Na₃N al 0,1%. Se añadió una concentración final de partículas de látex al 1% (IDC, Portland, OR) para reducir la obstrucción de las membranas de placas PANDEX™. Se añadieron células en suspensión, 20 μ l, y 20 μ l de anticuerpos monoclonales purificados (100 μ g/ml a 0,1 μ g/ml) a los pocillos de la placa PANDEX™ y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se añadió una dilución
30 predeterminada de anticuerpos monoclonales marcados con FITC en 20 μ l a cada pocillo, se incubó durante 30 minutos, se lavó, y se cuantificó la fluorescencia mediante PANDEX™. Se consideró que los anticuerpos monoclonales compartían un epítopo si cada uno bloqueaba la unión del otro en un 50% o más en comparación con anticuerpo monoclonal de control irrelevante. En este experimento, se asignaron a los anticuerpos monoclonales 4D5, 7F3 y 2C4 los epítomos I, G/F y F, respectivamente.

35 **[0245]** Se evaluaron las características inhibitoras del crecimiento de los anticuerpos monoclonales 2C4, 7F3 y 4D5 usando la línea celular de tumor mamario SK-BR-3 (véase Hudziak y col. Molec. Cell. Biol. 9(3):1165-1172 (1989)). Brevemente, las células SK-BR-3 se desprendieron usando tripsina al 0,25% (vol/vol) y se suspendieron en medio completo en una densidad de 4×10^5 células por ml. Se sembraron en placa partes alícuotas de 100 μ l (4 x
40 10^4 células) en placas de microdilución de 96 pocillos, se dejó que las células se adhirieran y a continuación se añadieron 100 μ l de medio en solitario o medio que contenía anticuerpo monoclonal (concentración final 5 μ g/ml)). Después de 72 horas, se lavaron las placas dos veces con PBS (pH 7,5), se tificaron con cristal violeta (0,5% en metanol) y se analizó la proliferación celular relativa tal como se describe en Sugarman y col. Science 230:943-945 (1985). Los anticuerpos monoclonales 2C4 y 7F3 inhibieron la proliferación celular relativa de SK-BR-3 en
45 aproximadamente el 20% y aproximadamente el 38%, respectivamente, en comparación con aproximadamente el 56% de inhibición conseguido con el anticuerpo monoclonal 4D5.

[0246] Se evaluó la capacidad de los anticuerpos monoclonales 2C4, 4D5 y 7F3 para inhibir la fosforilación de tirosinas estimulada por HRG de proteínas en el intervalo de M_r 180.000 a partir de lisados celulares completos
50 de células MCF7 (Lewis y col. Cancer Research 56:1457-1465 (1996)). Se refiere que las células MCF7 expresan todos los receptores HER conocidos, pero en niveles relativamente bajos. Dado que HER2, HER3, y HER4 tienen tamaños moleculares casi idénticos, no es posible diferenciar la proteína que se está convirtiendo en tirosina fosforilada cuando se evalúan los lisados de células enteras mediante análisis de transferencia Western.

55 **[0247]** Sin embargo, estas células son ideales para los ensayos de fosforilación de tirosina por HRG debido a que, en las condiciones de ensayo usadas, en ausencia de HRF añadido exógenamente, muestran niveles de fosforilación de tirosina de proteínas bajos o indetectables en el intervalo de M_r 180.000.

[0248] Se sembraron células MCF7 en placas de 24 pocillos y se añadieron anticuerpos monoclonales contra
60 HER2 a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente; después se añadió rHRG β ₁₇₇₇₋₂₄₄ a cada pocillo hasta una concentración final de 0,2 nM, y se continuó con la incubación durante 8 minutos. Se aspiró cuidadosamente el medio de cada pocillo, y se detuvieron las reacciones mediante la adición de 100 μ l de tampón SDS de muestra (SDS al 5%, DTT 25 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Se sometió cada muestra (25 μ l) a electroforesis en un gel de gradiente al 4-12% (Novex) y a continuación se transfirió electroforéticamente a
65 membrana de polidifluoruro de vinilideno. Se revelaron inmunotransferencias de antifosfotirosina (4G10, de UBI,

usado a 1 µg/ml), y se cuantificó la intensidad de la banda reactiva predominante a $M_r \sim 180.000$ mediante densitometría de reflectancia, según se ha descrito anteriormente (Holmes y col. *Science* 256:1205-1210(1992); Sliwkowski y col. *J. Biol. Chem.* 269:14661-14665 (1994)).

5 **[0249]** Los anticuerpos monoclonales 2C4, 7F3 y 4D5 inhibieron significativamente la generación de una señal de fosforilación de tirosina inducida por HRG a M_r 180.000. En ausencia de HRG, ninguno de estos anticuerpos pudo estimular la fosforilación de tirosina de proteínas en el intervalo de M_r 180.000. Además, estos anticuerpos no tienen reacción cruzada con EGFR (Fendly y col. *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990)), HER3 o HER4. Los anticuerpos 2C4 y 7F3 inhibieron significativamente la estimulación de HRG de fosforilación de tirosina de p180 a <25% de control. El anticuerpo monoclonal 4D5 pudo bloquear la estimulación de fosforilación de tirosina por HRG en ~50%. La fig. 2A muestra las curvas de dosis-respuesta para inhibición por 2C4 o 7F3 de la estimulación por HRG de fosforilación de tirosina de p180 según se determina mediante densitometría de reflectancia. La evaluación de estas curvas de inhibición mediante el uso de un ajuste de 4 parámetros produjo un IC_{50} de $2,8 \pm 0,7$ nM y $29,0 \pm 4,1$ nM para 2C4 y 7F3, respectivamente.

15 **[0250]** La inhibición de la unión de HRG a líneas celulares de tumor mamario MCF7 por anticuerpos contra HER2 se realizó con cultivos de monocapa en hielo en un formato de placa de 24 pocillos (Lewis y col. *Cancer Research* 56:1457-1465 (1996)). Se añadieron anticuerpos monoclonales contra HER2 a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos. Se añadió rHRG β 1₁₇₇₋₂₂₄ marcado con ^{125}I (25 pm), y se prosiguió con la incubación durante 4 a 20 16 horas. La fig. 2B proporciona curvas de dosis-respuesta para inhibición por 2C4 o 7F3 de unión de HRG a células MCF7. Se incubaron concentraciones variables de 2C4 o 7F3 con células MCF7 en presencia de rHRG β 1 marcado con ^{125}I , y se muestran curvas de inhibición en la fig. 2B. El análisis de estos datos produjo una IC_{50} de $2,4 \pm 0,3$ nM y $19,0 \pm 7,3$ nM para 2C4 y 7F3, respectivamente. Una inhibición máxima del -74% para 2C4 y 7F3 estaba en consonancia con los datos de fosforilación de tirosinas.

25 **[0251]** Para determinar si el efecto de los anticuerpos contra HER2 observado en las células MCF7 era un fenómeno general, se incubaron líneas celulares tumorales humanas con 2C4 o 7F3 y se determinó el grado de unión específica de rHRG β 1 marcado con ^{125}I (Lewis y col. *Cancer Research* 56:1457-1465 (1996)). En la fig. 3 se muestran los resultados de este estudio. La unión de rHRG β 1 marcado con ^{125}I podría inhibirse significativamente mediante 2C4 o 7F3 en todas las líneas celulares, con la excepción de la línea celular de cáncer mamario MDA-MB-468, de la que se ha comunicado que expresa poco o ningún HER2. De las restantes líneas celulares se comunica que expresan HER2, con el nivel de expresión de HER2 en amplia variación entre estas líneas celulares. De hecho, el intervalo de expresión de HER2 en las líneas celulares sometidas a ensayo varía en más de 2 órdenes de magnitud. Por ejemplo, BT-20, MCF7 y Caov3 expresan $\sim 10^4$ receptores HER2/célula, mientras que BT-474 y SK-BR-3 expresan $\sim 10^6$ receptores HER2/célula. Dado el amplio intervalo de expresión de HER2 en estas células y los datos anteriores, se concluyó que la interacción entre HER2 y HER3 o HER4 era en sí misma una interacción de alta afinidad que tiene lugar en la superficie de la membrana plasmática.

[0252] Se valoraron los efectos inhibidores del crecimiento de los anticuerpos monoclonales 2C4 y 4D5 sobre 40 células MDA-MB-175 y SK-BR-3 en presencia o ausencia de rHRG β 1 exógeno (Schaefer y col. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)). Los niveles de HER2 en células MDA-MB-175 son de 4 a 6 veces más elevados que el nivel encontrado en células epiteliales mamarias normales y el receptor HER2-HER4 es constitutivamente tirosina fosforilada en células MDA-MB-175. Se trataron las células MDA-MB-175 con anticuerpos monoclonales contra HER2 2C4 y 4D5 (10 µg/ml) durante 4 días. En un ensayo de tinción con cristal violeta, la incubación con 2C4 45 mostró un acusado efecto inhibidor del crecimiento en esta línea celular (fig. 4A). El HRG exógeno no invirtió significativamente esta inhibición. Por otra parte, 2C4 no reveló un efecto inhibidor en el HER2 que sobreexpresa la línea celular SK-BR-3 (fig. 4B). El anticuerpo monoclonal 2C4 pudo inhibir la proliferación celular de las células MDA-MB-175 en mayor medida que el anticuerpo monoclonal 4D5, tanto en presencia como en ausencia de HRG exógeno. La inhibición de proliferación celular por 4D5 depende del nivel de expresión de HER2 (Lewis y col. *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993)). Podría detectarse una inhibición máxima del 66% en células SK-BR-3 50 (fig. 4B). Sin embargo, este efecto no podría ser superado por HRG exógeno.

Ejemplo 2

55 La asociación dependiente de HRG de HER2 con HER3 es bloqueada por el anticuerpo monoclonal 2C4

[0253] Se sometió a ensayo la capacidad de HER3 de asociarse con HER2 en un experimento de coimmunoprecipitación. Se sembraron $1,0 \times 10^6$ células MCF7 o SK-BR-3 en placas de cultivo de tejido de seis pocillos en medio 50:50 DMEM/Ham F12 que contenía suero fetal bovino (FBS) al 10% y HEPES 10 mM, pH 7,2 60 (medio de crecimiento), y se dejó que se fijara durante toda la noche. Las células se dejaron en ayuno durante dos horas en medio de crecimiento sin suero antes de iniciar el experimento

[0254] Las células se lavaron brevemente con solución salina de tampón de fosfato (PBS) y a continuación se incubaron con 100 nM del anticuerpo indicado diluido en albúmina de suero bovino (BSA) p/v al 0,2%, medio RPMI, 65 con HEPES 10 mM, pH 7,2 (tampón de unión), o con tampón de unión en solitario (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 similar de tampón de unión a los otros pocillos (-). Se continuó con la incubación durante 10 minutos aproximadamente.

5 **[0255]** Se eliminaron los sobrenadantes por aspiración y se lisaron las células en RPMI, HEPES 10 mM, pH 7,2, TRITON X-100™ v/v al 1,0%, CHAPS p/v al 1,0% (tampón de lisis), que contenía PMSF 0,2 mM, 10 µg/ml de leupeptina y 10 TU/ml de aprotinina. Los lisados se limpiaron de material insoluble por centrifugación.

10 **[0256]** HER2 se inmunoprecipitó usando un anticuerpo monoclonal acoplado de forma covalente a un gel de afinidad (Affi-Prep 10, Bio-Rad). Este anticuerpo (Ab-3, Oncogene Sciences) reconoce un epítipo de dominio citoplasmático. Se realizó la inmunoprecipitación añadiendo 10 µl de suspensión espesa de gel que contenía aproximadamente 8,5 µg de anticuerpo inmovilizado para cada lisado, y se dejó que las muestras se mezclaran a temperatura ambiente durante dos horas. A continuación se recogieron los geles por centrifugación. Los geles se lavaron lote a lote tres veces con tampón de lisis para eliminar el material no unido. A continuación se añadió
15 tampón de muestra SDS y se calentaron las muestras brevemente en un baño de agua hirviendo.

[0257] Se dejaron correr los sobrenadantes en geles de poli(acrilamida) al 4-12% y se sometieron a electrotransferencia en membranas de nitrocelulosa. La presencia de HER3 se valoró sondeando las transferencias con un anticuerpo policlonal frente a un epítipo de un dominio citoplasmático del mismo (c-17, Santa Cruz Biotech).
20 Se visualizaron las transferencias usando un sustrato quimioluminiscente (ECL, Amersham).

[0258] Tal como se muestra en las calles de control de las fig. 5A y 5B, para células MCF7 y SK-BR-3, respectivamente, HER3 estaba presente en un inmunoprecipitado de HER2 sólo cuando las células fueron estimuladas con HRG. Si en primer lugar se incubaban las células con anticuerpo monoclonal 2C4, la señal de
25 HER3 se suprimía en las células MCF7 (fig. 5A, calle 2C4 +) o se reducía sustancialmente en las células SK-BR-3 (fig. 5B, calle 2C4+). Tal como se muestra en las fig. 5A-B, el anticuerpo monoclonal 2C4 bloquea la asociación dependiente de herregulina de HER3 con HER2 en las células MCF7 y SK-BR-3 sustancialmente con más eficacia que el Trastuzumab. La preincubación con Trastuzumab redujo la señal de HER3 en lisados de MCF7 pero tuvo un efecto escaso o nulo en la cantidad de HER3 coprecipitada a partir de lisados de SK-BR-3. La preincubación con un
30 anticuerpo contra el receptor EGF (Ab-1, Oncogene Sciences) no tuvo efecto en la capacidad de HER3 de coinmunoprecipitar con HER2 en ninguna de las líneas celulares.

Ejemplo 3

35 Anticuerpos 2C4 humanizados

[0259] Los dominios variables de anticuerpo monoclonal 2C4 murino se clonaron primero en un vector que permite la producción de un fragmento Fab quimérico ratón/humano. Se aisló el ARN total de las células de hibridoma que usaban un kit de extracción de ARN de Stratagene según los protocolos del fabricante. Los dominios
40 variables se amplificaron por RT-PCR, se purificaron por gel y se insertaron en un derivado de un plásmido basado en pUC119 que contenía un dominio constante kappa humano y un dominio C_H1 humano tal como se ha descrito anteriormente (Carter y col. PNAS (USA) 89:4285 (1992); y patente de EE.UU. nº 5.821.337). El plásmido resultante se transformó en la cepa de *E. coli* 16C9 para expresión del fragmento Fab. El crecimiento de los cultivos, la inducción de la expresión de proteínas y la purificación del fragmento Fab fueron tal como se ha descrito
45 anteriormente (Werther y col. J. Immunol. 157: 4986-4995 (1996); Presta y col. Cancer Research 57: 4593-4599 (1997)).

[0260] Se comparó el fragmento Fab 2C4 quimérico purificado con el anticuerpo 2C4 parental murino en relación con su capacidad para inhibir la unión de ¹²⁵I-HRG a células MCF7 e inhibir la activación por rHRG de
50 fosforilación de tirosina de p180 en células MCF7. Tal como se muestra en la fig. 6A, el fragmento Fab 2C4 quimérico es muy eficaz para alterar la formación del sitio de unión a HER2-HER3 de alta afinidad en la línea celular de cáncer mamario humano, MCF7. El valor IC₅₀ relativo calculado para 2C4 murino intacto es 4,0 ± 0,4 nM, mientras que el valor para el fragmento Fab es 7,7 ± 1,1 nM. Tal como se ilustra en la fig. 6B, el fragmento Fab 2C4 quimérico monovalente es muy eficaz para alterar la activación de HER2-HER3 dependiente de HRG. El valor IC₅₀
55 calculado para el anticuerpo monoclonal murino intacto 2C4 es 6,0 ± 2 nM, mientras que el valor para el fragmento Fab es 15,0 ± 2 nM.

[0261] La secuenciación de ADN del clon quimérico permitió la identificación de los residuos de CDR (Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health,
60 Bethesda, MD (1991)) (fig. 7A y B). Mediante el uso de mutagenia de oligonucleótidos dirigida al sitio, se introdujeron las seis regiones CDR en un marco humano completo (V_L kappa subgrupo I y V_H subgrupo III) contenido en el plásmido VX4 tal como se ha descrito anteriormente (Presta y col., Cancer Research 57: 4593-4599 (1997)). La proteína procedente del "intercambio de CDR" resultante se expresó y se purificó tal como se ha indicado anteriormente. Se realizaron estudios de unión para comparar las dos versiones. Brevemente, se recubrió una placa
65 MAXISORP™ de NUNC con 1 microgramo por ml de dominio extracelular HER2 (ECD; producido tal como se describe en el documento WO-90/14.357) en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,6, durante toda la noche a 4°C, y a

continuación se bloqueó con diluyente de ELISA (BSA al 0,5%, polisorbato 20 al 0,05%, PBS) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se incubaron diluciones en serie de muestras en diluyente de ELISA en las placas durante 2 horas. Después del lavado, se detectó el fragmento Fab unido con anticuerpo kappa antihumano murino biotinilado (ICN 634771) seguido por peroxidasa de rábano conjugada con estreptavidina (Sigma) y usando 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) como sustrato. Se leyó la absorbancia a 450 nm. Tal como se muestra en la fig. 8A, toda la unión se perdió en la construcción del fragmento Fab humano de intercambio de CDR.

[0262] Para restaurar la unión del Fab humanizado, se construyeron mutantes usando ADN del intercambio de CDR como plantilla. Usando un modelo generado por ordenador (fig. 9), estas mutaciones se diseñaron para cambiar los residuos de región de entramado humana en sus contrapartidas murinas en las posiciones en las que el cambio podría afectar a las conformaciones de CDR o a la interfaz anticuerpo-antígeno. Los mutantes se muestran en la Tabla 2.

15

Tabla 2

Denominación de mutaciones de FR de 2C4 humanizado	
Mutante nº	Sustituciones en región de entramado (FR)
560	ArgH71Val
561	AspH73Arg
562	ArgH71Val, AspH73Arg
568	ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly
569	ArgH71Val, AspH73Arg, PheH67Ala
570	ArgH71Val, AspH73Arg, AsnH76Arg
571	ArgH71Val, AspH73Arg, LeuH78Val
574	ArgH71Val, AspH73Arg, IleH69Leu
56869	ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly, PheH67Ala

[0263] En la fig. 8A-C se muestran las curvas de unión para los diversos mutantes. El Fab humanizado versión 574, con los cambios ArgH71Val, AspH73Arg y IleH69Leu, presenta aparentemente propiedades de unión restauradas con respecto al fragmento Fab 2C4 químico original. Pueden modificarse los residuos FR y/o CDR adicionales, como L2, L54, L55, L56, H35 y/o H48 (por ejemplo, con sustitución del modo siguiente: IleL2Thr; ArgL54Leu; TyrL55Glu; ThrL56Ser; AspH35Ser; y ValH48Ile) con el fin de refinar o potenciar adicionalmente la unión del anticuerpo humanizado. Alternativamente, o adicionalmente, el anticuerpo humanizado puede madurarse por afinidad (véase anteriormente) con el fin de mejorar o refinar adicionalmente su afinidad y/u otras actividades biológicas.

[0264] El 2C4 humanizado versión 574 se maduró por afinidad usando un procedimiento de expresión de fagos. Brevemente, se clonó el Fab 2C4.574 humanizado en un vector de expresión fágica en forma de una fusión de gen III. Cuando se inducen partículas de fago mediante infección con el fago auxiliar M13KO7, esta fusión permite que el Fab se exprese en el extremo N de la proteína de fibra de cola fágica, gen III (Baca y col. J Biol Chem. 272:10678 (1997)).

[0265] Se construyeron bibliotecas individuales para cada una de las 6 CDR identificadas anteriormente. En estas bibliotecas, se aleatorizaron los aminoácidos en las CDR que se identificaron usando un modelo generado por ordenador (fig. 9) como potencialmente significativos en la unión a HER2 usando oligos que contenían "NNS" como codones. A continuación se cribaron las bibliotecas contra ECD de HER2 recubierto en placas MAXISORP™ de NUNC con leche seca al 3% en PBS con TWEEN 20® al 0,2% (MPBST) usado en lugar de todas las soluciones de bloqueo. Con el fin de seleccionar los fagos con afinidades superiores a las de 2C4.574, en las rondas de cribado 3, 4 y 5, se añadió ECD de HER2 soluble o Fab 2C4.574 soluble durante las etapas de lavado como competidor. Los tiempos de lavado se extendieron a 1 hora a temperatura ambiente.

[0266] Después de 5 rondas de cribado, se analizaron de nuevo los clones individuales mediante ELISA de fago. Se cultivaron clones individuales en placas de cultivo tisular con fondo en U de 96 pocillos de Costar, y se indujeron los fagos por adición de fago auxiliar. Después de cultivo durante toda la noche, se peletizaron las células de *E. coli*, y se transfirieron los sobrenadantes que contenían fagos a placas de 96 pocillos en las que los fagos se bloquearon con MPBST durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas MAXISORP™ de NUNC recubiertas con ECD de HER2 también se bloquearon con MPBST tal como se indica anteriormente. Se incubaron los fagos bloqueados en las placas durante 2 horas. Después de lavado, se detectaron los fagos unidos usando anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano (Amersham Pharmacia Biotech, Inc. 27-9421-01) con dilución 1:5.000 en MPBST, seguido por 3,3',5,5'-tetrametilbencidina como sustrato. Se leyó la absorbancia a 450 nm.

[0267] Se secuenció el ADN de los 48 clones de cada biblioteca que produjo las señales más intensas. Aquellos clones cuyas secuencias tuvieron lugar con la máxima frecuencia se subclonaron en el vector descrito

anteriormente, lo que permite la expresión de Fab solubles. Estos Fab se indujeron, se purificaron las proteínas y los Fab purificados se analizaron para la unión mediante ELISA tal como se describe anteriormente y se comparó la unión con la de la versión 2C4.574 humanizada de partida.

- 5 **[0268]** Después de identificar las mutaciones interesantes en las CDR individuales, se construyeron los mutantes adicionales que eran combinaciones diversas de estas y se sometieron a ensayo tal como se indica anteriormente. En la Tabla 3 se describen mutantes que proporcionaron unión mejorada con respecto a 574.

Tabla 3

10

Denominación de mutantes derivados de la maduración de afinidad de 2C4.574

Nombre mutante	de	Cambio con respecto a 574	Mutante/574*
H3.A1		serH99trp, methH34leu	0,380
L2.F5		serL50trp, tyrL53gly, methH34leu	0,087
H1.3.B3		thrH28gln, thrH30ser, methH34leu	0,572
L3.G6		tyrL92pro, ileL93lys, methH34leu	0,569
L3.G11		tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, methH34leu	0,561
L3.29		tyrL92phe, tyrL96asn, methH34leu	0,552
L3.36		tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro, methH34leu	0,215
654		serL50trp, methH34leu	0,176
655		methH34ser	0,542
659		serL50trp, methH34ser	0,076
L2.F5.H3.A1		serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, serH99trp	0,175
L3G6.H3.A1		tyrL92pro, ileL93lys, methH34leu, serH99trp	0,218
H1.3.B3.H3.A1		thrH28gln, thrH30ser, methH34leu, serH99trp	0,306
L3.G11.H3.A1		tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, methH34leu, serH99trp	0,248
654.H3.A1		serL50trp, methH34leu, serH99trp	0,133
654.L3.G6		serL50trp, methH34leu, tyrL92pro, ileL931ys	0,213
654.L3.29		serL50trp, methH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn	0,236
654.L3.36		serL50trp, methH35leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro	0,141

* Proporción entre la cantidad de mutante necesaria para suministrar la DO media de la curva estándar y la cantidad de 574 necesaria para suministrar la DO media de la curva estándar en una ELISA de Erb2-ECD. Un número inferior a 1,0 indica que el mutante se une a Erb2 mejor de lo que se une 574.

[0269] También se han construido los siguientes mutantes, que en la actualidad están en evaluación:

15

- 659.L3.G6 serL50trp, methH34ser, tyrL92pro, ileL93lys
 659.L3.G11 serL50trp, methH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
 659.L3.29 serL50trp, methH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn
 659.L3.36 serL50trp, methH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro
 20 L2F5.L3G6 serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92pro, ileL931ys
 L2F5.L3G11 serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
 L2F5.L29 serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn
 L2F5.L36 serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro
 L2F5.L3G6.655 serL50trp, tyrL53gly, methH35ser, tyrL92pro, ileL93lys
 25 L2F5.L3G11.655 serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
 L2F5.L29.655 serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn
 L2F5.L36.655 serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro

Los mutantes siguientes, sugeridos por un barrido de homología, están en la actualidad en fase de construcción:

30

- 678 thrH30ala
 679 thrH30ser
 680 lysH64arg
 681 leuH96val
 35 682 thrL97ala
 683 thrL97ser
 684 tyrL96phe
 685 tyrL96ala
 686 tyrL91phe
 40 687 thrL56ala
 688 glnL28ala
 689 glnL28glu

[0270] El aminoácido preferido en H34 sería metionina. Podría realizarse un cambio a leucina si se encontrara oxidación en esta posición.

5 [0271] Se encontró que asnH52 y asnH53 resultaban fuertemente preferidos para la unión. El cambio de estos residuos a alanina o ácido aspártico redujo espectacularmente la unión. Se ha preparado un anticuerpo intacto que comprende los dominios variables ligero y pesado de la versión 574 humanizada con una región constante de cadena pesada IgG1 humana (véase la patente de EE.UU. n° 5.821.337). El anticuerpo intacto es producido por las células de ovario de hámster chino (CHO). Dicha molécula se denomina Pertuzumab en la presente memoria

10 descriptiva.

Ejemplo 4

El anticuerpo monoclonal 2C4 bloquea la activación mediada por EGF, TGF- α o HRG de MAPK y Akt cinasa

15 [0272] Muchos receptores de factor de crecimiento señalizan a través de la ruta de la proteincinasa activada por mitógeno (MAPK). Estas cinasas de doble especificidad constituyen uno de los criterios clave de valoración en las rutas de transducción de señal que finalmente desencadenan la división de las células cancerosas. La capacidad del anticuerpo monoclonal 2C4 o el Trastuzumab de inhibir la activación por EGF, TGF- α o HRG de MAPK se evaluó

20 de la manera siguiente.

[0273] Se sembraron en placa células MCF7 (10^5 células/pocillo) en suero que contenía medio en placas de cultivo celular de 12 pocillos. Al día siguiente, se retiró el medio celular y se añadió a cada pocillo medio nuevo que contenía suero al 0,1%. A continuación se repitió este procedimiento al día siguiente y antes del ensayo se substituyó

25 el medio por tampón de unión sin suero (Jones y col. J. Biol. Chem. 273:11667-74 (1998); y Schaefer y col. J. Biol. Chem. 274:859-66 (1999)). Se dejó que las células se equilibraran a temperatura ambiente y a continuación se incubaron durante 30 minutos con 0,5 ml de Trastuzumab 200 nM o anticuerpo monoclonal 2C4. Seguidamente se trataron las células con EGF 1 nM, TGF- α 1 nM o HRG 0,2 nM durante 15 minutos. Se detuvo la reacción aspirando el medio celular y añadiendo a continuación 0,2 ml de tampón de muestra de SDS-PAGE que contenía DTT al 1%.

30 Se evaluó la activación de MAPK mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-MAPK activo (Promega) tal como se ha descrito anteriormente (Jones y col. J. Biol. Chem. 273:11667-74 (1998)).

[0274] Tal como se muestra en la fig. 10, el anticuerpo monoclonal 2C4 bloquea significativamente la activación mediada por EGF, TGF- α y HRG de MAPK en mayor medida que el Trastuzumab. Estos datos sugieren

35 que el anticuerpo monoclonal 2C4 se une a una superficie de HER2 que se usa para su asociación con EGFR o HER3 y previene así la formación del complejo de receptor de señalización.

[0275] El anticuerpo monoclonal 2C4 demostró también que inhibía la activación de Akt dependiente de herregulina (HRG). La activación de la transducción de cinasa PI3 de la ruta de señalización es importante para la supervivencia celular (Carraway y col. J. Biol. Chem. 270: 7111-6 (1995)). En células tumorales, la activación de cinasa PI3 puede desempeñar un papel importante en el fenotipo invasivo (Tan y col. Cancer Research. 59: 1620-1625, (1999)). La ruta de supervivencia está mediada principalmente por la AKT de serina/treonina cinasa (Bos y col. Trends Biochem Sci. 20: 441-442 (1995)). Los complejos formados entre HER2 y HER3 o EGFR pueden iniciar estas rutas en respuesta a la herregulina o a EGF, respectivamente (Olayioye y col. Mol. & Cell. Biol. 18: 5042-51 (1998);

45 Karunagarán y col., EMBO Journal. 15:254-264 (1996); y Krymskaya y col. Am. J. Physiol. 276: L246-55 (1999)). La incubación de células cancerosas mamarias MCF7 con 2C4 inhibe la activación de Akt mediada por herregulina. Agus y col. Cancer Cell 2: 127-137 (2002). Por otra parte, el nivel basal de activación de Akt presente en ausencia de adición de herregulina se reduce adicionalmente mediante la adición de 2C4.

Ejemplo 5

Tratamiento de cáncer resistente al platino

[0276] Este ejemplo demuestra la seguridad, tolerabilidad y eficacia del pertuzumab en combinación con la gemcitabina en pacientes con cáncer de ovarios, carcinoma peritoneal primario o carcinoma de las trompas de Falopio resistentes al platino. El efecto del pertuzumab y la gemcitabina en la supervivencia sin progresión se evalúa en todos los pacientes, y en el subconjunto de pacientes cuyos tumores contienen marcadores que indican la activación de HER2.

60 [0277] Los pacientes que han progresado mientras recibían, o en un plazo de 6 meses después de recibir, un régimen de quimioterapia basado en platino serán elegibles para este estudio. Se aleatorizará a los pacientes para que reciban gemcitabina en combinación con pertuzumab o gemcitabina en combinación con placebo. Entre los pacientes tratados según la presente memoria descriptiva se incluyen aquellos que no han recibido un tratamiento anterior de un régimen de recuperación para una enfermedad resistente al platino antes de su entrada en el estudio,

65 y aquellos que han seguido un régimen anterior para una enfermedad resistente al platino.

[0278] La gemcitabina se administrará a 1.000 mg/m² en los días 1 y 8 de cada ciclo de 21 días. La gemcitabina se infundirá en los primeros 30 minutos. Se permitirán reducciones de dosis por motivos de toxicidad. El placebo o el pertuzumab se administrarán en el día 1 del ciclo de 21 días. En los sujetos aleatorizados para recibir pertuzumab se administrará una dosis de carga inicial de 840 mg (Ciclo 1) seguida por 420 mg en los Ciclos 2 y posteriores. En los sujetos aleatorizados para recibir placebo se administrará placebo en el mismo volumen que se administró pertuzumab para el Ciclo 1, los Ciclos 2 y posteriores. Los sujetos sin enfermedad progresiva pueden recibir tratamiento durante hasta 17 ciclos, o 1 año.

[0279] En los pacientes se procederá a una reducción estándar en la dosis de gemcitabina y a suspender la dosis si aparecen citopenias. También se suspenderá la administración de Pertuzumab para cualquier dosis de gemcitabina suspendida en el Día 1. Las dosis posteriores serán dosis reducidas y no se aumentarán. Si se requiere la reducción o la suspensión de la dosis en más de 4 ocasiones, o si se suspenden las dosis durante más de 3 semanas, entonces se dejará de administrar la gemcitabina y, con la aprobación del médico responsable y del supervisor médico, puede proseguirse con el fármaco en modo ciego hasta la progresión de la enfermedad. Si en el Día 8 se suspenden las dosis de gemcitabina, entonces se omitirá la dosis del Día 8 y comenzará el tratamiento posterior con el ciclo siguiente (Día 22 del ciclo anterior).

[0280] La suspensión y reducción de las dosis de gemcitabina se realizará según se recomienda en la tabla siguiente:

Recuento de granulocitos absoluto (x10 ⁹ /l)		Recuento de plaquetas (x10 ⁹ /L)	% dosis completa
>1.000	y	>100.000	100
500-999	o	50.000-99.000	75
<500	o	<50.000	Suspender

[0281] Las dosis posteriores para cualquier paciente que necesite reducción de dosis serán dosis reducidas. Si se suspenden las dosis durante más de 3 semanas como consecuencia de la aparición de citopenias, se supondrá que los pacientes tienen una toxicidad inaceptable y se interrumpirá la gemcitabina. Si no existen otras toxicidades adicionales de grado III o IV, la continuación de la administración del fármaco en modo ciego se realizará a discreción del médico y el supervisor médico. La toxicidad hematológica de la gemcitabina se ha relacionado con la velocidad de administración de la dosis. La gemcitabina se administrará durante 30 minutos con independencia de la dosis total. Pueden usarse agentes de estimulación de colonias para citopenias de Grado 2 según NCI-CTC a discreción del médico responsable.

[0282] Se ofrecerá la opción para cruzamiento con un único agente pertuzumab. Se administrará una dosis de carga de 840 mg en el siguiente ciclo con continuación de 420 mg en los ciclos posteriores cada 21 días. Se obtendrá una muestra de tumor integrada en parafina o cortes microscópicos de tumor representativo en parafina sin tefir que contengan el cáncer y se valorará el estado de fosforilación de HER2. Aproximadamente del 20 al 40% de las pacientes con cáncer de ovarios pueden tener fosforilación de HER2 detectable.

[0283] La respuesta se valorará al final de los Ciclos 2, 4, 6, 8, 12 y 17. Se valorará la enfermedad medible usando los Criterios de Evaluación de Respuesta para Tumores Sólidos (RECIST), mediante evaluación clínica y con exploración por TC o equivalente. La respuesta para sujetos con enfermedad evaluable se valorará según los cambios en CA-125 y la evidencia clínica y radiológica de enfermedad. Las respuestas deben confirmarse 4-8 semanas después de la documentación de respuesta inicial. Los sujetos evaluables son sujetos que han tenido al menos una valoración de respuesta y tienen una determinación de estado de fosforilación de HER2 en su muestra tumoral.

[0284] Se valorarán las siguientes medidas de desenlace clínico.

Criterios de valoración de eficacia primarios

Supervivencia sin progresión, según se determina mediante valoración del investigador con el uso de cambios RECIST o CA-125, después del inicio del tratamiento de estudio asignado de todos los sujetos en cada brazo.

Supervivencia sin progresión, según se determina mediante valoración del investigador con el uso de cambios RECIST o CA-125 después del inicio del tratamiento de estudio asignado en cada brazo en los siguientes subgrupos:

- 55 Sujetos con marcadores detectables de activación de HER2.
- Sujetos sin marcadores detectables de activación de HER2.

Criterios de valoración de eficacia secundarios

- 60 Respuesta objetiva (PR o CR)
- Duración de respuesta
- Tiempo de supervivencia

Libertad de progresión a 4 meses

Estos criterios de valoración se valorarán en todos los sujetos en cada brazo y en los siguientes subgrupos:

- 5 Sujetos con marcadores detectables de activación de HER2.
Sujetos sin marcadores detectables de activación de HER2.

10 **[0285]** Para prevenir o tratar posibles náuseas y vómitos, puede premedicarse al paciente con antagonistas de serotonina, esteroides y/o benzodiazepinas. Para prevenir o tratar un posible exantema, pueden usarse terapias estándar contra el acné, que incluyen antibióticos tópicos y/u orales. Otras posibles medicaciones concomitantes son cualquier medicación con receta o preparaciones sin receta usadas por un sujeto en el intervalo que comienza 7 días antes del Día 1 y que continúan hasta el último día del periodo de seguimiento. Los sujetos que experimenten elevación de la temperatura asociada con la infusión hasta $>38,5^{\circ}\text{C}$ u otros síntomas asociados con la infusión pueden recibir tratamiento sintomático con paracetamol, difenhidramina o meperidina. Pueden administrarse factores de crecimiento hematopoyéticos no experimentales para citopenias de Grado 2 según NCI-CTC.

20 **[0286]** El paciente tratado tal como se describe anteriormente mostrará una mejoría en los signos o síntomas de un cáncer de ovarios, un carcinoma peritoneal primario o un carcinoma de las trompas de Falopio según su evaluación conforme a uno cualquiera o más de los criterios de valoración de eficacia primarios o secundarios. Por otra parte, el paciente resistente al platino tratado tal como se describe anteriormente con la combinación de Pertuzumab y Gemcitabina mostrará una mayor mejoría en cualquiera de los signos o síntomas del cáncer, en comparación con el paciente resistente al platino tratado sólo con Gemcitabina.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo contra HER2 que inhibe la dimerización de HER más eficazmente que el Trastuzumab, para su uso en un procedimiento para tratar un cáncer resistente al platino seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de ovarios, carcinoma peritoneal primario y carcinoma de las trompas de Falopio, comprendiendo el procedimiento la administración a un paciente del anticuerpo contra HER2 y gemcitabina, cada uno en cantidades eficaces para tratar el cáncer.
2. Un anticuerpo contra HER2 que inhibe la dimerización de HER más eficazmente que el Trastuzumab y la gemcitabina, para su uso en un procedimiento para tratar un cáncer resistente al platino seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de ovarios, carcinoma peritoneal primario y carcinoma de las trompas de Falopio, comprendiendo el procedimiento la administración a un paciente del anticuerpo y la gemcitabina, cada uno en cantidades eficaces para tratar el cáncer.
3. El anticuerpo según la reivindicación 1 ó 2 en el que el anticuerpo contra HER2 se une al Dominio II de HER2.
4. El anticuerpo según la reivindicación 1 ó 2 en el que el anticuerpo contra HER2 es el Pertuzumab.
5. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que una muestra de tumor del paciente muestra una activación de HER.
6. El anticuerpo según la reivindicación 5 en el que una muestra de tumor del paciente muestra una activación de HER2.
7. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el procedimiento tiene como resultado una mejora en la supervivencia con respecto a un paciente tratado sólo con la gemcitabina.
8. El anticuerpo según la reivindicación 7 en el que el procedimiento tiene como resultado una mejora en la supervivencia sin progresión con respecto a un paciente tratado sólo con la gemcitabina.
9. El anticuerpo según la reivindicación 7 en el que el procedimiento tiene como resultado una mejora en la supervivencia total con respecto a un paciente tratado sólo con la gemcitabina.
10. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el procedimiento tiene como resultado una respuesta objetiva.
11. El anticuerpo según la reivindicación 10 en el que el procedimiento tiene como resultado una respuesta completa.
12. El anticuerpo según la reivindicación 10 en el que el procedimiento tiene como resultado una respuesta parcial.
13. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el anticuerpo contra HER2 está destinado a la administración en forma de una dosis de carga de 840 mg seguida por 420 mg cada 3 semanas.
14. El anticuerpo según una o más cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en el que el anticuerpo contra HER2 está destinado a la administración en forma de una dosis de 1.050 mg administrada cada 3 semanas.
15. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la gemcitabina está destinada a la administración a una dosis entre 600 mg/m² y 1.250 mg/m² en los días 1 y 8 de un ciclo de 3 semanas.
16. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la gemcitabina está destinada a la administración antes, o después, de la administración del anticuerpo contra HER2.
17. El anticuerpo según la reivindicación 16 en el que el tiempo entre al menos una administración de la gemcitabina y al menos una administración del anticuerpo contra HER2 es 1 mes o menos.
18. El anticuerpo según la reivindicación 17 en el que el tiempo entre al menos una administración de la gemcitabina y al menos una administración del anticuerpo contra HER2 es aproximadamente 2 semanas o menos.
19. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la gemcitabina y el anticuerpo contra HER2 están destinados a la administración concurrentemente al paciente, en una formulación única o en formulaciones separadas.

20. El anticuerpo según la reivindicación 1 ó 2 en el que el cáncer no presenta sobreexpresión de HER2.
21. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el procedimiento
5 comprende además la administración de un segundo agente quimioterapéutico al paciente.
22. El anticuerpo según la reivindicación 21 en el que el segundo agente quimioterapéutico se selecciona
entre el grupo que consiste en un taxano, capecitabina, agente quimioterapéutico a base de platino, antraciclina,
doxorubicina liposómica, topotecán, pemetrexed, alcaloide derivado de vinca y TLK 286.
- 10 23. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tratamiento con
la combinación de la gemcitabina y el anticuerpo contra HER2 tiene como resultado un beneficio sinérgico, o más
que aditivo, para el paciente.
- 15 24. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el anticuerpo contra
HER2 es un anticuerpo desnudo.
25. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el anticuerpo contra
HER2 es un anticuerpo intacto.
- 20 26. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 en el que el anticuerpo contra HER2
es un fragmento de anticuerpo que comprende una región de unión de antígeno.
27. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el cáncer es cáncer
25 de ovarios.
28. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 en el que el cáncer es carcinoma
peritoneal primario.
- 30 29. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 en el que el cáncer es carcinoma de
las trompas de Falopio.
30. Un anticuerpo contra HER2 que se une a un sitio de unión heterodimérico en HER2, para su uso en un
procedimiento para tratar un cáncer resistente al platino seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de
35 ovarios, carcinoma peritoneal primario y carcinoma de las trompas de Falopio, comprendiendo el procedimiento la
administración a un paciente del anticuerpo contra HER2, y la gemcitabina, cada uno en cantidades eficaces para
tratar el cáncer en el que el anticuerpo contra HER2 bloquea la heterodimerización de HER2 con EGFR o HER3.
31. Un anticuerpo contra HER2 que se une al Dominio II de HER2, para su uso en un procedimiento para
40 tratar un cáncer resistente al platino seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de ovarios, carcinoma
peritoneal primario y carcinoma de las trompas de Falopio, que comprende la administración a un paciente del
anticuerpo contra HER2, y la gemcitabina, cada uno en cantidades eficaces para tratar el cáncer en el que el
anticuerpo contra HER2 bloquea la heterodimerización de HER2 con EGFR o HER3.
- 45 32. El anticuerpo según la reivindicación 31 que se une a la unión entre los dominios I, II y III de HER2.
33. El uso del anticuerpo contra HER2 según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la
fabricación de un medicamento para tratar un cáncer resistente al platino seleccionado entre el grupo que consiste
en cáncer de ovarios, carcinoma peritoneal primario y carcinoma de las trompas de Falopio, por un procedimiento tal
50 como se refiere en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

1 MELAALCRWG LLLALLPPGA ASTQVCTGTD MKLRLPASPE THLDMLRHLY QGCQVVQGNL ELTYLPTNAS LSFLQDIQEV QGVVLIAHNQ VRQVPLQRUR
 101 IVRGTQLFED NYALAVLDNG DPELNTPVT GASPGLREL QRLSTEILK GGVLIQRNPQ LCYQDTILMK DIFHKNNOLA LTLIDTNRSR ACHPCSPMCK
 201 GSRCWGESSE DCQSLRTRVC AGGCARCKGP LPTDCCHEQC AAGCTGPKHS DCLACLHFNH SGICELHCPA LVTYVDTTPE SMPNPEGRYT FGASCVTACP
 301 YNYLSTDVGS CTLVCPFHQ EVTAEDGTQ CEKCSKPCAR VCYGLGMEHL REVRAVTSAN IQEFAGCKKI FGSLAFLPES FDGDPASNTA PLQPEQLQVF
 401 ETLLEITGYL YISAWPDSLP DLSVFQNLQV IRGRILHNGA YSLTQGLGI SWLGLRSIRE LGSSLALIIH NTHLCFVHTV PWDQLFRNPH QALLHTANRP
 501 EDECVGEGLA CHQLCARGHC WPGPTQCVN CSQFLRGQEC VEECRVLQGL PREYVNRHC LPCHPECQPO NGSVTCFGPE ADQCVACAHY KDPPFCVARC
 601 PSGVKPDLISY MPIWKFPDEE GACQPCPINC THSCVDLDDK GCPAE (SEQ ID NO: 13)

FIG. 1A

7C2	aa	22-53	(31 RESIDUOS)
7F3	aa	22-53	(31 RESIDUOS)
2C4	aa	22-584	(562 RESIDUOS)
7D3	aa	22-584	(562 RESIDUOS)
3E8	aa	512-625	(113 RESIDUOS)
4D5	aa	529-625	(96 RESIDUOS)
2H11	aa	529-645	(116 RESIDUOS)
3H4	aa	541-599	(58 RESIDUOS)

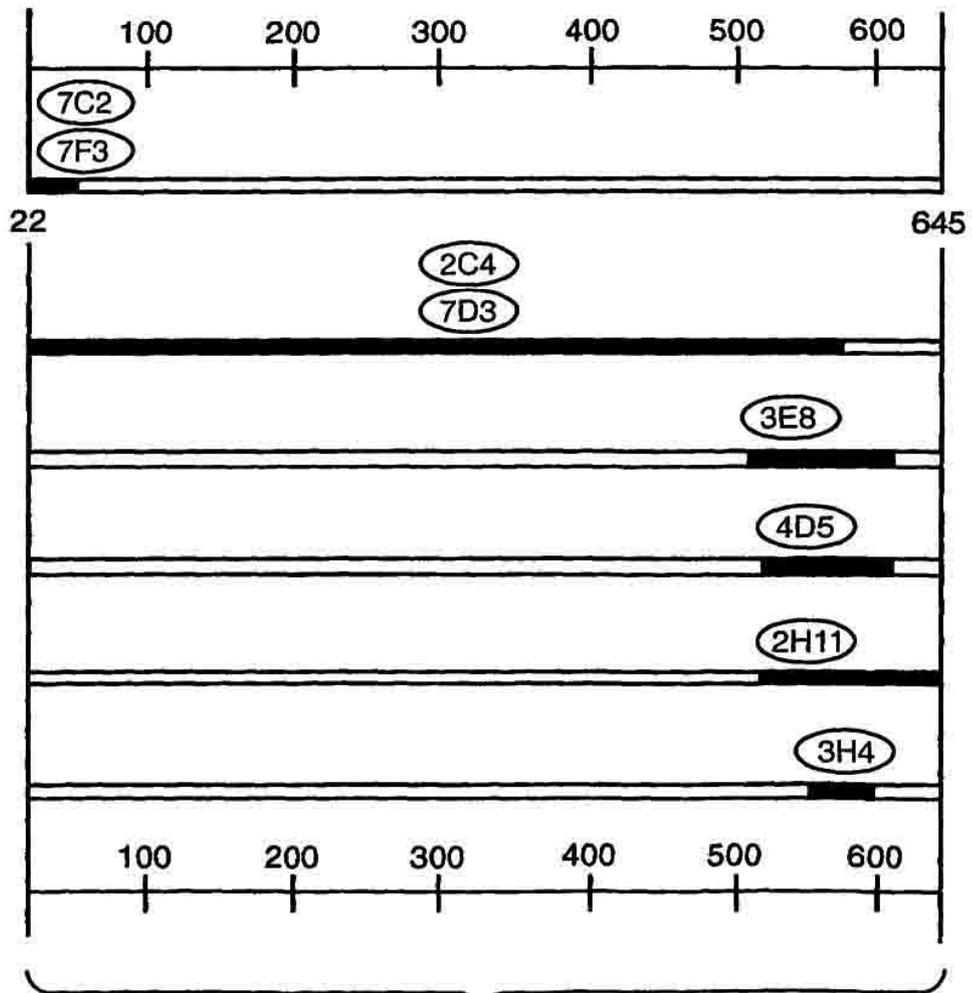


FIG. 1B

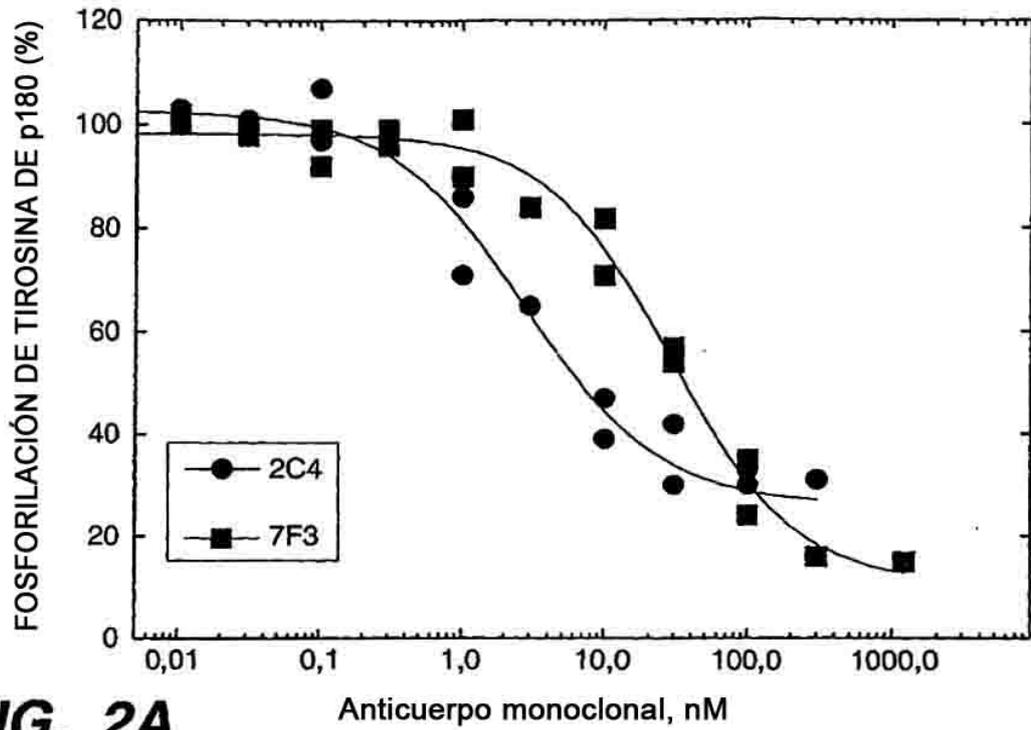


FIG. 2A

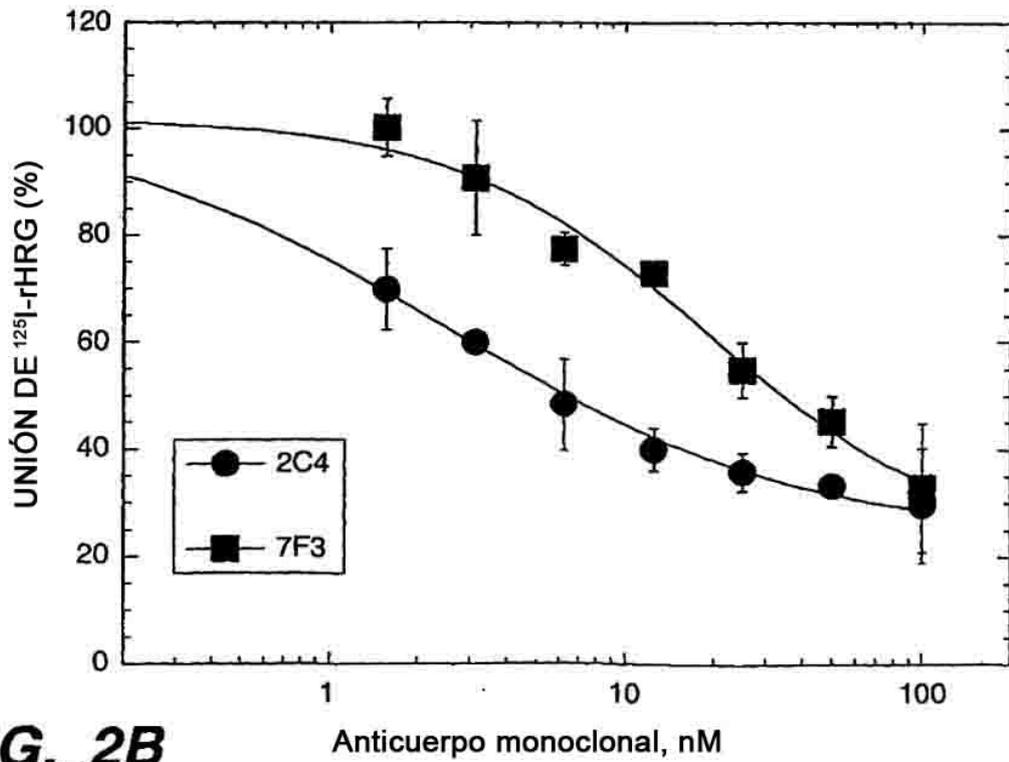


FIG. 2B

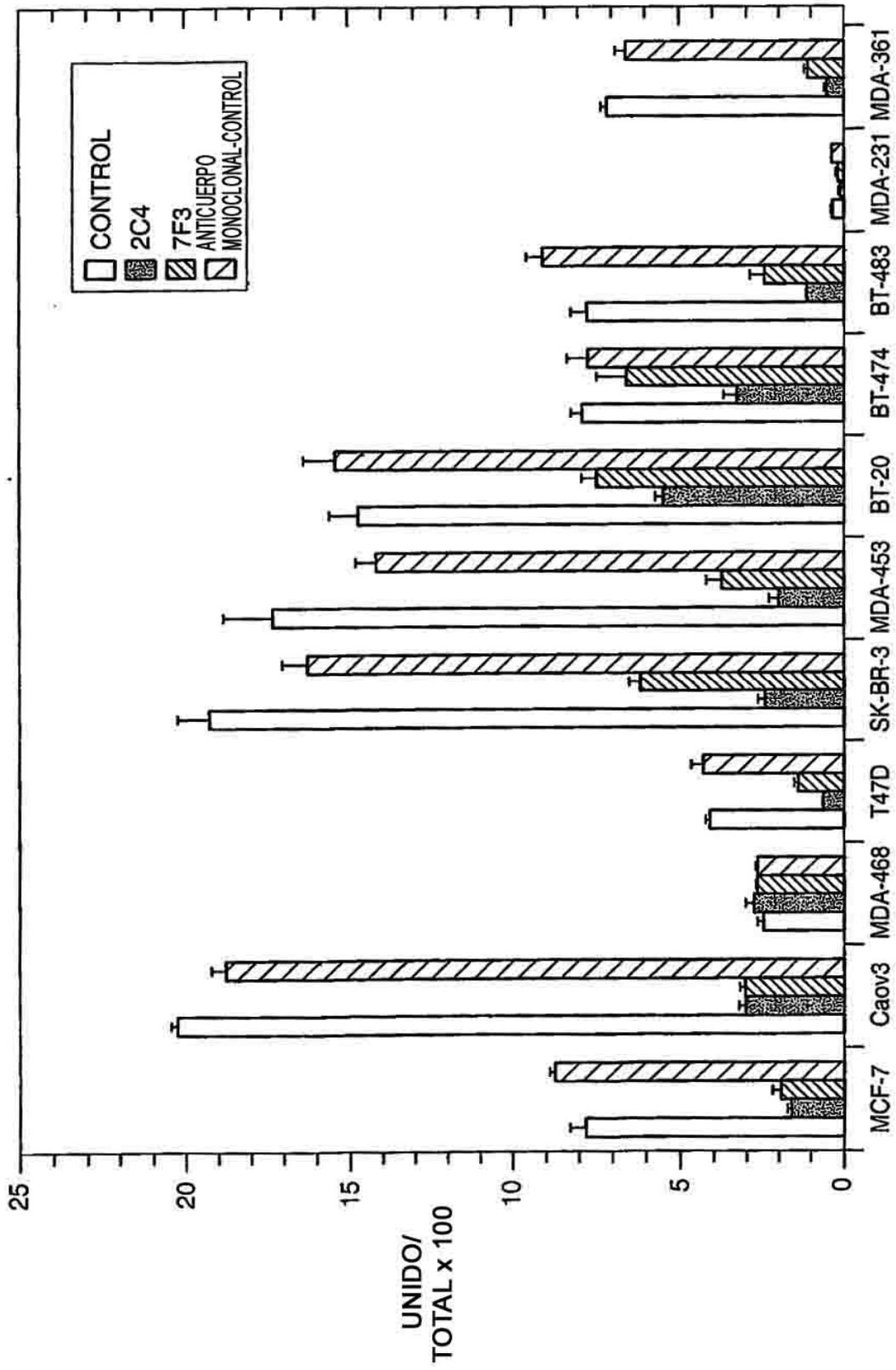


FIG. 3

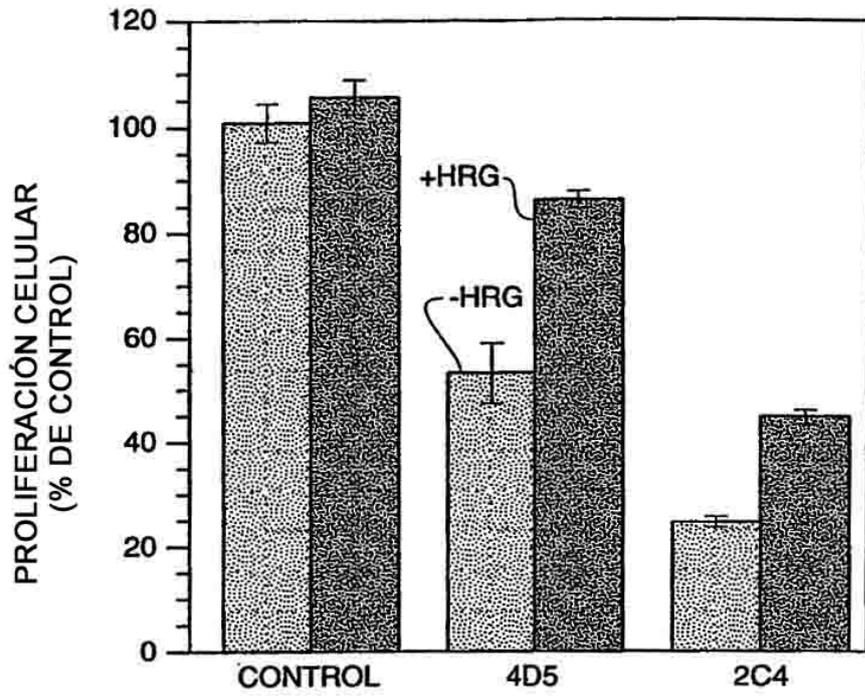


FIG. 4A

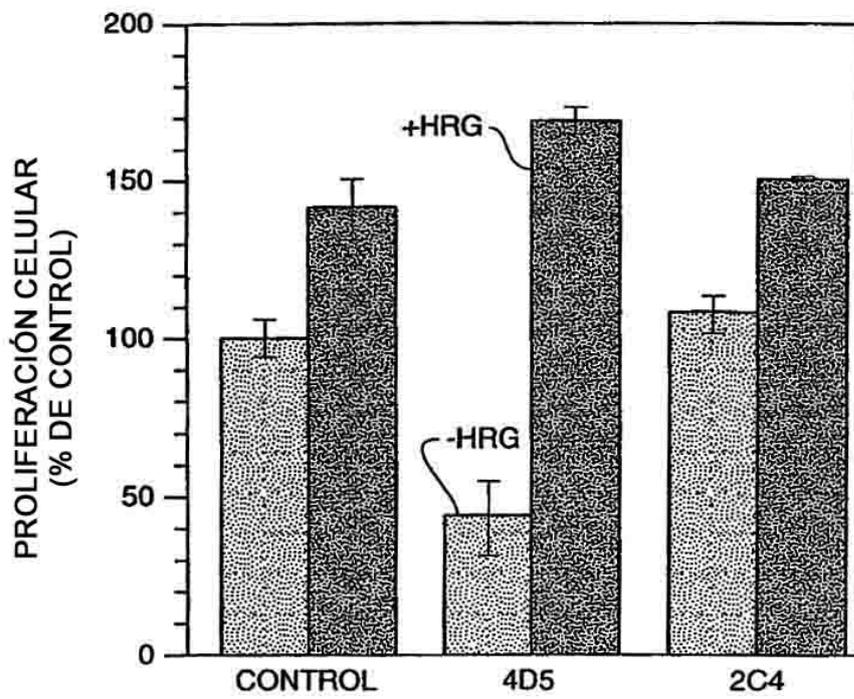


FIG. 4B

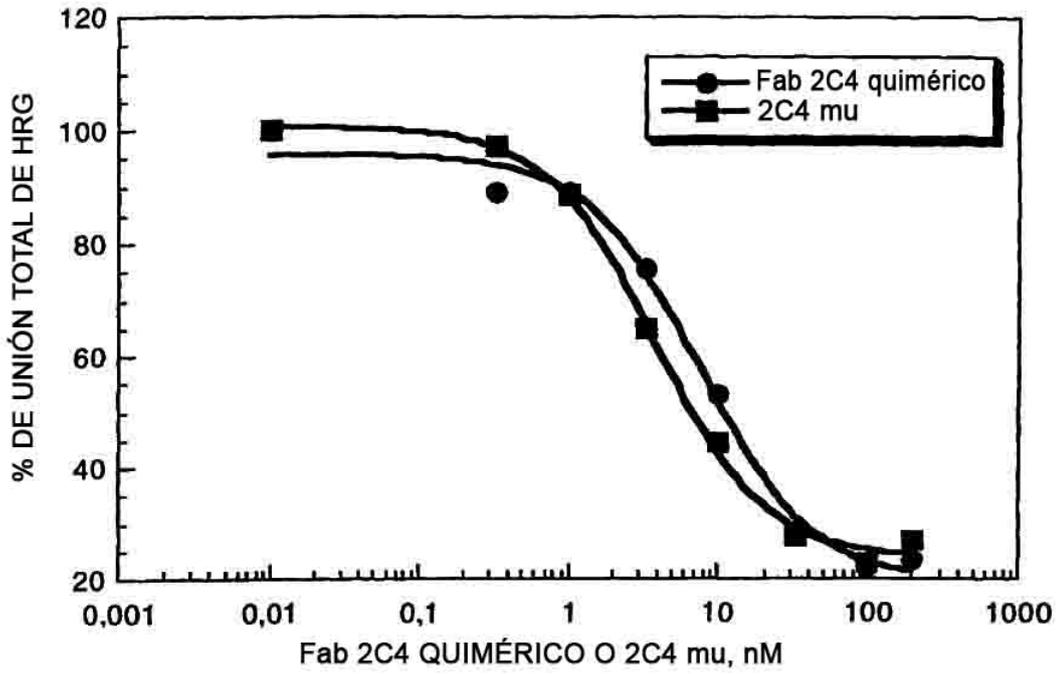


FIG. 6A

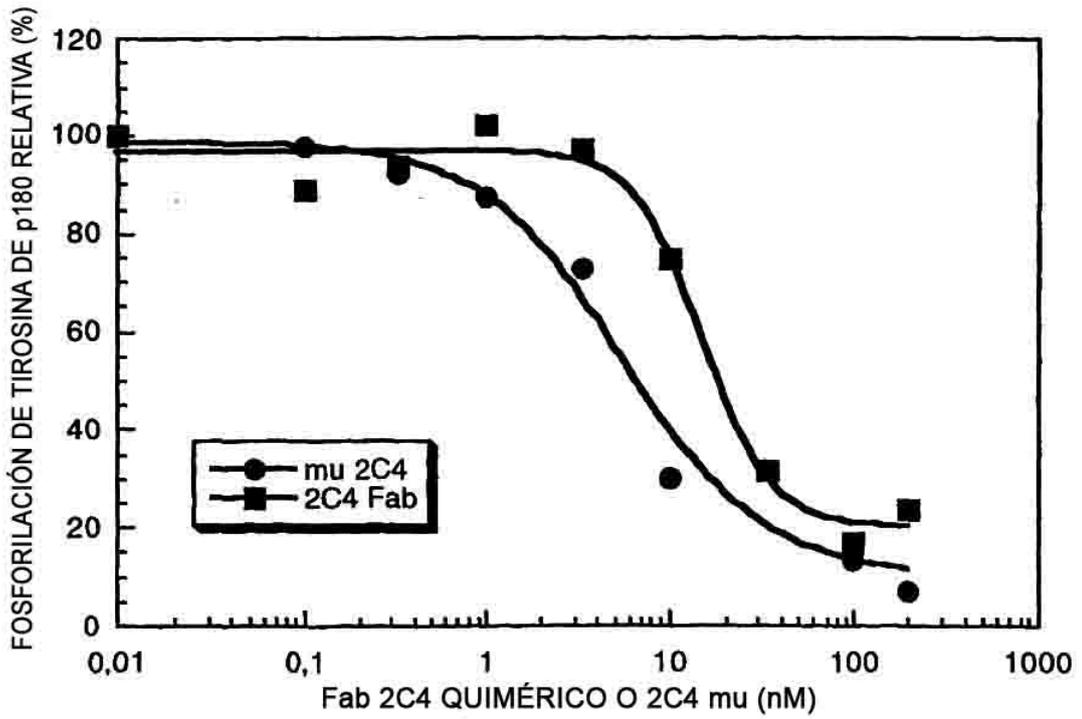


FIG. 6B

LIGERA VARIABLE

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQRP	
	** **** *	*	*	
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQKP	
		* ** ***		
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQKP	

	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQA		
	**	* *	* *	* *
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQP		
	* *****			
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQP		

	90	100	
2C4	EDLAVYYC [QYYIYPYT]	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:1)	
	* *	* *	
574	EDFATYYC [QYYIYPYT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:3)	
	*** *		
hum κI	EDFATYYC [QYNSLPWT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:5)	

FIG._7A

PESADA VARIABLE

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	** ** * * *** *		**	
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		** * *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	

	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM		
	* * **	*** *	**** *	
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	***** ** *	* * *		
hum III	PGKGLEWVA [VISGDDGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL		

	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:2)	
	*** **		**	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:4)	

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:6)	

FIG._7B

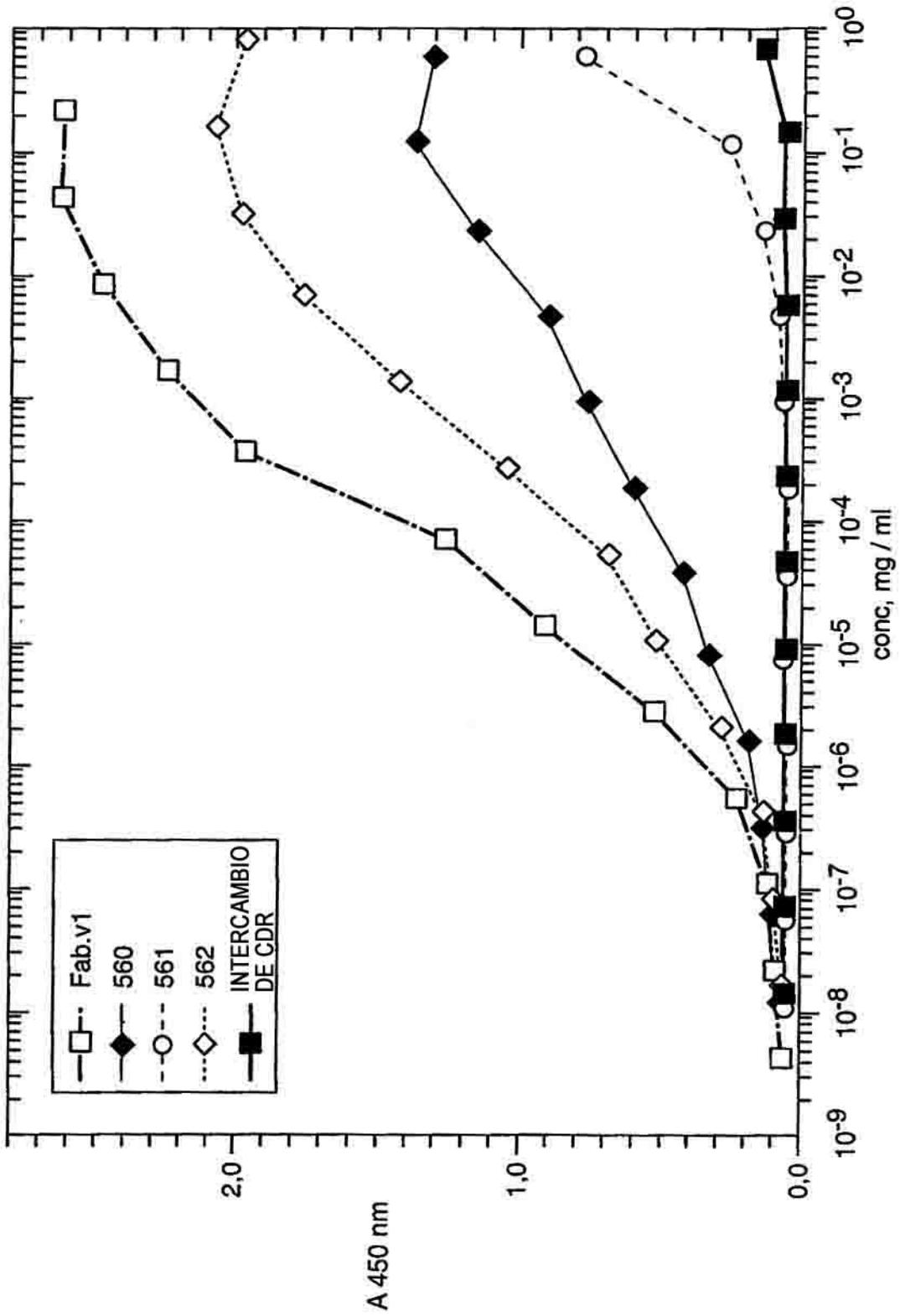


FIG._8A

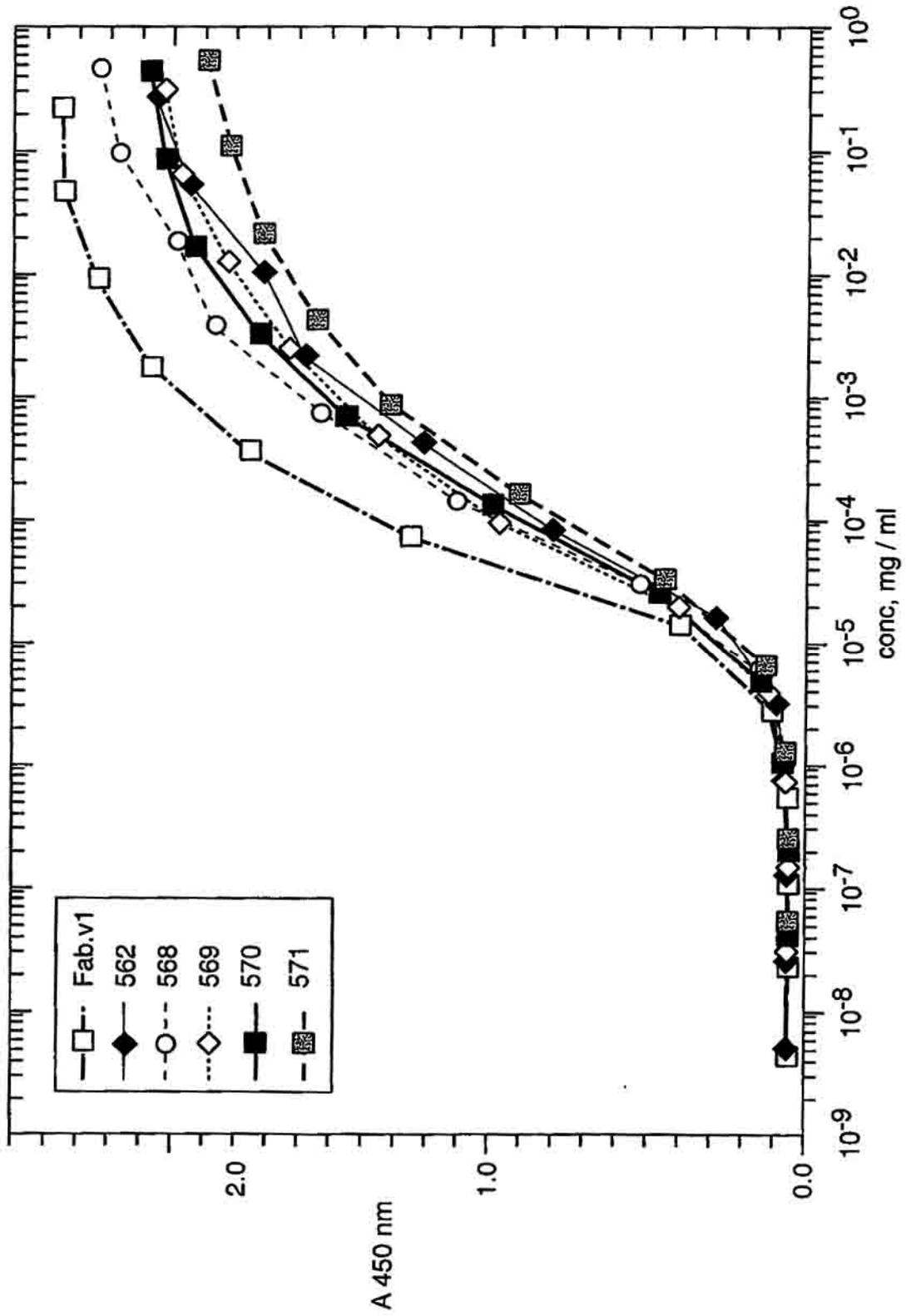


FIG. 8B

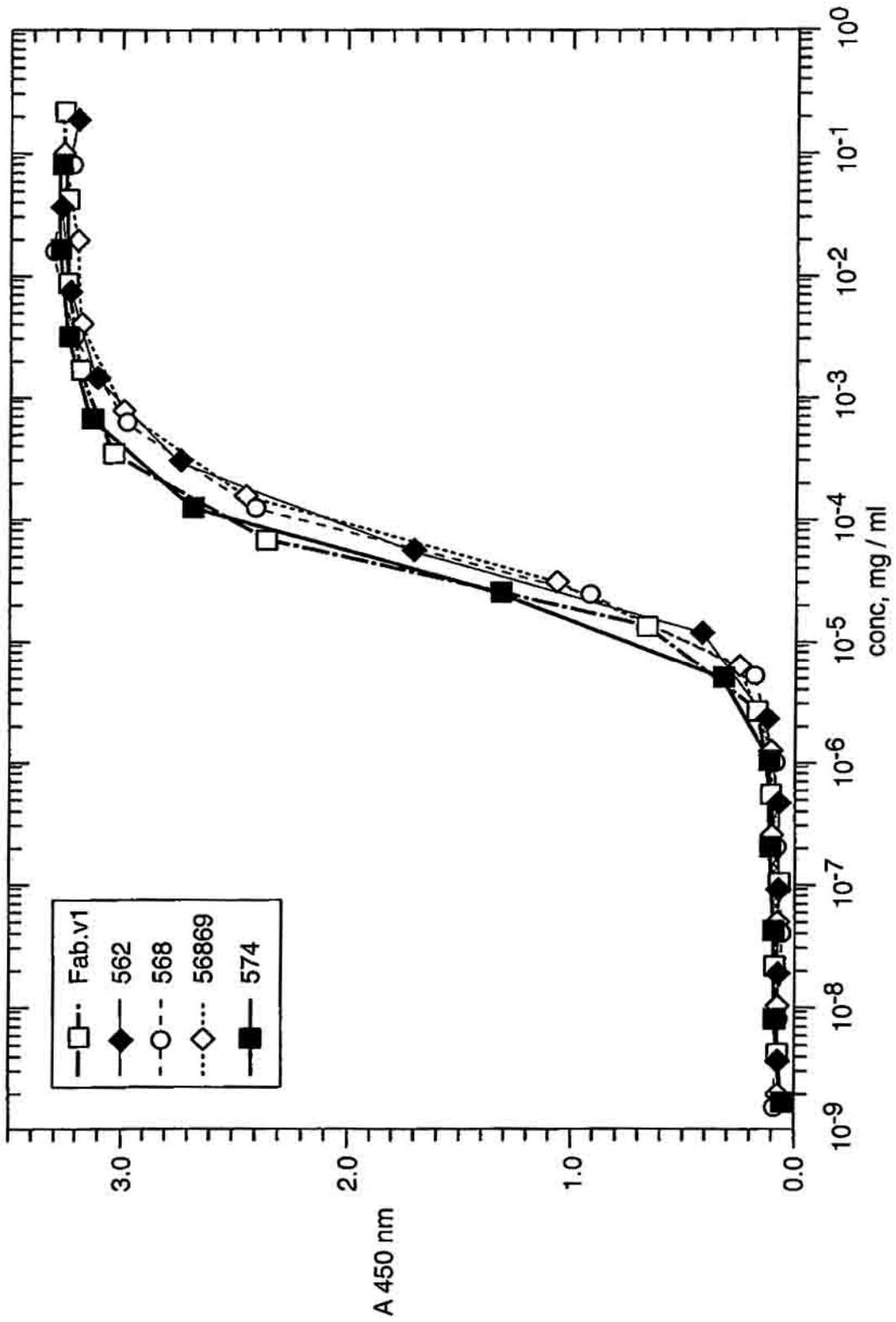


FIG._8C

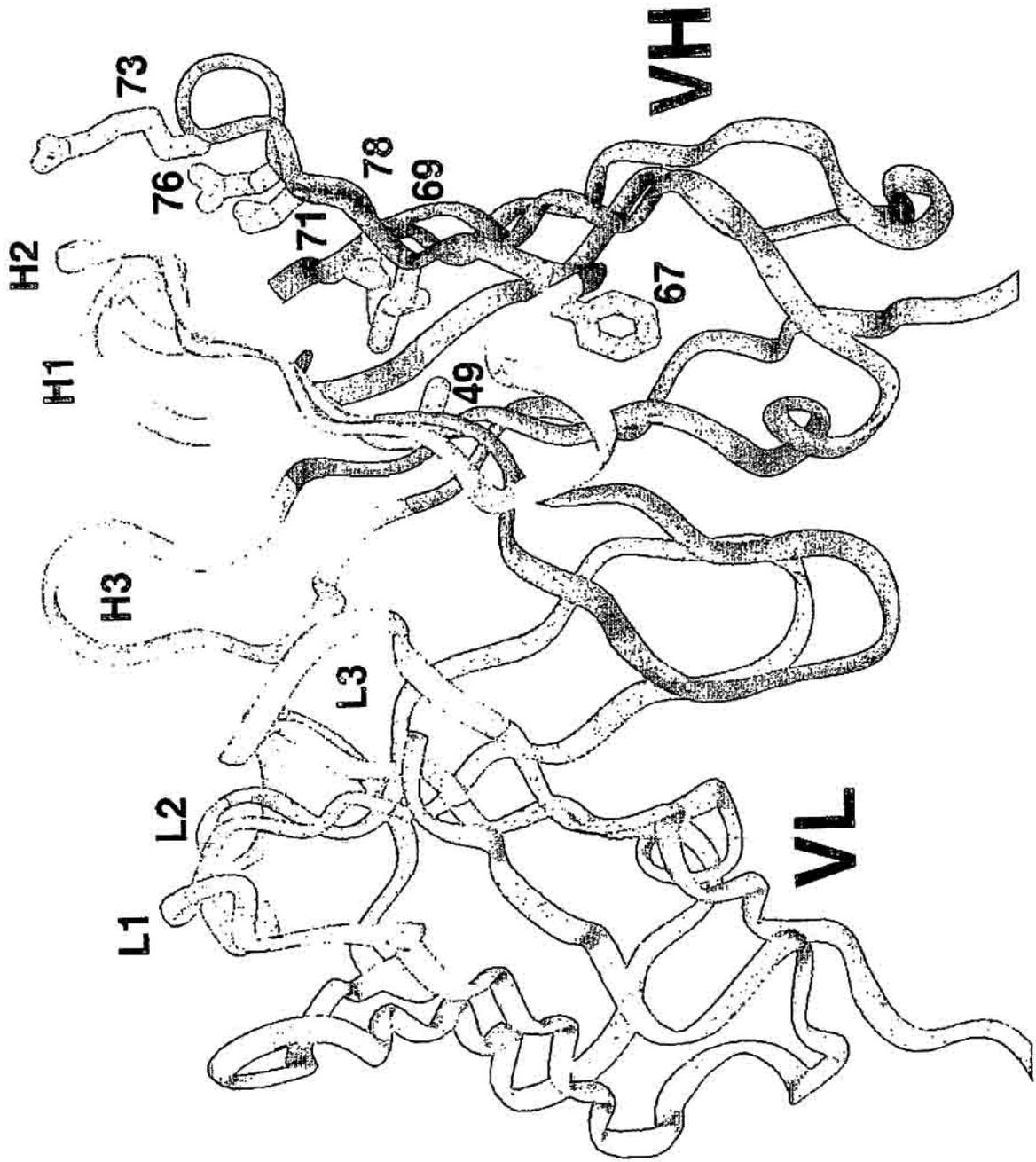


FIG. 9

CADENA PESADA

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFNIKDTYIHWVVRQAPGKGL 45
 30
 46 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED 90
 75
 91 TAVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASSTKGPSVFFLAPSS 135
 120
 136 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 180
 165
 181 GLYSLSVTVPSSSLGTTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK 225
 210
 226 THTCPPELLELGGPSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS 270
 255
 271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY~~N~~S~~T~~YRVVSVLTVLHQD 315
 300
 316 WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE 360
 330
 361 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG 405
 390
 406 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 449
 420 435

FIG._11B

CADENA LIGERA

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K A P K 45
46 L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q 90
91 Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L 135
136 L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T 180
181 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (SEQ ID NO: 16) 214

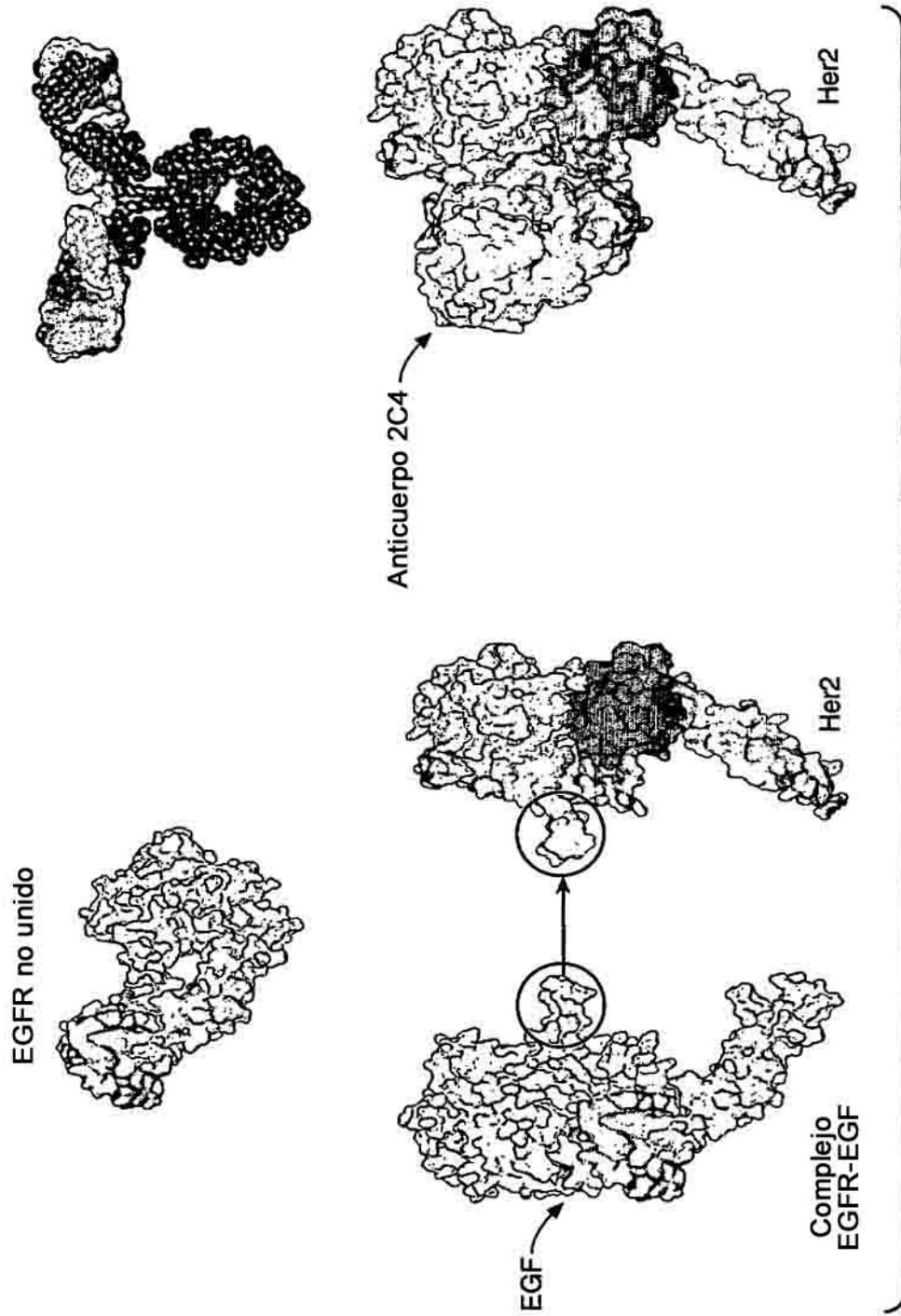
FIG.- 12A

CADENA PESADA

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDDWVRRQAPGKGL 45
46 EWVADVNPNSSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED 90
91 TAVYYCARNLRGPFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSSVFPPLAPSSK 135
136 STSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG 180
181 LYSLSSTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKKVEPKSCDKT 225
226 HTCPAPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPETCVVDVSH 270
271 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKKPREEQYNSITYRVSVLTVLHQDW 315
316 LNGKEVKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM 360
361 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS 405
406 FFLYSKLTVDKSRWQQGQGNVVFSSCSVMHEALHNHYTQKSSLSPGK 449
(SEQ ID NO: 17)

FIG.- 12B

El EGFR activado por ligando se heterodimeriza con HER2 2C4 y se une en el sitio de unión heterodimérico



Acoplamiento de HER2/3 a las rutas MAPK y Akt

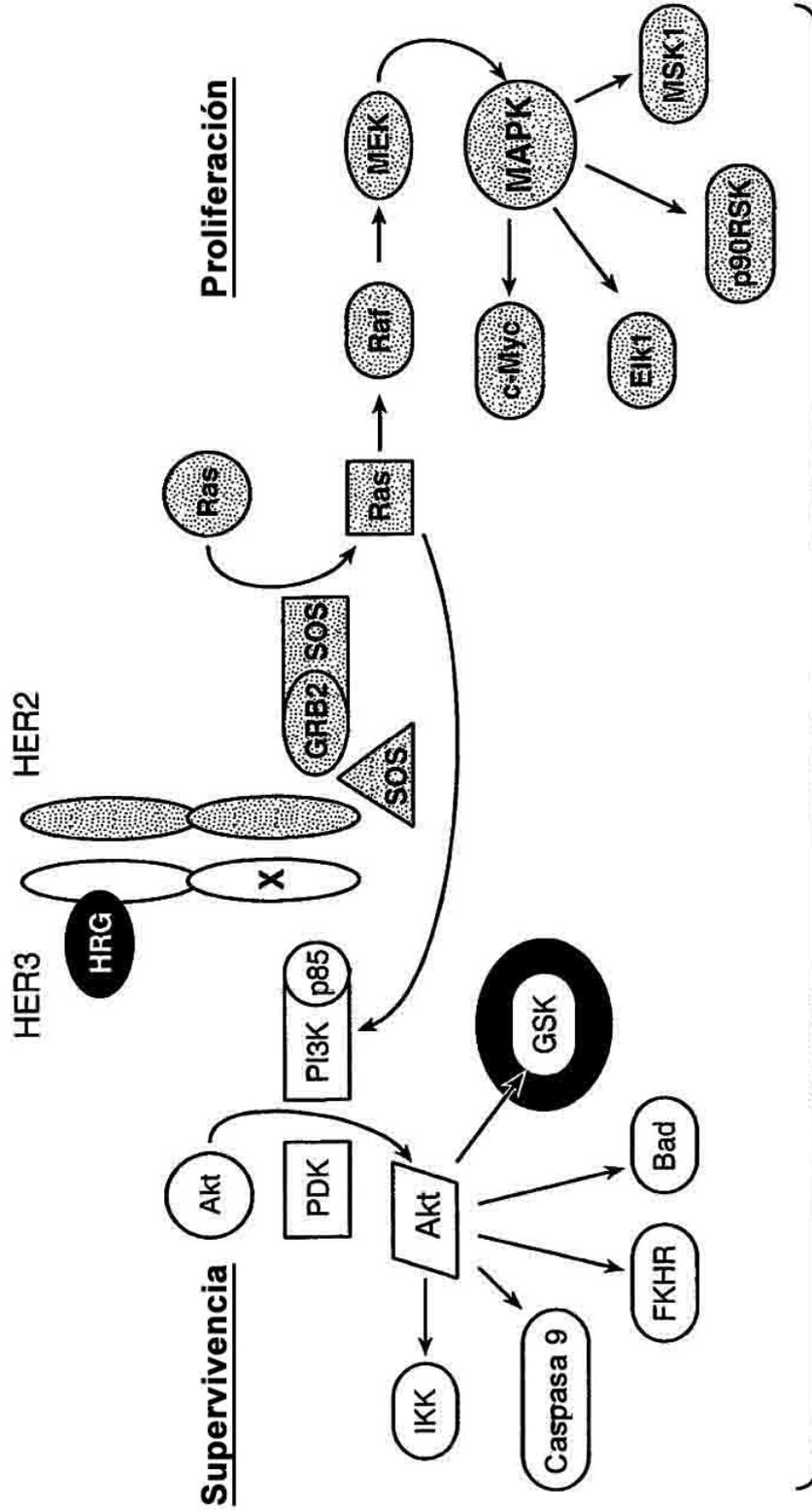
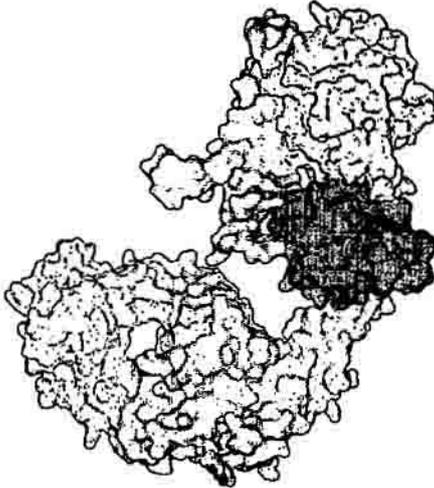


FIG.. 14

**Trastuzumab
Herceptin**



**Pertuzumab
Omnitarg**



- Se une en IV cerca de JM
- Protege frente a desprendimiento del receptor
- Afecta moderadamente a la modulación descendente del receptor
- Ligero efecto en la función de HER2 como correceptor

- Se une en II en interfaz de dimerización
- No impide desprendimiento del receptor
- Afecta moderadamente a la modulación descendente del receptor
- Efecto importante en la función de HER2 como correceptor

FIG. 15

