

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 940**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2008 E 08725722 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2129396**

54 Título: **Anticuerpos contra la ERBB3 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

16.02.2007 US 901904 P
02.01.2008 US 9796

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2013

73 Titular/es:

MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
ONE KENDALL SQUARE BLDG. 700, 2ND FLOOR
CAMBRIDGE, MA 02139, US

72 Inventor/es:

SCHOEBERL, BIRGIT;
NIELSEN, ULRIK;
FELDHAUS, MICHAEL;
BUCKLER, DAVID y
MURUGANANDAM, ARUMUGAM

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 431 940 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra la ERBB3 y usos de los mismos

5 **Antecedentes de la invención**

10 La subfamilia de receptores de factores de crecimiento polipeptídicos ErbB/HER incluye el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (EGFR, ErbB1/HER1), el producto del oncogén *neu* (ErbB2/HER2) y las más recientemente identificadas proteínas de los receptores ErbB3/HER3 y ErbB4/HER4 (véase, por ejemplo, Hynes y col. (1994) *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1198, 165 - 184). Se ha predicho que cada uno de estos receptores consiste en un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio que abarca la membrana, un dominio citosólico de tirosina cinasa de proteína (PTK) y un dominio de fosforilación C-terminal (véase, por ejemplo, Kim y col., (1998) *Biochem. J.* 334, 189 - 195).

15 Algunos experimentos *in vitro* han indicado que la actividad tirosina cinasa de proteína de la proteína ErbB3 está significativamente atenuada en comparación con la de otros miembros de la familia ErbB/HER, y esta atenuación se ha atribuido en parte a la aparición de sustituciones no conservativas de aminoácidos en el dominio catalítico predicho de la ErbB3 (véase, por ejemplo, Guy y col. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91, 8132 - 8136; Sierke y col. (1997) *Biochem. J.* 322, 757 - 763). Sin embargo, se ha demostrado que la proteína ErbB3 está fosforilada en
20 varios contextos celulares. Por ejemplo, la ErbB3 está fosforilada de forma constitutiva en los residuos de tirosina de un subconjunto de líneas celulares de cáncer de mama humano que sobreexpresan esta proteína (véase, por ejemplo, Kraus y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90, 2900 - 2904; y Kim y col. *Supra*; véase también, Schaefer y col. (2006) *Neoplasia* 8 (7): 613 - 22 y Schaefer y col. *Cancer Res* (2004) 64 (10): 3395 - 405).

25 Aunque se ha explorado el papel de la ErbB3 en el cáncer (véase, por ejemplo, Horst y col. (2005) 115, 519 - 527; Xue y col. (2006) *Cancer Res.* 66, 1418 - 1426), la ErbB3 sigue estando poco valorada como objetivo de intervención clínica. Las inmunoterapias actuales se centran principalmente en inhibir la acción de la ErbB2 y, en particular, la heterodimerización de los complejos de ErbB2/ErbB3 (véase, por ejemplo, Sliwkowski y col. (1994) *J. Biol. Chem.* 269 (20): 14661 - 14665 (1994)). Consecuentemente, es un objeto de la presente invención proporcionar
30 inmunoterapias mejoradas que inhiban de forma eficaz la señalización de la ErbB3, y que pueden usarse para tratar y diagnosticar varios cánceres.

El documento EP-A-1283053 describe el uso de un inhibidor de la actividad de la ErbB3, particularmente un anticuerpo anti-ErbB3 para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas.
35

El documento WO 2006/091209 describe procedimientos para mejorar la capacidad de unión específica de composiciones de unión bispecíficas. En una forma de realización la molécula objetivo es la ErbB3.

40 El documento WO 97/35885 describe anticuerpos que se unen a la proteína ErbB3 y adicionalmente poseen la capacidad de reducir la formación inducida por herregulina de un complejo de ErbB2-proteína ErbB3, de aumentar la afinidad de unión de la herregulina por la proteína ErbB3 y/o de reducir la activación inducida por herregulina de la ErbB2 en una célula que expresa ErbB2 y ErbB3.

45 Lee y Maihle (*Oncogene* (1998) 16: 3243 - 3252) describen el aislamiento y la caracterización de cuatro transcritos alternativos de *c-erbB3* expresados en líneas celulares derivadas de carcinoma de ovario y en tejidos humanos normales.

50 Pinkas-Kramarski y col. (*Oncogene* (1998) 16: 1249 - 1258) desvelan que heterodímero oncogénico de ErbB2/ErbB3 es un receptor sustituto del factor de crecimiento epidérmico y de la betacelulina.

Resumen de la Invención

55 La presente invención proporciona una nueva clase de anticuerpos monoclonales que se unen al receptor de la ErbB3 e inhiben varias funciones de la ErbB3. La invención proporciona un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo que se une a la ErbB3 humana y que comprende:

- 60 (a) una región variable de la cadena pesada, donde la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8 y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 9; y una región variable de la cadena ligera, donde la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 10, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 12; o
65 (b) una región variable de la cadena pesada, donde la CDR1, la CDR2 y la CDR3 comprenden unas secuencias de aminoácidos que son idénticas en al menos el 90% a las secuencias de aminoácidos de la CDR1, de la CDR2 y de la CDR3 definidas en (a); y una región variable de la cadena ligera, donde la CDR1, la CDR2 y la CDR3 comprenden unas secuencias de aminoácidos que son idénticas en al menos el 90% a las secuencias de aminoácidos de la CDR1, de la CDR2 y de la CDR3 definidas en (a) y donde el anticuerpo o una

porción de unión al antígeno del mismo es capaz de inhibir la fosforilación mediada por el ligando de tipo EGF de la ErbB3.

- 5 Según se describe en este documento, los ligandos de tipo EGF incluyen EGF, TGF- α , betacelulina, factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina, birregulina y anfirregulina, que se unen al EGFR e inducen la dimerización del EGFR con la ErbB3. Esta dimerización, a su vez, provoca la fosforilación de la ErbB3, y activa la señalización a través del receptor. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención, son por lo tanto útiles para el tratamiento y el diagnóstico de varios cánceres asociados con la señalización celular mediada por la ErbB3.
- 10 En otra forma de realización, los anticuerpos se caracterizan adicionalmente por una o más de las siguientes propiedades: (i) inhibición de la señalización mediada por ligando de la ErbB3, incluyendo la señalización mediada por la unión de ligandos de la ErbB3, tales como herregulina, epiregulina, epigenina y BIR, a la ErbB3 ; (ii) inhibición de la proliferación de células que expresan la ErbB3 ; (iii) capacidad para disminuir los niveles de la ErbB3 en la superficie de las células (por ejemplo, induciendo la internalización de la ErbB3); (iv) inhibición de la secreción del VEGF en las células que expresan la ErbB3 ; (v) inhibición de la migración de las células que expresan la ErbB3; (vi) inhibición del crecimiento esférico de las células que expresan la ErbB3 ; y/o (vii) unión a un epítipo ubicado en el dominio I (residuos 20 - 209) de la ErbB3, por ejemplo, un epítipo que implica o abarca los residuos 20 - 202 de la secuencia de aminoácidos de la ErbB3 .
- 15
- 20 Los anticuerpos monoclonales y las porciones de unión al antígeno de los mismos en particular de la presente invención muestran una K_D de 50 nM o menos, medida mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial o un ensayo de unión celular.
- 25 Los anticuerpos monoclonales y las porciones de unión al antígeno de los mismos en particular de la presente invención incluyen una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 90% (por ejemplo, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99%) a la región variable de la cadena pesada secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID N°: 1, en la SEC ID N°: 3, en la SEC ID N°: 5, en la SEC ID N°: 35 o en la SEC ID N°: 37. Otros anticuerpos monoclonales y porciones de unión al antígeno de los mismos en particular de la presente invención incluyen una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 90% (por ejemplo, el 95%, el 96%, el 97%, 98% o el 99%) a la región variable de la cadena ligera secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID N°: 2, en la SEC ID N°: 4, en la SEC ID N°: 6, en la SEC ID N°: 36 o en la SEC ID N°: 38. Los anticuerpos también pueden incluir ambas de las anteriormente mencionadas regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera.
- 30
- 35 La solicitud también describe anticuerpos y porciones de unión al antígeno de los mismos que incluyen una o más secuencias de CDR elegidas de entre una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID N°: 13; una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID N°: 14; una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID N°: 15; una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID N°: 16; una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID N°: 17; una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID N°: 18; y combinaciones de las mismas.
- 40
- 45 Todavía otros anticuerpos y porciones de unión al antígeno de los mismos descritos incluyen; una o más secuencias de CDR elegidas de entre una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID N°: 19; una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID N°: 20; una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID N°: 21; una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID N°: 22; una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID N°: 23; una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID N°: 24; y combinaciones de las mismas.
- 50
- 55 Todavía otros anticuerpos y porciones de unión al antígeno de los mismos descritos incluyen; una o más secuencias de CDR elegidas de entre una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID N°: 39; una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID N°: 40; una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID N°: 41; una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID N°: 42; una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID N°: 43; una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID N°: 44; y combinaciones de las mismas.
- 60
- 65 Todavía otros anticuerpos y porciones de unión al antígeno de los mismos descritos incluyen; una o más secuencias de CDR elegidas de entre una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende la SEC ID N°: 45; una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende la SEC ID N°: 46; una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende la SEC ID N°: 47; una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende la SEC ID N°: 48; una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende la SEC ID N°: 49; una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende la SEC ID N°: 50; y combinaciones de las mismas.
- En una forma de realización, los anticuerpos y las porciones de unión al antígeno de los mismos son completamente humanos (es decir, contienen secuencias de CDR y en marco humanas). Algunos anticuerpos humanos en particular de la presente invención incluyen aquellos con una región variable de la cadena pesada que proceden de un gen de la línea germinal humana VH3 y/o una región variable de la cadena ligera que procede de un gen de la

línea germinal humana VL2.

También están englobados por la presente invención los anticuerpos monoclonales y las porciones de los mismos que se unen a los mismos o epítomos superpuestos unidos por cualquiera de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en este documento (por ejemplo, un epítomo ubicado en el dominio I de la ErbB3, tal como un epítomo que implica o abarca los residuos 20 - 202 de la secuencia de aminoácidos de la ErbB3). Los anticuerpos que tienen la misma actividad que los anticuerpos descritos en este documento, por ejemplo, los anticuerpos con la misma secuencia que el Ab #6, también están englobados por la presente invención. En particular, la invención proporciona un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo de la invención, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen todas las formas conocidas de anticuerpos y otros esqueletos proteicos con propiedades de tipo anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico o un esqueleto proteico con propiedades de tipo anticuerpo, tal como fibronectina o repeticiones de anquirina. El anticuerpo también puede ser un Fab, un Fab'2, un ScFv o un anticuerpo de dominio. El anticuerpo también puede tener cualquiera de los siguientes isotipos: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD e IgE.

En otra forma de realización más, la presente invención también proporciona composiciones que comprenden combinaciones de anticuerpos o de porciones de unión al antígeno descritos en este documento, formulados con un portador y/o coadyuvante aceptable. En una forma de realización en particular, la composición comprende dos o más anticuerpos que se unen a epítomos diferentes de la ErbB3 o los anticuerpos descritos en este documento combinados con anticuerpos antineoplásicos que no se unen a la ErbB3.

Todavía en otra forma de realización, la presente invención proporciona una composición de un ácido nucleico aislado que codifica para un anticuerpo humano que se une a la ErbB3 humano, composición que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para una región variable de la cadena pesada, secuencia que es idéntica en al menos el 90% a, o es una secuencia que hibrida bajo una elevada rigurosidad, con la SEC ID N°: 25 y un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para una región variable de la cadena ligera, secuencia que es idéntica en al menos el 90% a, o es una secuencia que hibrida bajo una elevada rigurosidad, con la SEC ID N°: 26. Los ácidos nucleicos pueden estar comprendidos en vectores de expresión.

La presente invención también proporciona células hospedadoras transgénicas de mamíferos no humanos, hibridomas y plantas transgénicas que expresan y/o producen los anticuerpos y las porciones de unión al antígeno descritos en este documento.

La invención también proporciona kits que comprenden uno o más anticuerpos monoclonales aislados o porciones de unión al antígeno de los mismos descritos en este documento, e instrucciones para su uso en el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad asociada con la señalización dependiente de la ErbB3, tales como los cánceres. Los anticuerpos y las porciones de unión al antígeno de los mismos de la presente invención pueden usarse en una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas y diagnósticas, particularmente aplicaciones oncológicas. Consecuentemente, en otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo de la invención para su uso en un procedimiento para inhibir la fosforilación mediada por ligando de tipo EGF de la ErbB3 o para el tratamiento del cáncer en un sujeto humano, donde opcionalmente el cáncer es melanoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, carcinoma renal, cáncer gastrointestinal/de colon, cáncer de pulmón, sarcoma de células claras o cáncer de próstata. Los anticuerpos o las porciones de unión al antígeno de los mismos pueden administrarse solos o junto con otros agentes terapéuticos, tales como agentes antineoplásicos, por ejemplo, otros anticuerpos, agentes quimioterapéuticos y/o radiación.

En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo de la invención para su uso según la invención, donde el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo se administra al sujeto por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea; y/o se administra junto con un segundo anticuerpo antineoplásico, tal como un anticuerpo anti-IGF1R, un anticuerpo anti-EGFR o un anticuerpo anti-cMet, o una molécula antineoplásica pequeña, tal como un antimetabolito, un agente alquilante, un inhibidor de la topoisomerasa, un agente dirigido a los microtúbulos, un inhibidor de la cinasa, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inmunoterapéutico, una hormona o un análogo de la misma, un análogo de somatostatina, un glucocorticoide, un inhibidor de la aromatasas, un inhibidor de la mTOR, una molécula pequeña dirigida al IGF1R o una molécula pequeña dirigida al EGFR.

En otras formas de realización más, la invención proporciona un anticuerpo o una porción de unión al antígeno de la invención para su uso en un procedimiento de diagnóstico del cáncer asociado con la ErbB3 en un sujeto, que comprende (a) poner en contacto *ex vivo* o *in vivo* células del sujeto con dicho anticuerpo o con una porción de unión al antígeno del mismo, y (b) medir el nivel de unión de dicho anticuerpo o de dicha porción de unión al antígeno a la ErbB3 en las células, donde unos niveles anormalmente elevados de unión de dicho anticuerpo o de dicha porción de unión al antígeno a la ErbB3 indican que el sujeto tiene un cáncer asociado con la ErbB3.

Otras características y ventajas de la invención serán apreciables a partir de la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

- 5 Las Figuras 1A y 1B son gráficos de barras que representan la unión de varios candidatos a anticuerpo anti-ErbB3 (Fabs, denominados en este documento Abs) a la ErbB3 expresada en células de melanoma MALME-3M usando un anticuerpo secundario de cabra anti-Alexa 647 humana.
- 10 Las Figuras 2A - 2D son gráficos que representan los valores de la K_D de varios candidatos a anticuerpo anti-ErbB3. Las Figuras 2A y 2B son gráficos que representan el valor de la K_D del Anticuerpo # 6 (denominado Ab #6) y del Anticuerpo # 3 (denominado Ab #3), respectivamente, medidos mediante el uso de tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR). Las Figuras 2C y 2D son gráficos que representan los valores de la K_D de Ab #6 y Ab #3, respectivamente, medidos mediante el uso de un ensayo de unión celular usando células de melanoma MALME-3M.
- 15 La Figura 3 es un gráfico que representa la especificidad de unión de un anticuerpo anti-ErbB3 (Ab #6) a la ErbB3 usando ELISA. Como controles se usaron EGFR, BSA y TGF- α . La Figura 4 es un gráfico que representa la capacidad de un anticuerpo anti-ErbB3 (Ab #6) para disminuir los niveles totales de ErbB3 en células de melanoma MALME-3M *in vitro*, medido mediante el uso de un ELISA.
- 20 Las Figuras 5A y 5B son gráficos que representan la capacidad de un anticuerpo anti-ErbB3 (Ab #6) para regular por disminución los receptores de la ErbB3 en células MALME-3M, medido mediante el uso de un análisis por FACS. La Figura 5A muestra los resultados usando un isotipo IgG1 del anticuerpo la Figura 5B muestra los resultados usando un isotipo IgG2 del anticuerpo.
- 25 Las Figuras 6A - 6D son gráficos que representan la evolución temporal de la regulación por disminución de la ErbB3 mediada por anticuerpo (Ab #6), medida mediante el uso de un análisis por FACS. La Figura 7 es un gráfico de barras que representa la capacidad de varios anticuerpos anti-ErbB3 para regular por disminución la ErbB3 en células de melanoma *in vivo*.
- 30 La Figura 8 es un gráfico de barras que representa la capacidad de un anticuerpo anti-ErbB3 (Ab #6) para regular por disminución la ErbB3 en xenoinjertos de ADRr *in vivo*. La Figura 9 es un gráfico de barras que representa la capacidad de un anticuerpo anti-ErbB3 (Ab #6) para inhibir la proliferación de células MALME-3M en un ensayo de Cell Titer Glow.
- La Figura 10 es un gráfico de barras que representa la capacidad de un anticuerpo anti-ErbB3 (Ab #6) para inhibir la proliferación celular en una línea celular de ovario, ADRr.
- 35 La Figura 11 es un gráfico de barras que representa la capacidad de un anticuerpo anti-ErbB3 (Ab #6) para inhibir la proliferación de células ACHN. La Figura 12 es un gráfico de barras que representa la capacidad de un anticuerpo anti-ErbB3 (Ab #6) para inhibir la fosforilación de la ErbB3 en xenoinjertos de ADRr *in vivo*.
- 40 Las Figuras 13A - 13C son gráficos que representan la capacidad de un anticuerpo anti-ErbB3 (Ab #6) para inhibir la fosforilación mediada por betacelulina y herregulina de la ErbB3 en células ADRr. Las Figuras 14A - 14B son gráficos que representan la capacidad de un anticuerpo anti-ErbB3 (isotipo IgG2 del Ab #6) para inhibir la fosforilación de la ErbB3 en las líneas celulares de tumor de ovario OVCAR 5 y OVCAR 8.
- 45 Las Figuras 15A - 15C son gráficos que representan la capacidad de la betacelulina (BTC) para unirse a la ErbB1 según se muestra por una ausencia de unión a células la MALME-3M negativas en ErbB1 (Figura 17A); la unión a células ADRr positivas en ErbB1 a unas concentraciones de 10 nM (Figura 17B) y 200 nM (Figura 17B), respectivamente, y la inhibición de dicha unión por Erbitux.
- 50 Las Figuras 16A - 16B son gráficos que representan la capacidad de un anticuerpo anti-ErbB3 (isotipo IgG2 del Ab #6) para inhibir la señalización mediada por herregulina en células MALME-3M. La Figura 16A representa la capacidad del Ab #6 para inhibir la fosforilación mediada por herregulina de la ErbB3 en células MALME-3M y la 16B representa la capacidad del Ab #6 para inhibir la fosforilación de la AKT en células MALME-3M.
- 55 Las Figuras 17 A - D son gráficos que representan la capacidad de un anticuerpo anti-ErbB3 (Ab #6) para inhibir el crecimiento celular en (A) ovario (células ADRr), (B) próstata (células Du145), (C) ovario (células OvCAR8) y (D) páncreas (células Colo357) a través de estudios con xenoinjertos.
- 60 Las Figuras 18A y 18B son gráficos que representan la capacidad del Ab #6 (Figura 18A) y del Fab para el Ab #3 (Figura 18B) de inhibir la unión de la herregulina a la ErbB3 en células MALME-3M, medido mediante el uso de un análisis por FACS.
- 65 Las Figuras 19A y 19B son gráficos que representan la capacidad del Ab #6 para inhibir la unión de la eprregulina a la ErbB3 en células ADRr. La Figura 19A representa la unión de la eprregulina a células ADRr, y la Figura 19B representa la capacidad de Erbitux y de Ab #6 de inhibir la unión de la eprregulina a células ADRr.
- Las Figuras 20A y 20B son gráficos que representan la capacidad del factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) para unirse a la ErbB en células ADRr (Figura 20A) y la incapacidad de un anticuerpo anti-ErbB3 (Ab #6) para inhibir dicha unión (Figura 20B).
- Las Figuras 21A - 21C muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones de la cadena variable pesada y ligera de los anticuerpos: Ab #6, Ab #3, Ab #14, Ab #17 y Ab #19.
- Las Figuras 22A - 22B muestran las secuencias de nucleótidos de las regiones de la cadena variable pesada y ligera de los anticuerpos: Ab #6, Ab #3, y Ab #14.

La Figura 23 muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones de la cadena ligera variable de los anticuerpos: Ab #6, Ab #17, y Ab #19, que han sido revertidas a la correspondiente secuencia de aminoácidos de la línea germinal. Los cambios en los residuos de aminoácidos están subrayados.

Las Figuras 24A - 24C son gráficos que representan la capacidad del Ab #6 para inhibir la secreción del VEGF en células tumorales.

La Figura 25 es un gráfico que muestran el efecto del Ab #6 sobre la migración celular.

Las Figuras 26 A - C son gráficos que muestran (A) la inhibición del crecimiento esferoidal en células AdrR, (B) la inhibición del crecimiento esferoidal inducido por HRG en AdrR, y (C) la inhibición del crecimiento esferoidal inducido por HRG en células Du145.

Las Figuras 27 A y B son gráficos que muestran el efecto del Ab #6 en (A) HRG y (B) la unión de la BTC a células AdrR.

La Figura 28 es un gráfico que muestra el efecto del Ab #6 sobre la fosforilación de la ErbB3 inducida por el HGF.

Las Figuras 29 A y B muestran el efecto del Ab #6 sobre la fosforilación de (A) la pErbB1 y la pErbB3 y (B) la formación del complejo ErbB2/3 inducida por HRG.

La Figura 30 es un gráfico que muestra la unión del Ab #6 a los residuos de aminoácidos 20 - 202 de la ErbB3.

Descripción detallada de la invención

Con objeto de que la presente invención pueda ser comprendida con mayor facilidad, en primer lugar se definen ciertos términos. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

I. Definiciones

Los términos "ErbB3", "HER3", "receptor ErbB3" y "receptor HER3", según se usan de forma intercambiable en este documento, se refieren a la proteína ErbB3 humana, según se describe en la patente de EE.UU. N° 5.480.968 y en Plowman y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 87: 4905 - 4909 (1990); véase también, Kani y col., Biochemistry 44: 15842 - 857 (2005), Cho y Leahy, Science 297: 1330 - 1333 (2002).

El término "ligando de tipo EGF", según se usa en este documento, se refiere a ligandos del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y proteínas estrechamente relacionadas, tales como el factor de crecimiento transformante α (TGF- α), betacelulina (BTC), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), birregulina (BIR) y anfirregulina (AR), que se unen al EGFR de la superficie de las células y estimulan la actividad cianasa de tirosina de proteínas intrínseca del receptor. Específicamente, los ligandos de tipo EGF inducen la formación del complejo entre el EGFR (también denominado ErbB1) y la proteína ErbB3 (véase, por ejemplo, Kim y col., (1998) Biochem J., 334: 189-195), que da como resultado la fosforilación de residuos de tirosina en el complejo.

Los anticuerpos y las porciones de unión al antígeno de los mismos de la presente invención inhiben la fosforilación mediada por ligando de tipo EGF de la ErbB3 y, en ciertas formas de realización, muestran una o más de las siguientes propiedades adicionales: (i) inhibición de una o más de la señalización mediada por herregulina, epirregulina, epigenina y birregulina (BIR) hasta la ErbB3; (ii) inhibición de la proliferación de las células que expresan la ErbB3; (iii) capacidad para disminuir los niveles de la ErbB3 en la superficie de las células; (iv) inhibición de la secreción del VEGF de las células que expresan la ErbB3; (v) inhibición de la migración de las células que expresan la ErbB3; (vi) inhibición del crecimiento esferoidal de las células que expresan la ErbB3; y/o (vii) unión a un epítipo ubicado en el dominio I de la ErbB3, por ejemplo, un epítipo que implica o abarca los residuos 20 - 202 de la secuencia de aminoácidos de la ErbB3.

El término "inhibición", según se usa en este documento, se refiere a cualquier disminución estadísticamente significativa de la actividad biológica, incluyendo el bloqueo completo de la actividad. Por ejemplo, "inhibición" puede referirse a una disminución de aproximadamente el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 100% en la actividad biológica.

Consecuentemente, la frase "inhibición de la fosforilación mediada por ligando de tipo EGF de la ErbB3", según se usa en este documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo de disminuir estadísticamente significativamente la fosforilación de la ErbB3 inducida por un ligando de tipo EGF, con respecto a la fosforilación en una célula no tratada (control). La célula que expresa la ErbB3 puede ser una célula o una línea celular natural, o puede estar producida recombinantemente mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica para la ErbB3 en una célula hospedadora. En una forma de realización, el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo inhibe la fosforilación mediada por ligando de tipo EGF de la ErbB3 en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90%, o 100%, según se determina, por ejemplo, mediante una inmunotransferencia Western seguido de un sondeo con un anticuerpo anti-fosfotirosina según se describe en Kim y col., (1998) Biochem J., 334: 189 - 195 y en los Ejemplos, *infra*.

La expresión "inhibición de la señalización mediada por herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina hasta la ErbB3", según se usa en este documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo de disminuir estadísticamente significativamente la señalización mediada por un ligando de la ErbB3 (por ejemplo, herregulina, epirregulina, epigenina y birregulina) hasta la ErbB3, con respecto a la señalización en ausencia del anticuerpo (control). Los ligandos de la ErbB3 también se denominan este documento "ligandos de tipo herregulina". Esto significa que, en presencia del anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo, una señal mediada en una célula que expresa la ErbB3 por una o más de herregulina, epirregulina, epigenina y birregulina, con respecto a un control (sin anticuerpo), está estadísticamente significativamente disminuida. Una señal mediada por un ligando de la ErbB3 puede ser medida mediante el ensayo del nivel o de la actividad de un sustrato de la ErbB3, y/o de una proteína que esté presente en una cascada celular que implique la ErbB3. En una forma de realización, el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo disminuye el nivel o la actividad de un sustrato de la ErbB3 y/o los de una proteína en una cascada celular que implica la ErbB3, en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90% o el 100% relativo al nivel o a la actividad en ausencia de dicho anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo (control). Dicha señalización mediada por un ligando de la ErbB3 puede medirse mediante el uso de técnicas reconocidas en la técnica que miden el nivel o la actividad de un sustrato de la ErbB3 (por ejemplo, SHC o PI3K) o de una proteína en una cascada celular que implica la ErbB3 (por ejemplo, AKT) usando ensayos de cinasa para dichas proteínas (véase, por ejemplo, Horst y col. *supra*, Sudo y col. (2000) *Methods Enzymol*, 322: 388 - 92; y Morgan y col. (1990) *Eur. J. Biochem.*, 191: 761 - 767).

En una forma de realización en particular, el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo inhibe la señalización mediada por ligando de la ErbB3 (por ejemplo, herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina) hasta la ErbB3 mediante la inhibición de la unión del ligando de la ErbB3 (por ejemplo, uno o más de herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina) a la ErbB3. Algunos ligandos (por ejemplo, birregulina o BIR) funcionan tanto como ligandos de tipo EGF (es decir, se unen a EGFR/ErbB1) como ligandos de tipo ErbB3 (es decir, se unen a la ErbB3).

La expresión "inhibición de la unión de herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina a la ErbB3", según se usa en este documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo para disminuir estadísticamente significativamente la unión de un ligando de la ErbB3 (por ejemplo, uno o más de herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina) a la ErbB3, con respecto a la unión en ausencia del anticuerpo (control). Esto significa que, en presencia del anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo, la cantidad de ligando de la ErbB3 (por ejemplo, herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina) que se une a la ErbB3 con respecto a un control (sin anticuerpo), está estadísticamente significativamente disminuida. La cantidad de un ligando de la ErbB3 que se une a la ErbB3 puede estar disminuida en presencia de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo de la invención en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90% o el 100% con respecto a la cantidad en ausencia del anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo (control). Una disminución en la unión del ligando a la ErbB3 puede medirse usando técnicas reconocidas en la técnica que miden el nivel de unión del ligando marcado a la ErbB3 (por ejemplo, herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina radiomarcadas) a células que expresan la ErbB3 en presencia o ausencia (control) del anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo

La expresión "inhibición de la proliferación de una célula que expresa la ErbB3", según se usa en este documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo de disminuir estadísticamente significativamente la proliferación de una célula que expresa la ErbB3 con respecto a la proliferación en ausencia del anticuerpo. En una forma de realización, la proliferación de una célula que expresa la ErbB3 (por ejemplo, una célula cancerosa) puede estar disminuida en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90% o el 100% cuando las células se ponen en contacto con el anticuerpo o con una porción de unión al antígeno del mismo de la presente invención, con respecto a la proliferación medida en ausencia del anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo (control). La proliferación celular puede ser ensayada usando técnicas reconocidas en la técnica que miden la tasa de división celular, la fracción de células dentro de una población celular que experimentan división celular y/o la tasa de pérdida de células en una población celular debida a la diferenciación terminal o la muerte celular (por ejemplo, usando un ensayo de cell titer glow o de incorporación de timidina).

La expresión "la capacidad para disminuir los niveles de la ErbB3 en la superficie de las células", según se usa en este documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo de reducir estadísticamente significativamente la cantidad de ErbB3 encontrada en la superficie de una célula que ha sido expuesta al anticuerpo con respecto a una célula no tratada (control). Por ejemplo, una disminución en los niveles de la ErbB3 en la superficie de las células puede ser el resultado de un aumento en la internalización de la ErbB3 (o un aumento en la endocitosis de la ErbB3). En una forma de realización, el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo disminuye la expresión en la superficie celular de la ErbB3 en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al

menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90% o el 100% y/o aumenta la internalización del receptor de la ErbB3 en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90% o el 100% con respecto a la expresión en la superficie celular o a la internalización en ausencia del anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo (control). Los niveles de la ErbB3 en la superficie de las células y/o la internalización del receptor de la ErbB3 en ausencia y en presencia de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo puede medirse fácilmente usando técnicas reconocidas en la técnica, tales como las descritas en Horst y *col.*, *supra* y en los ejemplos de este documento.

La expresión "inhibición de la secreción de VEGF en células que expresan ErbB3", según se usa en este documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo de reducir estadísticamente significativamente la secreción de VEGF de una célula que expresa la ErbB3 con respecto a la secreción de VEGF en ausencia del anticuerpo. En una forma de realización, la secreción de VEGF de una célula que expresa la ErbB3 (por ejemplo, una célula cancerosa) puede estar disminuida en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90% o el 100% cuando las células se ponen en contacto con el anticuerpo o con una porción de unión al antígeno del mismo de la presente invención, con respecto a la secreción de VEGF medida en ausencia del anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo (control). La secreción de VEGF puede ensayarse usando técnicas reconocidas en la técnica, tales como las descritas en este documento.

La expresión "inhibición de la migración de células que expresan la ErbB3", según se usa en este documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo de reducir estadísticamente significativamente la migración de una célula que expresa la ErbB3 con respecto a la migración de la célula en ausencia del anticuerpo. En una forma de realización, la migración de una célula que expresa la ErbB3 (por ejemplo, una célula cancerosa) puede estar disminuida en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90% o el 100% cuando las células se ponen en contacto con el anticuerpo o con una porción de unión al antígeno del mismo de la presente invención, con respecto a la migración medida en ausencia del anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo (control). La migración celular puede ensayarse usando técnicas reconocidas en la técnica, tales como las descritas en este documento.

La expresión "inhibición del crecimiento esferoidal de células que expresan la ErbB3", según se usa en este documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo de reducir estadísticamente significativamente la migración de una célula que expresa la ErbB3 con respecto a la migración de la célula en ausencia del anticuerpo. En una forma de realización, la migración de una célula que expresa la ErbB3 (por ejemplo, una célula cancerosa) puede estar disminuida en al menos el 10%, o en al menos el 20%, o en al menos el 30%, o en al menos el 40%, o en al menos el 50%, o en al menos el 60%, o en al menos el 70%, o en al menos el 80%, o en al menos el 90% o el 100% cuando las células se ponen en contacto con el anticuerpo o con una porción de unión al antígeno del mismo de la presente invención, con respecto a la migración medida en ausencia del anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo (control). La migración celular puede ensayarse usando técnicas reconocidas en la técnica, tales como las descritas en este documento. El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina," según se usa de forma intercambiable en este documento, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, "porción de unión al antígeno") o cadenas individuales de los mismos. Un "anticuerpo" comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por puentes de disulfuro. Cada cadena pesada está formada por una región variable de la cadena pesada (abreviada en este documento como V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está formada por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está formada por una región variable de la cadena ligera (abreviado en este documento como V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está formada por un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L puede subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas entre las regiones que están más conservadas, denominada regiones en marco (FR). Cada V_H y V_L está formada por tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el amino terminal hacia el carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o los factores del hospedador, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema componente clásico. Algunos ejemplos de anticuerpos de la invención incluyen los anticuerpos #1, 3 y 14, y las porciones de unión al antígeno de los mismos.

El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), según se usa en este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, a la ErbB3). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo completo. Algunos ejemplos de fragmentos de unión englobados en el término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, a un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento

bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y $CH1$; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (v) un dAb que incluye los dominios V_H y V_L ; (vi) un fragmento dAb (Ward y col. (1989) Nature 341, 544 - 546), que consiste en un dominio V_H ; (vii) un dAb que consiste en un dominio V_H o V_L ; y (viii) una región determinante de complementariedad aislada (CDR) o (ix) una combinación de dos o más CDRs aisladas que opcionalmente pueden estar unidas mediante un conector sintético. Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes individuales, pueden unirse usando procedimientos recombinantes, mediante un conector sintético que les permite ser creados como una única cadena proteica en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena individual (scFv); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242, 423 - 426; y Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85, 5879 - 5883). También se pretende que dichos anticuerpos de cadena individual están englobados en el término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos son cribados para comprobar su utilidad de la misma forma que lo son los anticuerpos intactos. Las porciones de unión al antígeno pueden ser producidas mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante la escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

El término "anticuerpo monoclonal", según se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra un único sitio antigénico. Adicionalmente, al contrario que las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen típicamente anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante del antígeno. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando cualquier técnica reconocida la técnica y aquellas descritos en este documento, tales como, por ejemplo, un procedimiento con hibridoma, según describen Kohler y col. (1975) Nature, 256: 495, con un animal transgénico, según se describe, por ejemplo, en (véase, por ejemplo, Lonberg, y col. (1994) Nature 368 (6474): 856 - 859), procedimientos con ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.816.567), o usando genotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson y col., Nature, 352: 624 - 628 (1991) y en Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581 - 597 (1991). Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados, y pueden aparecer de forma natural o producirse recombinantemente.

El término "anticuerpo recombinante" se refiere a anticuerpos que son preparados, expresados, creados o aislados mediante medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcrómico para genes de inmunoglobulina (por ejemplo, genes de inmunoglobulina humana) o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados a partir de una célula hospedadora transformada para que exprese el anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una genoteca combinatoria de anticuerpos recombinantes (por ejemplo, que contienen secuencias de anticuerpos humanos) usando expresión de fagos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina (por ejemplo, genes de inmunoglobulina humana) en otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos recombinantes pueden tener regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de líneas germinales humanas. En ciertas formas de realización, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a una mutagénesis *in vitro* y por lo tanto, las secuencias recombinantes de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan y están relacionadas con las secuencias de V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural en el repertorio de una línea germinal humana de anticuerpos *in vivo*.

El término "inmunoglobulina quimérica" o anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina o a un anticuerpo cuyas regiones variables derivan de una primera especie y cuyas regiones constantes derivan de una segunda especie. Las inmunoglobulinas o los anticuerpos quiméricos pueden construirse, por ejemplo, mediante ingeniería genética, a partir de segmentos de genes de inmunoglobulinas pertenecientes a especies diferentes.

El término "anticuerpo humano", según se usa en este documento, pretende incluir anticuerpos con regiones variables en las que tanto las regiones en marco como la CDR derivan de secuencias de inmunoglobulinas de líneas germinales humanas según describen, por ejemplo, Kabat y col. (véase Kabat, y col. (1991) Sequences of proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242). Adicionalmente, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de secuencias de inmunoglobulinas de líneas germinales humanas. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de líneas germinales humanas (por ejemplo, mutaciones producidas mediante mutagénesis aleatoria o específica *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", según se usa en este documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de las CDR que derivan de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, ha sido injertadas en secuencias en marco humanas.

El anticuerpo humano puede tener al menos uno o más aminoácidos sustituidos por un residuo de aminoácido, por ejemplo, un residuo de aminoácido que mejore la actividad que no esté codificado por la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Típicamente, el anticuerpo humano puede tener hasta veinte posiciones sustituidas con residuos de aminoácidos que no son parte de la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una forma de realización en particular, estas sustituciones están dentro de las regiones CDR según se describe con detalle a continuación.

El término "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina o a un anticuerpo que incluye al menos una cadena de una inmunoglobulina o de un anticuerpo humanizado (es decir, al menos una cadena pesada o ligera humanizada). El término "cadena de inmunoglobulina humanizada" o "cadena de anticuerpo humanizado" (es decir, una "cadena ligera de una inmunoglobulina humanizada" o una "cadena pesada de una inmunoglobulina humanizada") se refiere a una cadena de una inmunoglobulina o de un anticuerpo (es decir, una cadena ligera o pesada, respectivamente) con una región variable que incluye una región en marco variable sustancialmente procedente de una inmunoglobulina o de un anticuerpo humano, y regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) (por ejemplo, al menos una CDR, preferiblemente dos CDRs, más preferiblemente tres CDRs) sustancialmente procedentes de una inmunoglobulina o de un anticuerpo no humano, y adicionalmente incluye regiones constantes (por ejemplo, al menos una región constante o una porción de la misma, en el caso de una cadena ligera, y preferiblemente tres regiones constantes el caso de una cadena pesada). El término "región variable humanizada" (por ejemplo, "región variable humanizada de la cadena ligera" o "región variable humanizada de la cadena pesada") se refiere a una región variable que incluye una región en marco variable sustancialmente procedente de una inmunoglobulina o un anticuerpo humano y regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) sustancialmente procedentes de una inmunoglobulina o de un anticuerpo no humano.

Un "anticuerpo biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial con dos pares diferentes de cadena pesada/ligera y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante varios procedimientos que incluyen la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, (1990) Clin. Exp. Immunol. 79, 315 - 321; Kostelny y col. (1992) J. Immunol. 148, 1547 - 1553. En una forma de realización en particular, un anticuerpo biespecífico según la presente invención incluye sitios de unión para la ErbB3 y para el IGF1-R (es decir, el receptor del factor de crecimiento insulinoide de tipo 1). En otra forma de realización, un anticuerpo biespecífico según la presente invención incluye sitios de unión para la ErbB3 y para la C-MET. En otras formas de realización, un anticuerpo biespecífico incluye un sitio de unión para la ErbB3 y un sitio de unión para ErbB2, ERbB3, ErbB4, EGFR, Lewis Y, MUC-1, EpCAM, CA125, antígeno de membrana específico prostático, PDGFR- α , PDGFR- β , C-KIT o cualquiera de los receptores del FGF.

Según se usa en este documento, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con el organismo o el vegetal transgénico no humano que produce dicho anticuerpo.

Un "anticuerpo aislado", según se usa en este documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos con unas especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a la ErbB3 está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a otros antígenos distintos a la ErbB3). Además, un anticuerpo aislado está típicamente sustancialmente exento de otros materiales celulares y/o sustancias químicas. En una forma de realización de la invención una combinación de monoclonal anticuerpos "aislados" con diferentes especificidades de unión a la ErbB3 se combinan en una composición bien definida.

Según se usa en este documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que es codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada. En una forma de realización, un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo es de un isotipo elegido de entre un isotipo de un anticuerpo de una IgG1, de una IgG2, de una IgG3, de una IgG4, de una IgM, de una IgA1 de una IgA2, de una IgAsec, de una IgD o de una IgE. En algunas formas de realización, un anticuerpo monoclonal de la invención es del isotipo IgG1. En otras formas de realización, un anticuerpo monoclonal de la invención es del isotipo IgG2.

Según se usa en este documento, "intercambio de isotipos" se refiere al fenómeno por el cual la clase, o el isotipo, de un anticuerpo, cambia desde una clase de Ig a una de las otras clases de Ig.

Según se usa en este documento, "isotipo no intercambiado" se refiere a la clase isotípica de cadena pesada que se produce cuando no ha tenido lugar ningún intercambio de isotipo; el gen CH que codifica para el isotipo no intercambiado es típicamente el primer gen CH inmediatamente secuencia abajo del gen VDJ reordenado funcionalmente. El intercambio de isotipos se ha clasificado como intercambio de isotipo clásico o no clásico. El intercambio de isotipo clásico se produce mediante episodios de recombinación que implican al menos un intercambio en regiones de secuencias en un gen que codifica para un anticuerpo. El intercambio de isotipo no clásico puede producirse, por ejemplo, mediante recombinación homóloga entre σ_{μ} humana y Σ_{μ} humana (deleción asociada a δ). Pueden producirse otros mecanismos de intercambio no clásico alternativos, tales como recombinación intertransgénica y/o intercromosómica, entre otros, y efectuar el intercambio de isotipo.

Según se usa en este documento, el término "secuencia de cambio" se refiere a aquellas secuencias de ADN responsables de la recombinación de cambio. Una secuencia "donante de cambio", típicamente junto con una región de cambio μ , estará en 5' (es decir, secuencia arriba) de la región del constructo que se va a eliminar durante la recombinación de cambio. La región "aceptora de cambio" estará entre la región del constructo que se va a eliminar y la región constante de sustitución (por ejemplo, γ , ϵ , etc.). Como no hay que un sitio específico donde se produzca siempre la recombinación, la secuencia génica final típicamente no será predecible a partir del constructo.

Un "antígeno" es una entidad (por ejemplo, una entidad proteica o un péptido) a la que se une un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo. En varias formas de realización de la presente invención, un antígeno es una molécula de ErbB3 o una molécula de tipo ErbB3. En una forma de realización en particular según la invención, un antígeno es una ErbB3 humana.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere al sitio de un antígeno al que se une específicamente una inmunoglobulina o un anticuerpo. Los epítipos pueden estar formados a partir tanto de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente son conservados tras la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por el plegamiento terciario típicamente se pierden tras el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye típicamente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 aminoácidos en una única conformación espacial. Los procedimientos para determinar la conformación espacial de los epítipos incluyen técnicas de la técnica y aquellas descritas en este documento, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

La presente invención también engloba anticuerpos que se unen al mismo epítipo, o a uno solapante, que los anticuerpos de la presente invención, es decir, anticuerpos que compiten por la unión a la ErbB3, o que se unen a epítipos que se superponen con epítipos unidos por los anticuerpos descritos en este documento, es decir, un epítipo ubicado en el dominio I de la ErbB3. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden ser identificados mediante el uso de técnicas rutinarias tales como un inmunoensayo, por ejemplo, demostrando la capacidad de un anticuerpo de bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno objetivo, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que en la inmunoglobulina de prueba inhibe específicamente la unión de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como la ErbB3. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: ensayo directo en fase sólida o radioinmunoensayo indirecto (RIA), ensayo directo en fase sólida o inmunoensayo enzimático indirecto (EIA), ensayo de competición en sándwich (véase Stahli y col., (1983) *Methods in Enzymology* 9: 242); ensayo directo de EIA en fase sólida con biotina-avidina (véase Kirkland y col., (1986) *J. Immunol.* 137: 3614); ensayo directo fase sólida marcado, ensayo directo en fase sólida en sándwich marcado (véase Harlow y Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA directo en fase sólida marcando usando un marcaje de I^{125} (véase Morel y col., (1988) *Mol. Immunol.* 25 (1): 7); EIA directo en fase sólida con biotina-avidina (Cheung y col., (1990) *Virology* 176: 546); y RIA directo marcado (Moldenhauer y col., (1990) *Scand. J. Immunol.* 32: 77). Típicamente, dichos ensayo implica el uso del antígeno purificado (por ejemplo, ErbB3) unido a la superficie de un sólido o de células portadoras de cualquiera de ellos, una inmunoglobulina de ensayo sin marcar y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide mediante la determinación de la cantidad de marcador unida a la superficie sólida o a las células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Habitualmente la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Habitualmente, cuando hay presente un exceso de un anticuerpo competidor, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos el 50 - 55%, el 55 - 60%, el 60 - 65%, el 65 - 70% el 70 - 75% o más.

Según se usa en este documento, los términos "unión específica", "se une específicamente" y "se une selectivamente" significan que un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo, muestra una afinidad apreciable por un antígeno o un epítipo en particular, y generalmente, no muestra una reactividad cruzada significativa con otros antígenos y epítipos. Unión "apreciable" o preferida incluye la unión con una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M^{-1} o 10^{10} M^{-1} . Son más preferidas las afinidades mayores de 10^7 M^{-1} , preferiblemente mayores de 10^8 M^{-1} . Los valores intermedios de los establecidos en este documento también pretenden estar en el ámbito de la presente invención y una afinidad de unión preferida puede indicarse como un intervalo de afinidades, por ejemplo, de 10^6 a 10^{10} M^{-1} , preferiblemente de 10^7 a 10^{11} M^{-1} , más preferiblemente de 10^8 a 10^{10} M^{-1} . Un anticuerpo que "no muestra una reactividad cruzada significativa" es aquel que no se unirá apreciablemente a una entidad indeseable (por ejemplo, una entidad proteica indeseable). Por ejemplo, en una forma de realización, un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la ErbB3 se unirá apreciablemente a esa molécula de ErbB3 pero no reaccionará significativamente con otras moléculas de ErbB ni con otras proteínas o péptidos no ErbB. La unión específica selectiva puede determinarse según cualquier medio reconocido en la técnica para la determinación de dicha unión, incluyendo, por ejemplo, mediante un análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva.

El término " K_D ", según se usa en este documento, pretende referirse a la constante de disociación en equilibrio de una interacción is anticuerpo-antígeno en particular o a la afinidad de un anticuerpo por un antígeno. En una forma de realización, el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo según la presente invención se une a un

antígeno (por ejemplo, ErbB3) con una afinidad (K_D) de 50 nM o mejor (es decir, o menos) (por ejemplo, de 40 nM o de 30 nM o de 20 nM o de 10 nM o menos), medida mediante el uso de un ensayo de resonancia de plasmón superficial o un ensayo de unión celular. En una forma de realización en particular, un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo según la presente invención se une a la ErbB3 con una afinidad (K_D) de 8 nM o mejor (por ejemplo, de 7 nM, de 6 nM, de 5 nM, de 4 nM, de 2 nM, de 1,5 nM, de 1,4 nM, de 1,3 nM, de 1 nM o menos), medida mediante el uso de un ensayo de resonancia de plasmón superficial o un ensayo de unión celular. En otras formas de realización, un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo se une a un antígeno (por ejemplo, ErbB3) con una afinidad (K_D) de aproximadamente menos de 10^{-7} M, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, de 10^{-9} M o de 10^{-10} M o incluso menor cuando se determina mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) con un instrumento BIACORE 3000 usando ErbB3 recombinante como analito y el anticuerpo como ligando, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto a la tijera predeterminado o a un antígeno estrechamente relacionado.

15 El término " K_{off} ", según se usa en este documento, pretende referirse a la constante de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

El término "CE50", según se usa en este documento, se refiere a la concentración de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo que induce una respuesta, tanto en un ensayo *in vitro* como *in vivo*, que es el 50% de la respuesta máxima, es decir, a mitad de camino entre la respuesta máxima y la línea basal.

20 Según se usa en este documento, "patrón de glucosilación" se define como el patrón de unidades de carbohidratos que están unidas covalentemente a una proteína, más específicamente a una proteína inmunoglobulina.

25 El término "natural" según se usa en este documento aplicado a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de un polipéptido o de un polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo virus), que puede ser aislada partir de una fuente natural y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio, es natural.

30 El término "reordenado", según se usa en este documento, se refiere a una configuración del locus de una cadena pesada o de una cadena ligera de una inmunoglobulina en la que hay posicionado un segmento V inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente para un dominio completo de V_H o de V_L , respectivamente. El locus de un gen reordenado de una inmunoglobulina puede ser identificado mediante comparación con el ADN de la línea germinal; un locus reordenado tendrá al menos un elemento recombinado de homología heptámero/nonámero.

El término "no reordenado" o "configuración de la línea germinal", según se usa en este documento en referencia a un segmento V, se refiere la configuración en la que el segmento V no está reordenado, por lo que está inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

40 El término "molécula de ácido nucleico", según se usa en este documento, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario.

45 El término "molécula de ácido nucleico aislada", según se usa en este documento en referencia a ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos o porciones de anticuerpos (por ejemplo, V_H , V_L , CDR3) que se unen a la ErbB3, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias de nucleótidos que codifican para el anticuerpo o para una porción de anticuerpo están exentas de otras secuencias de nucleótidos que codifican para anticuerpos que se unan a antígenos distintos a la ErbB3, otras secuencias que pueden flanquear de forma natural el ácido nucleico en el ADN genómico humano.

50 El término "modificar" o "modificación", según se usa en este documento, pretende referirse a la modificación de uno o más aminoácidos en los anticuerpos o en las porciones de unión al antígeno de los mismos. El cambio puede producirse mediante la adición, sustitución o delección de un aminoácido en una o más posiciones. El cambio puede producirse usando técnicas conocidas, tales como mutagénesis mediante PCR. Por ejemplo, en algunas formas de realización, puede modificarse un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo identificado usando los procedimientos de la invención, para modificar así la afinidad de unión del anticuerpo o la función de unión al antígeno del mismo por la ErbB3.

60 La presente invención también incluye "sustituciones conservativas de aminoácidos" en las secuencias de los anticuerpos de la invención, es decir, modificaciones en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos que no anulan la unión del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contiene la secuencia de aminoácidos, al antígeno, es decir, a la ErbB3. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen la sustitución de un aminoácido de una clase por un aminoácido de la misma clase, donde una clase está definida por las propiedades fisicoquímicas comunes de la cadena lateral del aminoácido y por las elevadas frecuencias de sustitución en proteínas homólogas encontradas en la naturaleza, determinadas, por ejemplo, mediante una matriz

65

de intercambio de frecuencias estándar de Dayhoff o matriz BLOSUM. Se han clasificado seis clases generales de cadenas laterales de aminoácidos, e incluyen: Clase I (Cys); Clase II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Clase III (Asn, Asp, Gln, Glu); Clase IV (His, Arg, Lys); Clase V (Ile, Leu, Val, Met); y Clase VI (Phe, Tyr, Trp). Por ejemplo, la sustitución de un Asp por otro residuo de la clase III tal como Asn, Gln o Glu, es una sustitución conservativa. Por lo tanto, preferiblemente se sustituye un residuo de aminoácido predicho no esencial en un anticuerpo anti-ErbB3 por otro residuo de aminoácido de la misma clase. Los procedimientos de identificación de sustituciones conservativas de nucleótidos y de aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell y col., *Biochem.* 32: 1180 - 1187 (1993); Kobayashi y col. *Protein Eng.* 12(10): 879 - 884 (1999); y Burks y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94: 412 - 417 (1997)).

El término "sustitución no conservativa de aminoácidos" se refiere a la sustitución de un aminoácido de una clase por un aminoácido de otra clase; por ejemplo, la sustitución de una Ala, un residuo de clase II residuo, por un residuo de clase III tal como Asp, Asn, Glu o Gln.

Alternativamente, en otra forma de realización, pueden introducirse mutaciones (conservativas o no conservativas) aleatoriamente a lo largo de toda o de parte de la secuencia codificante del anticuerpo anti-ErbB3, tal como mediante una mutagénesis por saturación, y los anticuerpos anti-ErbB3 modificados resultantes pueden ser cribados para comprobar su afinidad de unión.

Una "secuencia consenso" es una secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que aparecen con más frecuencia en una familia de secuencias relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987). En una familia de proteínas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que aparece con más frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos aparecen con la misma frecuencia, cualquiera puede ser incluido en la secuencia consenso. Un "marco consenso" de una inmunoglobulina se refiere a una región en marco en la secuencia consenso de la inmunoglobulina.

De forma análoga, la secuencia consenso de las CDRs puede ser derivada mediante la alineación óptima de las secuencias de aminoácidos de las CDR de los anticuerpos ErbB3 de la presente invención.

Para los ácidos nucleicos, el término "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean y comparan de forma óptima, son idénticos, con las apropiadas inserciones o deleciones de nucleótidos, en al menos aproximadamente el 80% de los nucleótidos, habitualmente al menos aproximadamente del 90% al 95%, y más preferiblemente al menos aproximadamente del 98% al 99,5% de los nucleótidos. Alternativamente, existe una homología sustancial cuando los segmentos hibridan en unas condiciones de hibridación selectivas con la hebra complementaria.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = nº de posiciones idénticas / nº total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesitan ser introducidos para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden realizarse usando un algoritmo matemático, según se describe en los siguientes ejemplos no limitantes.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP del paquete informático GCG, usando un NWSgapdna. Una matriz CMP y un peso del hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4: 11 - 17 (1989)) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de pesos de los residuos PAM120, una penalización por longitud del hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48): 444 - 453 (1970)) que ha sido incorporado en el programa GAP del paquete informático GCG, usando bien una matriz Blossum 62 o bien una matriz PAM250, y un peso del hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Las secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas de la presente invención pueden usarse adicionalmente como "secuencias interrogantes" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para identificar, por ejemplo, secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403 - 10. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de la palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas de las moléculas de ácidos nucleicos de la invención. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación= 50, longitud de la palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas de las moléculas proteicas de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, puede utilizarse Gapped BLAST según se describe en Altschul y col., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 (17): 3389 - 3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se ha hecho sustancialmente puro" cuando se purifica lejos de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, incluyendo un tratamiento o alcalino/SDS, bandeado con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase F. Ausubel, y col., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987).

Las composiciones de ácidos nucleicos de la presente invención, aunque a menudo están en una secuencia natural (excepto para los sitios de restricción modificados y similares), procedente de ADNc, genómico o mezclas de los mismos, pueden mutarse según técnicas convencionales para proporcionar secuencias génicas. Para las secuencias codificantes, estas mutaciones pueden afectar según se desee a la secuencia de aminoácidos. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homologas de, o derivadas de, una V, D, J natural, constante, cambios y otras secuencias descritas en este documento (donde "derivada" indica que una secuencia es idéntica a, o está modificada a partir de, otra secuencia).

El término "unido operativamente" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos ubicada en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder de secreción está unido operativamente al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción de polipéptido; un promotor o un potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está ubicado de forma que facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas, y en el caso de un líder de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se consigue mediante la ligación en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan los adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional. Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está ubicado en relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor o un potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. Con respecto a la transcripción de secuencias reguladoras, unido operativamente significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas, y, donde sea necesario unir las dos regiones codificantes de proteínas, contiguas y en marco de lectura. Para las secuencias de intercambio, unidas operativamente indica que las secuencias son capaces de efectuar la recombinación por intercambio.

El término "vector", según se usa en este documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que ha sido unida. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el que pueden estar ligados segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden estar ligados segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de una replicación autónoma en una célula hospedadora en la que son introducidos (por ejemplo, vectores bacterianos con un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden ser integrados en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora, y por lo tanto son replicados junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en este documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" pueden usarse de forma intercambiable. Sin embargo, la invención pretende incluir esas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que tienen funciones equivalentes.

El término "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), según se usa en este documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debería entenderse que dichos términos pretenden referirse no sólo a la célula en cuestión en particular, sino también a la progenie de dicha célula. Dado que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o a influencias medioambientales, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero todavía está incluida en el ámbito del término "célula hospedadora" según se usa en este documento.

Los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento", según se usan en este documento, se refieren a las medidas terapéuticas o preventivas descritas en este documento. Los procedimientos de "tratamiento" emplean la administración a un sujeto de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno de la presente invención, por ejemplo, a un sujeto con una enfermedad o una alteración asociada con la señalización dependiente de la ErbB3 o predispuesto a padecer dicha enfermedad o alteración, con objeto de prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad de, o mejorar, uno o más síntomas de, la enfermedad o la alteración, o la enfermedad o la alteración recurrente, o con objeto de prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de la esperada en ausencia de dicho tratamiento.

El término "enfermedad asociada con la señalización dependiente de la ErbB3" o "alteración asociada con la señalización dependiente de la ErbB3", según se usa en este documento, incluye estados patológicos y/o síntomas

asociados con un estado patológico, donde se encuentra un aumento en los niveles de la ErbB3 y/o de la activación de las escamas celulares que implican la ErbB3. Se entiende que la ErbB3 heterodimeriza con otras proteínas ErbB tales como EGFR y ErbB2 cuando se encuentran unos niveles elevados de la ErbB3. Consecuentemente, el término "enfermedad asociada con la señalización dependiente de la ErbB3" también incluye estados patológicos y/o

5 síntomas asociados con estados patológicos en los que se encuentran unos niveles elevados de heterodímeros EGFR/ErbB3 y/o de ErbB2/ErbB3. En general, el término "enfermedad asociada con la señalización dependiente de la ErbB3" se refiere a cualquier alteración cuyo inicio, progresión o persistencia de los síntomas requiere la participación de la ErbB3. Algunos ejemplos de alteraciones mediadas por la ErbB3 incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, cáncer.

10 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a, o describen, el estado fisiológico en mamíferos que está caracterizado típicamente por un crecimiento celular desregulado. Algunos ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Algunos ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen carcinoma escamoso, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer gástrico,

15 cáncer de páncreas, tumores de las células gliales tales como glioblastoma y neurofibromatosis, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, melanoma, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de la vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cánceres de cabeza y cuello. En una forma de realización en particular, un cáncer tratado o diagnosticado mediante el uso de los procedimientos de la presente invención se elige de entre melanoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, carcinoma renal, cáncer gastrointestinal/de colon, cáncer de pulmón y cáncer de próstata.

El término "cantidad eficaz", según se usa en este documento, se refiere a la cantidad de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo que se une a la ErbB3, que es suficiente para efectuar el tratamiento, el pronóstico o el diagnóstico de una enfermedad asociada con la señalización dependiente de la ErbB3, según se describe en este documento, cuando se administra a un sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del sujeto y del estado patológico que se va a tratar, del peso y de la edad del sujeto, de la gravedad del estado patológico, de la vía de administración y similares, que puede ser fácilmente determinada por el experto habitual en la técnica. Las dosis de administración pueden variar desde, por ejemplo, aproximadamente 1 ng hasta

25 aproximadamente 10.000 mg, desde aproximadamente 5 ng hasta aproximadamente 9.500 mg, desde aproximadamente 10 ng hasta aproximadamente 9.000 mg, desde aproximadamente 20 ng hasta aproximadamente 8.500 mg, desde aproximadamente 30 ng hasta aproximadamente 7.500 mg, desde aproximadamente 40 ng hasta aproximadamente 7.000 mg, desde aproximadamente 50 ng hasta aproximadamente 6.500 mg, desde aproximadamente 100 ng hasta aproximadamente 6.000 mg, desde aproximadamente 200 ng hasta

30 aproximadamente 5.500 mg, desde aproximadamente 300 ng hasta aproximadamente 5.000 mg, desde aproximadamente 400 ng hasta aproximadamente 4.500 mg, desde aproximadamente 500 ng hasta aproximadamente 4.000 mg, desde aproximadamente 1 μ g hasta aproximadamente 3.500 mg, desde aproximadamente 5 μ g hasta aproximadamente 3.000 mg, desde aproximadamente 10 μ g hasta aproximadamente 2.600 mg, desde aproximadamente 20 μ g hasta aproximadamente 2.575 mg, desde aproximadamente 30 μ g hasta

35 aproximadamente 2.550 mg, desde aproximadamente 40 μ g hasta aproximadamente 2.500 mg, desde aproximadamente 50 μ g hasta aproximadamente 2.475 mg, desde aproximadamente 100 μ g hasta aproximadamente 2.450 mg, desde aproximadamente 200 μ g hasta aproximadamente 2.425 mg, desde aproximadamente 300 μ g hasta aproximadamente 2.000, desde aproximadamente 400 μ g hasta aproximadamente 1.175 mg, desde aproximadamente 500 μ g hasta aproximadamente 1.150 mg, desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 1.125 mg, desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 1.100 mg, desde

40 aproximadamente 1,25 mg hasta aproximadamente 1.075 mg, desde aproximadamente 1,5 mg hasta aproximadamente 1.050 mg, desde aproximadamente 2,0 mg hasta aproximadamente 1.025 mg, desde aproximadamente 2,5 mg hasta aproximadamente 1.000 mg, desde aproximadamente 3,0 mg hasta aproximadamente 975 mg, desde aproximadamente 3,5 mg hasta aproximadamente 950 mg, desde

45 aproximadamente 4,0 mg hasta aproximadamente 925 mg, desde aproximadamente 4,5 mg hasta aproximadamente 900 mg, desde aproximadamente 5 mg hasta aproximadamente 875 mg, desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 850 mg, desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 825 mg, desde aproximadamente 30 mg hasta aproximadamente 800 mg, desde aproximadamente 40 mg hasta aproximadamente 775 mg, desde aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 750 mg, desde aproximadamente 100 mg hasta

50 aproximadamente 725 mg, desde aproximadamente 200 mg hasta aproximadamente 700 mg, desde aproximadamente 300 mg hasta aproximadamente 675 mg, desde aproximadamente 400 mg hasta aproximadamente 650 mg, desde aproximadamente 500 mg, o desde aproximadamente 525 mg hasta aproximadamente 625 mg, de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo, según la invención. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad eficaz es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial (es decir, efectos secundarios) de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo están minimizados y/o sopesados por los efectos

55 beneficiosos.

El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben un tratamiento profiláctico o

60 terapéutico.

Según se usa en este documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. Por ejemplo, los procedimientos y las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar un sujeto con cáncer. En una forma de realización en particular, el sujeto es un ser humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

El término "muestra" se refiere a tejidos, fluidos corporales o a una célula procedente de un paciente o de un sujeto. Normalmente, el tejido o la célula serán extraídos del paciente, pero también se contempla un diagnóstico *in vivo*. En el caso de un tumor sólido puede tomarse una muestra de tejido de un tumor extraído quirúrgicamente y prepararse para su ensayo mediante técnicas convencionales. En el caso de linfomas y leucemias, pueden obtenerse linfocitos, células leucémicas o tejidos linfáticos y prepararse. Otras muestras del paciente, incluyendo orina, lágrimas, suero, líquido cefalorraquídeo, heces, esputo, extractos celulares etc. también pueden ser útiles para algunos tumores en particular.

Los términos "agente anticanceroso" y "agente antineoplásico" se refieren a fármacos usados para tratar neoplasias, tales como crecimientos cancerosos. La terapia farmacológica puede usarse sola o junto con otros tratamientos tales como cirugía o radioterapia. Pueden usarse muchas clases de fármacos en el tratamiento del cáncer, dependiendo de la naturaleza del órgano implicado. Por ejemplo, los cánceres de mama son habitualmente estimulados por los estrógenos, y pueden tratarse con fármacos que inactiven las hormonas sexuales. De forma similar, el cáncer de próstata puede tratarse con fármacos que inactiven los andrógenos, la hormona sexual masculina. Los agentes antineoplásicos de la presente invención incluyen, entre otros, los siguientes agentes:

Agente antineoplásico	Comentarios	Ejemplos
Anticuerpos		
(a) anticuerpos distintos a los anticuerpos anti-ErbB3; y	Anticuerpos que se unen al IGF-1R (receptor del factor de crecimiento insulinoide de tipo 1), que es expresado en la superficie celular de la mayoría de los cánceres humanos	A12 (mAb completamente humanizado) 19D12 (mAb completamente humanizado) CP751-871 (mAb completamente humanizado) H7C10 (mAb humanizado) alfalR3 (ratón) scFV/FC (quimera ratón/humano) EM/164 (ratón)
(b) anticuerpos anti-ErbB3 que se unen a epítomos diferentes		
	Anticuerpos que se unen al EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico); las mutaciones que afectan a la expresión o a la actividad del EGFR podrían dar como resultado cáncer	Matuzumab (EMD72000) Erbbitux® / Cetuximab (Imclone) Vectibix® / Panitumumab (Amgen) mAb 806 Nimotuzumab (TheraCIM)
	Anticuerpos que se unen al cMET (factor de transición mesénquimo-epitelial); un miembro de la familia MET de receptores cinasas de tirosina	AVEO (AV299) (AVEO) AMG102 (Amgen) 5D5 (OA-5D5) (Genentech)
Moléculas pequeñas dirigidas al IGF1R	Anticuerpos anti-ErbB3 que se unen a epítomos diferentes del IGF-1R (receptor del factor de crecimiento insulinoide de tipo 1), que es expresado en la superficie celular de la mayoría de los cánceres humanos	Ab # 14 (MM 121-14), descrito en este documento Herceptin® (Trastuzumab; Genentech) 1B4C3; 2D1D12 (U3 Pharma AG) NVP-AEW541-A BMS-536.924 (1H-bencimidazol-2-il)-1H-piridin-2-ona) BMS-554.417 Cicloligan TAE226 PQ401

Agente antineoplásico

Moléculas pequeñas dirigidas al EGFR

Comentarios

EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico); las mutaciones que afectan a la expresión o a la actividad del EGFR podrían dar como resultado cáncer

Ejemplos

Iressa® / Gefitinib (AstraZeneca)
 CI-1033 (PD 183805) (Pfizer)
 Lapatinib (GW-572016) (GlaxoSmithKline)
 Tykerb® / Lapatinib Ditosilato (SmithKline Beecham)
 Tarceva®/ Erlotinib HCL (OSI-774) (OSI Pharma)
 PKI-166 (Novartis)
 PD-158780 EKB-569
 Tyrphostin AG 1478 (4-(3-cloroanillino)-6,7-dimetoxiquinazolina)

Moléculas pequeñas dirigidas al cMET

cMET (o factor de transición mesénquimo-epitelial); un miembro de la familia MET de receptores cinasas de tirosina)

PHA665752
 ARQ 197

Antimetabolitos

Un antimetabolito es una sustancia química con una estructura similar a una sustancia (un metabolito) requerida para las reacciones bioquímicas normales, pero lo suficientemente diferente como para interferir en las funciones normales de las células, incluyendo la división celular

Flourouracilo (5-FU)
 Capecitabina / XELODA® (HLR Roche)
 5-Trifluorometil-2'-deoxiuridina
 Metotrexato sódico (Trexall) (Barr)
 Raltitrexed / Tomudex® (AstraZeneca)
 Pemetrexed / Alimta® (Lilly)
 Tegafur
 Arabinósido de citosina (Cytarabine, Ara-C) / Tioguanine® (GlaxoSmithKline)
 5-azacitidina
 6-mercaptopurina (Mercaptopurina, 6-MP)
 Azatioprina / Azasan® (AAIPHARMA LLC)
 6-tioguanina (6-TG) / Purinethol® (TEVA)
 Pentostatin / Nipent® (Hospira Inc.)
 Fosfato de fludarabina / Fludara® (Bayer Health Care)
 Cladribina (2-CdA, 2-clordesoxiadenosina) / Leustatin® (Ortho Biotech)

Agente antineoplásico
Agentes alquilantes

Comentarios

Un agente antineoplásico alquilante es un agente alquilante que une un grupo alquilo al ADN. Dado que las células cancerosas generalmente proliferan sin restricción más que las células sanas, son más sensibles a las lesiones en el ADN, y los agentes alquilantes se usan clínicamente para tratar diversos tumores

Ejemplos

Inhibidor de la Reductasa de Ribonucleótidos (RNR)
Ciclofosfamida / Cytosan (BMS)
Neosar (TEVA)
Ifosfamida /Mitoxana® (ASTA Medica)
Tiotepa (Bedford, Abraxis, Teva)
BCNU→ 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea
CCNU→ 1,-(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrosourea (metil CCNU)
Hexametilmelamina (Altretamina, HMM) / Hexalen® (MGI Pharma Inc.)
Busulfan / Myleran (GlaxoSmithKline) Procarbazina HCL / Procarbazina HCL / Matulane (Sigma Tau Pharmaceuticals, Inc.)
Dacarbazina (DTIC)
Clorambucilo / Leukaran® (SmithKline Beecham)
Melfalano / Alkeran® (GlaxoSmithKline) Cisplatino (Cisplatino, CDDP) / Platinol (Bristol Myers)
Carboplatino / Paraplatino (BMS)
Oxaliplatino / Eloxitan® (Sanofi-Aventis US)

Inhibidores de la topoisomerasa

Los inhibidores de la topoisomerasa son agentes quimioterapéuticos diseñados para interferir en la acción de las enzimas topoisomerasas (topoisomerasa I y II), que son enzimas que controlan los cambios en la estructura del ADN catalizando la ruptura y la unión de nuevo del esqueleto de fosfodiéster de las hebras de ADN durante el ciclo celular normal.

Doxorrubicina HCL / Doxil® (Alza)
Citrato de daunorrubicina / Daunoxome® (Gilead)
Mitoxantrona HCL/Novantrona (EMD Serono)
Actinomomicina D
Etopósido / Vepesid® (BMS)/ Etopophos® (Hospira, Bedford, Teva Parenteral, Etc.)
Topotecan HCL / Hycamtin® (GlaxoSmithKline)
Tenipósido (VM-26) / Vumon® (BMS)
Irinotecan HCL(CPT-11) / Camptosar® (Pharmacia & Upjohn)

ES 2 431 940 T3

Agente antineoplásico

Agentes dirigidos a los microtúbulos

Comentarios

Los microtúbulos son uno de los componentes del citoesqueleto. Tienen un diámetro de ~24 nm y la longitud varía desde varios micrómetros hasta posiblemente mm en los axones de las neuronas nerviosas. Los microtúbulos sirven como componentes estructurales dentro de la célula y están implicados en muchos procesos celulares incluyendo la mitosis, la citocinesis y el transporte vesicular.

Ejemplos

Vincristina / Oncovin® (Lilly)
Sulfato de vinblastina /Velban® (suspendido) (Lilly)
Tartrato de vinorelbina / Navelbine® (PierreFabre)
Sulfato de vindesina / Eldisine® (Lilly)
Paclitaxel / Taxol® (BMS)
Docetaxel / Taxotere® (Sanofi Aventis US)
Paclitaxel nanoparticulado (ABI-007) /
Abraxane® (Abraxis BioScience, Inc.)

Inhibidores de cinasas

Las cinasas de tirosina son enzimas internas de la célula que funcionan uniendo grupos fosfato al aminoácido tirosina. Bloqueando la capacidad de funcionamiento de las cinasas de tirosina, estos compuestos proporcionan una herramienta para controlar el crecimiento celular canceroso.

Ixabepilona / IXEMPRA™ (BMS)
Mesilato de imatinib / Gleevec (Novartis)
Malato de sunitinib / Sutent® (Pfizer)
Tosilato de sorafenib / Nexavar® (Bayer)
Clorhidrato de Nilotinib monohidratado / Tassigna® (Novartis)

Inhibidores de la síntesis de proteínas

Inducen la apoptosis celular

L-asparaginasa / Elspar® (Merck & Co.)

Agentes inmunoterapéuticos

Permiten que los pacientes con cáncer muestren una respuesta inmunitaria

Interferón alfa
Inhibidor de la angiogénesis / Avastin® (Genentech)
IL-2→ Interleucina 2 (Aldesleukin) /
Proleukin® (Chiron)
IL-12→ Interleucina 12

Agente antineoplásico	Comentarios	Ejemplos
Hormonas	Las terapias hormonales asociadas con la menopausia y el envejecimiento buscan incrementar la cantidad de ciertas hormonas en el cuerpo para compensar la terapia hormonal relacionada con la edad o con una enfermedad, ya que el tratamiento del cáncer reduce el nivel de algunas hormonas específicas o altera la capacidad del cáncer de usar estas hormonas para crecer y diseminarse	Citrato de toremifeno / Fareston® (GTX, Inc.) Fulvestrant / Faslodex® (AstraZeneca) Raloxifeno HCL / Evista® (Lilly) Anastrozol / Arimidex® (AstraZeneca) Letrozol / Femara® (Novartis) Fadrozol (CGS16949A) Exemestano / Aromasin® (Pharmacia & Upjohn) Acetato de leuprolida / Eligard® (QTL EE.UU.) Lupron® (TAP Pharm.) Acetato de goserrelina / Zoladex® (AstraZeneca) Pamoato de triptorelina / Trelstar® (Watson Labs) Buserelin / Suprefact® (Sanofi Aventis) Nafarrelina Cetrorelix / Cetrotide® (EMD Serono) Bicalutamida / Casodex® (AstraZeneca) Nilutamida / Nilandron® (Aventis Pharm.) Acetato de megestrol / Megace® (BMS) Análogos de somatostatina (acetato de octreotida / Sandostatin® (Novartis))
Glucocorticoides	Fármacos antiinflamatorios usados para reducir la tumefacción que provoca el dolor canceroso.	Prednisolona Dexametasona / Decadron® (Wyeth)
Inhibidores de la aromatasa Inhibidores de la mTOR	Incluye imidazoles La vía de señalización de la mTOR fue descubierta originalmente durante los estudios del agente inmunosupresor rapamicina. Esta vía altamente conservada regula la proliferación celular y el metabolismo en respuesta a factores medioambientales, la señalización tras la unión al receptor del factor de crecimiento celular a través de la fosfoinosítido-3-cinasa (PI-3K) para el crecimiento y la proliferación celulares, y la angiogénesis.	Ketoconazol Sirolimus (Rapamycin) / Rapamune® (Wyeth) Temsilolimus (CCI-779) / Torisel® (Wyeth) Deforolimus (AP23573) (Ariad Pharm.) Everolimus (RAD001) / Certican® (Novartis)
Agentes quimioterapéuticos		Adriamicina, 5-Fluorouracilo, Citoxina, Bleomicina, Mitomicina C, Daunomicina, Carminomicina, Aminopterina, Dactinomicina, Mitomicinas, Esperamicinas

Pueden administrarse uno o más agentes antineoplásicos, bien simultáneamente o bien antes o después de la administración de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo de la presente invención.

5 En las siguientes subsecciones se describen con más detalle varios aspectos de la invención.

II. Procedimientos para producir los anticuerpos de la invención

(i) Anticuerpos monoclonales

5 Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden producirse mediante el uso de varias técnicas conocidas, tales como la técnica de hibridación celular somática estándar descrita por Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495, la transformación vírica u oncogénica de linfocitos B o técnicas de expresión de fagos usando genotecas de genes de anticuerpos humanos. En algunas formas de realización en particular, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales completamente humanos.

10 Consecuentemente, en una forma de realización, se usa un procedimiento con hibridoma para producir un anticuerpo que se une a la ErbB3. En este procedimiento, puede inmunizarse un ratón u otro animal hospedador apropiado con un antígeno adecuado con objeto de estimular los linfocitos para que produzcan, o sean capaces de producir, anticuerpos que se unirán específicamente al antígeno usado para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Después los linfocitos pueden fusionarse a células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59 - 103 (Academic Press, 1986)). El medio de cultivo en el que están creciendo las células del hibridoma se ensaya para comprobar la producción de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Una vez identificadas las células de hibridoma que producen los anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden ser subclonados mediante procedimientos de dilución limitante y crecidos mediante procedimientos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59 - 103 (Academic Press, 1986)). Algunos medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como tumores de ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden ser separados del medio de cultivo, del fluido de ascitis o del suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

25 En otra forma de realización, los anticuerpos y las porciones de anticuerpo que se unen a la ErbB3 pueden ser aislados a partir de genotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas, por ejemplo, en McCafferty y col., Nature, 348: 552 - 554 (1990). Clackson y col., Nature, 352: 624 - 628 (1991), Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581 - 597 (1991) y Hoet y col (2005) Nature Biotechnology 23, 344 - 348; en las patentes de EE.UU. N^{os} 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 a favor de Ladner y col.; en las patentes de EE.UU. N^{os} 5.427.908 y 5.580.717 a favor de Dower y col.; en las patentes de EE.UU. N^{os} 5.969.108 y 6.172.197 a favor de McCafferty y col.; y en las patentes de EE.UU. N^{os} 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 a favor de Griffiths y col. Adicionalmente pueden usarse para la producción de anticuerpos humanos de elevada afinidad (intervalo nM) las transposiciones de cadena (Marks y col., Bio/Technology, 10: 779 - 783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como una estrategia para la construcción de genotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., Nuc. Acids. Res., 21: 2265 - 2266 (1993)).

40 En una forma de realización en particular, el anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo que se une a la ErbB3 se produce mediante el uso de la técnica de expresión de fagos descrita por Hoet y col., *supra*. Esta técnica implica la generación de una genoteca de Fab humanos con una única combinación de secuencias de inmunoglobulinas aisladas a partir de donantes humanos y que genera una diversidad sintética en las CDRs de la cadena pesada. Después, la genoteca se criba para comprobar los Fabs que se unen a la ErbB3.

50 En otra forma de realización más, pueden generarse anticuerpos monoclonales dirigidos contra la ErbB3 mediante el uso de ratones transgénicos o transcromosómicos portadores de partes de un sistema inmunitario humano en lugar del sistema inmunitario del ratón (véase, por ejemplo, Lonberg, y col. (1994) Nature 368 (6474): 856 - 859; Lonberg, N. y col. (1994), *supra*; revisado en Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49 - 101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65 - 93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764: 536 - 546. Véanse adicionalmente, las patentes de EE.UU. N^{os} 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas a favor de Lonberg y Kay; y la patente de EE.UU. N^o 5.545.807 a favor de Surani y col.; Las publicaciones PCT N^{os} WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas a favor de Lonberg y Kay; y la publicación PCT N^o WO 01/14424 a favor de Korman y col.).

60 En otra forma de realización, los anticuerpos humanos de la invención pueden crearse usando un ratón que porte secuencias de inmunoglobulinas humanas en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porta un transgen de una cadena pesada humana y un transcromosoma de una cadena ligera humana (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 02/43478 a favor de Ishida y col.).

65 Aún además, en la técnica hay disponibles sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulinas humanas y que pueden usarse para generar anticuerpos anti-ErbB3 de la invención. Por ejemplo, puede usarse un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.); dichos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N^{os} 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 a

favor de Kucherlapati y col.

Además, en la técnica hay disponibles sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulinas humanas, y que pueden usarse para crear anticuerpos anti-ErbB3 de la invención. Por ejemplo, pueden usarse ratones portadores tanto de un transcromosoma de una cadena pesada humana como un transcromosoma de una cadena ligera humana; según describen Tomizuka y col. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97: 722 - 727. Adicionalmente, en la técnica se han descrito vacas portadoras de transcromosomas con la cadena pesada y ligera (Kuroiwa y col. (2002) Nature Biotechnology 20: 889 - 894) y pueden usarse para generar los anticuerpos anti-ErbB3 de la invención.

En otra forma de realización más, los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse usando un vegetal transgénico y/o células vegetales cultivadas (tales como, por ejemplo, tabaco, maíz y lentejas de agua) que producen dichos anticuerpos. Por ejemplo, pueden usarse las hojas de tabaco transgénico que expresan los anticuerpos o las porciones de unión al antígeno de los mismos para producir dichos anticuerpos, por ejemplo, mediante el uso de un promotor inducible (véase, por ejemplo, Cramer y col., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 240: 95 118 (1999)). También puede usarse maíz transgénico para expresar dichos anticuerpos y porciones de unión al antígeno de los mismos (véase, por ejemplo, Hood y col., Adv. Exp. Med Biol. 464: 127 147 (1999)). Los anticuerpos también pueden ser producidos en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas que incluyen porciones del anticuerpo, tales como anticuerpos de cadena individual (scFv's), por ejemplo, mediante el uso de semillas de tabaco y tubérculos de patata (véase, por ejemplo, Conrad y col., Plant Mol. Biol. 38: 101 109 (1998)). Los procedimientos para la producción de anticuerpos o de porciones de unión al antígeno en plantas también pueden encontrarse, por ejemplo, en Fischer y col., Biotechnol. Appl. Biochem. 30: 99 108 (1999), Ma y col., Trends Biotechnol. 13: 522 7 (1995); Ma y col., Plant Physiol. 109: 341 6 (1995); Whitelam y col., Biochem. Soc. Trans. 22: 940 944 (1994) y en las patentes de EE.UU. N^{os} 6.040.498 y 6.815.184.

La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales o de las porciones de los mismos que se unen a la ErbB3 preparados mediante el uso de cualquier técnica, incluyendo las desveladas en este documento, puede ser determinada mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de enzimoimmunoabsorción (ELISA). La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal o de una porción del mismo también puede ser determinada mediante el análisis de Scatchard de Munson y col., Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

En ciertas formas de realización, un anticuerpo ErbB3 o una porción del mismo producido mediante el uso de cualquiera de los procedimientos analizados anteriormente, puede ser adicionalmente alterado u optimizado para conseguir una especificidad y/o una afinidad de unión deseadas usando técnicas reconocidas en la técnica, tales como las descritas en este documento.

En una forma de realización, pueden usarse secuencias parciales de anticuerpo derivadas de un antígeno ErbB3 para producir anticuerpos relacionados estructural y funcionalmente. Por ejemplo, los anticuerpos que interactúan con los antígenos objetivo predominantemente a través de los residuos de aminoácidos que están ubicados en las seis regiones determinantes de complementariedad (CRs) de la cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos de las CDRs son más diversas entre los anticuerpos individuales que en las secuencias externas de las CDRs. Debido a que las secuencias de las CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que simulen las propiedades de anticuerpos específicos naturales mediante la construcción de vectores de expresión que incluyan las secuencias de las CDR a partir de anticuerpos naturales específicos injertadas en las secuencias en marco procedentes de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L. y col., 1998, Nature 332: 323 - 327; Jones, P. y col., 1986, Nature 321: 522 - 525; y Queen, C. y col., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 10029 - 10033). Dichas secuencias en marco pueden obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas que incluyen las secuencias genéticas del anticuerpo de la línea germinal.

Por lo tanto, pueden usarse una o más características estructurales de un anticuerpo anti-ErbB3 de la invención, tales como las CDRs, para crear anticuerpos anti-ErbB3 estructuralmente relacionados que conserven al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, por ejemplo, inhibir la fosforilación mediada por ligando de tipo EGF de la ErbB3; inhibir una o más de la señalización mediada por herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina hasta la ErbB3; inhibir la proliferación o las células que expresan la ErbB3; y/o disminuir los niveles de la ErbB3 en las superficies celulares.

En una forma de realización en particular, se combinan recombinantemente una o más regiones CDR elegidas de entre las ID SEC N^{os} 7 - 12, las ID SEC N^{os}: 13 - 18, las ID SEC N^{os}: 19 - 24, las ID SEC N^{os}: 39 - 44, y las ID SEC N^{os}: 45 - 50 con regiones en marco y CDRs humanas conocidas para crear mediante ingeniería genética anticuerpos adicionales anti-ErbB3 de la invención. Las regiones en marco variables de la cadena pesada y ligera pueden derivar de la misma o de diferentes secuencias de anticuerpos.

Es bien conocido en la técnica que los dominios de las CDR3 en las cadenas pesada y ligera del anticuerpo juegan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno (véase,

Hall y col., J. Immunol., 149: 1605 - 1612 (1992); Polymenis y col., J. Immunol., 152: 5318 - 5329 (1994); Jahn y col., Immunobiol., 193: 400 - 419 (1995); Klimka y col., Brit. J. Cancer, 83: 252 - 260 (2000); Beiboer y col., J. Mol. Biol., 296: 833 - 849 (2000); Rader y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 95: 8910 - 8915 (1998); Barbas y col., J. Am. Chem. Soc., 116: 2161 - 2162 (1994); Ditzel y col., J. Immunol., 157: 739 - 749 (1996)). Consecuentemente, en ciertas formas de realización, se generan anticuerpos que incluyen las CDR3s de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos en particular descritos en este documento (por ejemplo, las ID SEC N^{os}: 9, 15, 21, 41, 47 y/o las ID SEC N^{os}: 12, 18, 24, 44, 50). Los anticuerpos pueden incluir adicionalmente las CDR1 y/o las CDR2s de las cadenas pesada y/o ligera de los anticuerpos de la presente invención (por ejemplo, las ID SEC N^{os}: 7 - 8 y/o las ID SEC N^{os}: 10 - 11; las ID SEC N^{os}: 13 - 14 y/o las ID SEC N^{os}: 16 - 17; las ID SEC N^{os}: 20 - 21 y/o las ID SEC N^{os}: 22 - 23; las ID SEC N^{os}: 39 - 40 y/o las ID SEC N^{os}: 42 - 43; o las ID SEC N^{os}: 45 - 46 y/o las ID SEC N^{os}: 48 - 49).

Las regiones CDR1, 2 y/o 3 de los anticuerpos modificados genéticamente descritos anteriormente pueden comprender la(s) secuencia(s) de aminoácido(s) exacta(s) tales como las desveladas en este documento (por ejemplo, las CDRs del Ab #6, del Ab #3, del Ab #14, del Ab #17 o del Ab #19, establecidas en las ID SEC N^{os}: 7 - 12, 13 - 18, 19 - 24, 39 - 44 y 45 - 50, respectivamente). Sin embargo, el artesano con la pericia habitual apreciará que puede ser posible alguna desviación de las secuencias exactas de las CDR conservando aún la capacidad del anticuerpo de unirse eficazmente a la ErbB3 (por ejemplo, sustituciones conservativas de aminoácidos). Consecuentemente, en otra forma de realización, el anticuerpo modificado genéticamente puede estar formado por una o más CDRs que son, por ejemplo, idénticas en el 90%, el 95%, el 98%, el 99% o el 99,5% a una o más CDRs del Ab #6, del Ab #3 o del Ab #14.

En otra forma de realización, pueden alterarse uno o más residuos de una CDR para modificar la unión para conseguir una tasa de unión más favorable. Usando esta estrategia puede conseguirse un anticuerpo con una afinidad de unión ultra alta de, por ejemplo, 10^{10} M^{-1} o más. Las técnicas de maduración por afinidad, bien conocidas en la técnica, y las descritas en este documento, pueden usarse para alterar la (s) región(es) de la(s) CDR seguido del cribado para comprobar que las moléculas resultantes tienen el cambio deseado en la afinidad de unión. Consecuentemente, dado que las CDR(s) están alteradas, los cambios en la afinidad de unión así como en la inmunogenicidad, pueden ser monitorizados y puntuados, de forma que se consiguen anticuerpos optimizados para la mejor combinación de unión y baja inmunogenicidad.

Además, o en lugar, de las modificaciones en las CDRs, también pueden realizarse modificaciones en una o más de las regiones en marco, FR1, FR2, FR3 y FR4, de las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo, siempre que estas modificaciones no eliminen la afinidad de unión del anticuerpo.

En otra forma de realización, el anticuerpo es adicionalmente modificado con respecto a la función efectora, de forma que se potencia la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer, por ejemplo. Por ejemplo, puede(n) introducirse un(os) residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de puentes de disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una destrucción celular mediada por el complemento aumentada y una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo aumentada (ADCC). Véanse Caron y col., J. Exp. Med. 176: 1191 - 1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918 - 2922 (1992). También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con una actividad antitumoral mejorada usando reticuladores heterobifuncionales según se describe en Wolff y col. Cancer Research 53: 2560 - 2565 (1993). Alternativamente, un anticuerpo puede ser modificado genéticamente para que tenga regiones Fc dobles y pueda tener por lo tanto unas capacidades mejoradas de lisis del complemento y de ADCC. Véase Stevenson y col. Anti-Cancer Drug Design 3: 219 - 230 (1989).

La presente invención también engloba anticuerpos biespecíficos e inmunoconjugados, según se analiza a continuación.

50 (ii) Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención incluyen al menos una especificidad de unión para la ErbB3 y al menos una especificidad de unión para otro antígeno, tal como el producto de un oncogén. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos completos o como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos F(ab')₂ biespecíficos).

Los procedimientos para la elaboración de anticuerpos biespecíficos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 05117973 y el documento WO 06091209). Por ejemplo, la producción de anticuerpos biespecíficos completos puede basarse en la coexpresión de dos pares de cadenas pesada - ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (véase, por ejemplo, Millstein y col., Nature, 305: 537 - 539 (1983)). Los detalles adicionales sobre la generación de anticuerpos biespecíficos pueden encontrarse, por ejemplo, en Suresh y col., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986) y en Brennan y col., Science, 229: 81 (1985), que describe un proceso de unión química para la elaboración de anticuerpos biespecíficos. También se han descrito varias técnicas para la elaboración y el aislamiento de fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos

biespecíficos usando cremalleras de leucina (véase, por ejemplo, Kostelny y col., J. Immunol., 148 (5): 1547 - 1553 (1992)). También se ha informado de otra estrategia para la elaboración de fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena individual (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber y col., J. Immunol., 152: 5368 (1994)).

5 En una forma de realización en particular, el anticuerpo biespecífico comprende un primer anticuerpo o porción de unión del mismo que se une a la ErbB3 y un segundo anticuerpo o porción de unión del mismo que se une a la ErbB2, ERbB3, ErbB4, EGFR, IGF1-R, C-MET, Lewis Y, MUC-1, EpCAM, CA125, antígeno prostático específico de membrana, PDGFR- α , PDGFR- β , C-KIT o cualquiera de los receptores del FGF.

10 (iii) Inmunoconjugados

Los inmunoconjugados de la presente invención pueden formarse mediante la conjugación de los anticuerpos o de las porciones de unión al antígeno de los mismos descritos en este documento con otro agente terapéutico. Algunos agentes adecuados incluyen, por ejemplo, un agente citotóxico (por ejemplo, un agente quimioterapéutico), una toxina (por ejemplo, una toxina activa enzimáticamente de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) y/o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado). Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Las toxinas activas enzimáticamente y los fragmentos de la misma que pueden usarse incluyen la cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Hay disponible una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos anti-ErbB3 radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen

15 ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re.

Los inmunoconjugados de la invención pueden elaborarse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo, HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoilo) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolieno) y compuestos de flúor biactivo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricino según se describe en Vitetta y col., Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminapentaacético marcado con Carbono-14 (MX-DTPA) es un ejemplo de un agente quelante para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo (véase, por ejemplo, el documento WO94/11026)

20 30 35

III. Procedimientos para el cribado de los anticuerpos de la invención

40 Subsiguientemente a la producción de los anticuerpos o de las porciones de unión al antígeno que se unen a la ErbB3, dichos anticuerpos, o las porciones de los mismos, pueden ser cribados para comprobar sus diversas propiedades, tales como las descritas en este documento, usando una variedad ensayos que son bien conocidos en la técnica.

45 En una forma de realización, los anticuerpos o las porciones de unión al antígeno de los mismos son cribados para comprobar su capacidad para inhibir la fosforilación mediada por ligando de tipo EGF de la ErbB3. Esto puede realizarse tratando las células que expresan la ErbB3 con un ligando de tipo EGF en presencia y en ausencia del anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo. Después las células pueden ser lisadas y los lisados en bruto pueden centrifugarse para eliminar el material insoluble. La fosforilación de la ErbB3 puede medirse, por ejemplo, mediante inmunotransferencia Western seguida de un sondeado con un anticuerpo anti-fosfotirosina según se describe en Kim y col., *supra*, y en los siguientes Ejemplos.

50

En otras formas de realización, los anticuerpos y las porciones de unión al antígeno de los mismos son cribados para comprobar una o más de las siguientes propiedades: (1) la inhibición de la señalización mediada por ligando de la ErbB3 (por ejemplo, herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina) hasta la ErbB3; (2) la inhibición de la proliferación de las células que expresan la ErbB3; (3) la capacidad para disminuir los niveles de la ErbB3 en la superficie celular (por ejemplo, induciendo la internalización de la ErbB3), (4) la inhibición de la secreción del VEGF por las células que expresan la ErbB3; (5) la inhibición de la migración de las células que expresan la ErbB3; (6) la inhibición del crecimiento esferoidal de las células que expresan la ErbB3; y/o (7) la unión a un epítipo ubicado en el dominio I de la ErbB3, cada una de las cuales puede medirse fácilmente usando técnicas reconocidas en la técnica y aquellas analizadas en este documento.

55 60

La inhibición de una o más de la señalización mediada por herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina hasta la ErbB3 puede medirse fácilmente usando ensayos rutinarios, tales como los descritos en Horst y col. *supra*. Por ejemplo, la capacidad de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo para inhibir la señalización mediada por herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina hasta la ErbB3 puede medirse mediante ensayos de

65

- cinasa para sustratos conocidos de la ErbB3 tales como, por ejemplo, SHC y PI3K, según se describe, por ejemplo, en Horst y col. *supra*, Sudo y col., (2000) *Methods Enzymol*, 322: 388 - 92; y Morgan y col. (1990) *Eur. J. Biochem.*, 191: 761 - 767, tras la estimulación por una o más de herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina. Consecuentemente, las células que expresan la ErbB3 pueden ser estimuladas con una o más de herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina, E incubadas con candidato a anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo. Los lisados celulares preparados subsiguientemente a partir de dichas células pueden ser inmunoprecipitados con un anticuerpo para un sustrato de la ErbB3 (o una proteína en una vía celular que implica la ErbB3) tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-JNK-1, y ensayarse para comprobar la actividad de cinasa (por ejemplo, la actividad de cinasa de JNK o la actividad de cinasa de PI3) usando técnicas reconocidas en la técnica.
- Una disminución o una desaparición completan en el nivel o en la actividad (por ejemplo, en la actividad de cinasa) de un sustrato una proteína de la ErbB3 en una vía que implica la ErbB3 en presencia del anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo, con respecto al nivel o la actividad en ausencia del anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo, es indicativa de que un anticuerpo o una porción de unión al antígeno inhibe una o más de la señalización mediada por herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina.
- En ciertas formas de realización, el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo inhibe la señalización mediada por ligando (por ejemplo, herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina) de la ErbB3 disminuyendo la unión de una o más de herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina a la ERbB3.
- Con objeto de seleccionar aquellos anticuerpos o porciones de unión al antígeno de los mismos que inhiben la unión de una o más de herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina a la ErbB3, pueden ponerse en contacto células que expresan la ErbB3 (por ejemplo, células MALME-3M, según se describe en los Ejemplos, *infra*), con un ligando marcado de la ErbB3 (por ejemplo, herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina radiomarcada) en ausencia (control) o en presencia del anticuerpo anti-ErbB3 o de una porción de unión al antígeno del mismo. Si el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo inhibe la unión de herregulina, de epirregulina, de epigenina o de birregulina a la ErbB3, entonces se observará una disminución estadísticamente significativa en la cantidad de marcador recuperado (por ejemplo, de herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina radiomarcada) con respecto a la cantidad en ausencia del anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo.
- El anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo puede inhibir la unión del ligando de la ErbB3 (por ejemplo, herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina) mediante cualquier mecanismo. Por ejemplo, el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo puede inhibir la unión del ligando de la ErbB3 (por ejemplo, una o más de herregulina, epirregulina, epigenina o birregulina) a la ErbB3 uniéndose al mismo sitio o a un sitio superpuesto en la ErbB3 como ligando de la ErbB3. Alternativamente, el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo puede inhibir la unión de un ligando de la ErbB3 alterando o distorsionando la conformación de la ErbB3, de forma que sea incapaz de unirse al ligando de la ErbB3.
- Los anticuerpos y las porciones de unión al antígeno de los mismos que disminuyen los niveles de la ErbB3 en la superficie de las células pueden identificarse por su capacidad para regular por disminución la ErbB3 en las células tumorales. En ciertas formas de realización, los anticuerpos o las porciones de unión al antígeno de los mismos disminuyen la expresión en la superficie celular en la célula de la ErbB3 induciendo la internalización (o aumentando la endocitosis) de la ErbB3. Para comprobar esto puede biotinilarse la ErbB3 y determinarse fácilmente el número de moléculas de ErbB3 en la superficie celular, por ejemplo, midiendo la cantidad de biotina en una monocapa de células en cultivo en presencia o en ausencia de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo, por ejemplo, según se describe, por ejemplo, en Waterman y col., *J. Biol. Chem.* (1998), 273: 13819 - 27, seguido de la inmunoprecipitación de la ErbB3 y el sondeo con estreptavidina. Una disminución en la detección de ErbB3 biotinilada con el tiempo en presencia de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno es indicativa de que el anticuerpo disminuye los niveles de la ErbB3 en la superficie celular.
- Los anticuerpos o las porciones de unión al antígeno de los mismos de la presente invención también pueden ensayarse para comprobar su capacidad para inhibir la proliferación de células que expresan la ErbB3, por ejemplo, células tumorales, usando técnicas reconocidas en la técnica, tales como el ensayo Cell Titer Glow descrito en los siguientes Ejemplos (véase también, por *ejemplo*, Macallan y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1998) 20; 95 (2): 708 - 13; Perez y col. (1995) *Cancer Research* 55, 392 - 398).
- En otra forma de realización, los anticuerpos o las porciones de unión al antígeno de los mismos son cribados para comprobar su capacidad para inhibir la secreción del VEGF en células que expresan la ErbB3. Esto puede realizarse mediante el uso de ensayos bien conocidos, tales como el kit de ELISA del VEGF disponible en R&D Systems (Minneapolis, MN, número de catálogo DY293B). De forma análoga, los anticuerpos o las porciones de unión al antígeno de los mismos pueden ser cribados para comprobar su capacidad para inhibir la migración de las células que expresan la ErbB3 (por ejemplo, células MCF-7) usando un ensayo transpocillo (Millipore Corp., Billerica, MA, número de catálogo ECM552) según se describe en este documento.
- En otra forma de realización, los anticuerpos o las porciones de unión al antígeno de los mismos son cribados para comprobar su capacidad para inhibir el crecimiento esferoidal de las células que expresan la ErbB3. Esto puede realizarse mediante el uso de un ensayo que se aproxima a las condiciones de desarrollo de crecimiento tumoral

(véase, por ejemplo, Herman y col. (2007) Journal of Biomolecular Screening Electronic publication) según se describe en este documento.

Los anticuerpos o las porciones de unión al antígeno de los mismos que se unen al mismo epítipo o a uno solapante como uno o más anticuerpos de la presente invención también pueden identificarse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica y descritas en este documento. Por ejemplo, con objeto de cribar los anticuerpos que se unen al mismo epítipo o a uno solapante en la ErbB3 unida a un anticuerpo de interés, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado, tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988).

IV. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno, o una combinación, de anticuerpos monoclonales, o de porciones de unión al antígeno de los mismos, de la presente invención, formulados junto con un portador farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, las composiciones incluyen una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) anticuerpos aislados de la invención, que se unen a diferentes epítopos de la ErbB3.

Según se usa en este documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el portador es adecuado para la administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, la molécula biespecífica y multiespecífica, puede estar recubierto con un material para proteger el compuesto del acción de los ácidos y de otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y no imparte ningún efecto toxicológico indeseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., y col. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1 - 19). Algunos ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición ácida y sales de adición básica. Algunas sales de adición ácida incluyen aquellas obtenidas a partir de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como a partir de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos fenilsustituídos, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos y ácidos aromáticos sulfónicos, y similares. Algunas sales de adición básica que incluyen aquellas obtenidas a partir de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio, y similares, así como a partir de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletlenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse solas o en una terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con al menos uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como los agentes antineoplásicos descritos *infra*. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse junto con radioterapia y/o cirugía.

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante varios procedimientos conocidos en la técnica. Como apreciará el artesano experto, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán al compuesto frente a una liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Hay muchos procedimientos para la preparación de dichas formulaciones que están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Para administrar un compuesto de la invención a través de ciertas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto, o coadministrar el compuesto, con un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo, en liposomas o en un diluyente. Algunos diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen disolución salina y disoluciones acuosas tamponadas. Los liposomas incluyen emulsiones de agua en aceite CGF así como los liposomas convencionales (Strejan y col. (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27).

Algunos portadores farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o de dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto cuando cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en la composición.

Las composiciones terapéuticas deben ser típicamente estériles y estables en las condiciones de elaboración y de almacenamiento. La composición puede formularse como una disolución, una microemulsión, un liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una elevada concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos será preferible incluir agentes de isotonicidad, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de una esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son secado a vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una disolución previamente filtrada estéril de los mismos.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Por ejemplo, los anticuerpos humanos de la invención pueden administrarse una o dos veces por semana mediante inyección subcutánea o una o dos veces al mes mediante inyección subcutánea.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en formas de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. Una forma de dosificación unitaria, según se usa en este documento, se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas de dosificación unitarias de la invención vendrá dictada por, y será directamente dependiente, de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico en particular que se va a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de combinar dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos susceptibles.

Algunos ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico, y similares; (2) antioxidantes liposolubles, tales como palmitato de ascorbilo, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para su administración por vía oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en formas de dosificación unitaria, y pueden prepararse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica farmacéutica. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del sujeto que se va a tratar y del modo de administración en particular. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación individual será generalmente aquella cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, de un cien por ciento, esta cantidad variará entre aproximadamente el 0,001 por ciento hasta aproximadamente el noventa por ciento de principio activo, preferiblemente desde aproximadamente el 0,005 por ciento hasta aproximadamente el 70 por ciento, lo más preferiblemente desde aproximadamente el 0,01 por ciento hasta aproximadamente el 30 por ciento.

Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para su administración por vía vaginal también incluyen óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, formulaciones en espuma o en aerosol que contienen portadores tales como los conocidos en la técnica por ser apropiados. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de las composiciones de esta invención incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propelente que pueda ser necesario.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", según se usan en este documento, significan modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, la inyección y la infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Algunos ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener coadyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Algunos ejemplos particulares de coadyuvantes que son bien conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, coadyuvantes inorgánicos (tales como sales de aluminio, por ejemplo, fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio), coadyuvantes orgánicos (por ejemplo, escualeno), coadyuvantes de base oleosa, virosomas (por ejemplo, virosomas que contienen hemaglutinina unida a membrana y neuraminidasa derivada del virus de la gripe).

La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes de isotonicidad, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Cuando los compuestos de la presente invención se administran como productos farmacéuticos, a seres humanos y animales, pueden proporcionarse solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, del 0,001 al 90% (más preferiblemente, del 0,005 al 70%, tal como del 0,01 al 30%) de principio activo junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

Independientemente de la vía de administración elegida, los compuestos de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, están formulados en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Los niveles de dosis reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad de principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración en particular, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosis elegido dependerá de varios factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones en particular de la presente invención empleadas, o del éster, la sal o la amida de las mismas, de la vía de administración, del tiempo de administración, de la tasa de excreción del compuesto en particular que se está empleando, de la duración del tratamiento, de otros fármacos, compuestos y/o materiales usados junto con las composiciones empleadas en particular, de la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y los antecedentes médicos del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en la ciencia médica. Un médico o un veterinario experto habitual en la técnica pueden determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz requerida de la composición farmacéutica. Por ejemplo, el médico o el veterinario podrían iniciar las dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a unos niveles menores de los requeridos con objeto de conseguir el efecto terapéutico deseado, y aumentar gradualmente la dosis hasta que se consigue el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será aquella cantidad del compuesto que sea la menor dosis eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz generalmente dependerá de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, administrándose preferiblemente en una zona próxima al sitio del objetivo. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado en los intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria. Mientras sea posible administrar un compuesto de la presente invención solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación (composición) farmacéutica.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una forma de realización preferida, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmico sin aguja, tales como los dispositivos desvelados en las Patentes de EE.UU. N^{os} 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 o 4.596.556. Algunos ejemplos de implantes y módulos conocidos útiles en la presente invención incluyen: la Patente de EE.UU. N^o 4.487.603, que desvela una bomba de microinfusión implantable para la dispensación de medicación a una velocidad controlada; la Patente de EE.UU. N^o 4.486.194, que desvela un dispositivo terapéutico para la administración de medicación a través de la piel; la Patente de EE.UU. N^o 4.447.233, que desvela una bomba de infusión de medicación para la administración de medicación a una velocidad de infusión precisa; la Patente de EE.UU. N^o 4.447.224, que desvela un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de un fármaco; la Patente de EE.UU. N^o 4.439.196, que desvela un sistema osmótico de administración de fármacos con varios compartimentos multicámara; y la Patente de EE.UU. N^o 4.475.196, que desvela un sistema osmótico de administración de fármacos. Los expertos en la técnica conocerán otros muchos de dichos implantes, sistemas de administración y módulos.

En ciertas formas de realización, los anticuerpos monoclonales de la invención pueden formularse para asegurar su adecuada distribución *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención atraviesan la barrera hematoencefálica (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los procedimientos de elaboración de liposomas, véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender una o varias fracciones que son transportadas selectivamente a células u órganos específicos, mejorando así la administración dirigida de fármacos (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685). Algunos ejemplos de fracciones dirigidas incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 5.416.016 a favor de Low y col.); manósidos (Umezawa y col., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); anticuerpos (P. G. Bloeman y col. (1995) FEES Lett. 357: 140; M. Owais y col. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180); el receptor de la proteína tensioactiva A (Briscoe y col. (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134), diferentes especies de los cuales pueden comprender las formulaciones de la invención, así como componentes de las moléculas inventadas; pág. 120 (Schreier y col. (1994) J. Biol. Chem. 269: 9090); véase también K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4: 273.

V. Procedimientos de uso de los anticuerpos de la invención

En este documento se desvelan procedimientos de uso de los anticuerpos y de las porciones de unión al antígeno de los mismos que se unen a la ErbB3, en una variedad de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas *ex vivo* e *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar una enfermedad asociada con la señalización dependiente de la ErbB3, incluyendo varios tipos de cáncer.

En una forma de realización, la presente solicitud desvela un procedimiento para tratar una enfermedad asociada con la señalización dependiente de la ErbB3 mediante la administración a un sujeto de un anticuerpo o de una porción de unión al antígeno del mismo de la invención en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad. Algunas enfermedades adecuadas incluyen, por ejemplo, varios tipos de cánceres que incluyen, pero no se limitan a, melanoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, carcinoma renal, cáncer gastrointestinal, cáncer de colon, cáncer de pulmón y cáncer de próstata.

El anticuerpo puede administrarse solo o con otro agente terapéutico que actúa, junto o sinérgicamente, con el anticuerpo para tratar la enfermedad asociada con la señalización mediada por la ErbB3. Dichos agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, los agentes antineoplásicos descritos *infra* (por ejemplo, citotoxinas, agentes quimioterapéuticos, moléculas pequeñas y radiación).

En otra forma de realización, la presente solicitud desvela un procedimiento para diagnosticar una enfermedad (por ejemplo, un cáncer) asociada con la regulación por incremento de la ErbB3 en un sujeto, poniendo en contacto los anticuerpos o las porciones de unión al antígeno de la invención (por ejemplo, *ex vivo* o *in vivo*) con células procedentes del sujeto, y midiendo el nivel de unión de la ErbB3 a las células. Unos niveles anormalmente elevados de unión a la ErbB3 indican que el sujeto tiene una enfermedad relacionada con la regulación por incremento de la ErbB3.

También, en el ámbito de la presente invención hay kits que comprenden anticuerpos y porciones de unión al antígeno de los mismos de la invención que opcionalmente incluyen instrucciones para su uso en el tratamiento o en el diagnóstico de una enfermedad asociada con la regulación por incremento de la ErbB3 y/o con la señalización dependiente de la ErbB3. Los kits pueden incluir una etiqueta que indique el uso previsto del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier inscripción, material de publicidad o material registrado suministrado en o con el kit, o que acompañe de otro modo al kit.

Otras formas de realización de la presente invención se describen en los siguientes Ejemplos.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Materiales y procedimientos

A lo largo de los ejemplos se usaron los siguientes materiales y procedimientos salvo que se indique de otro modo.

En general, la práctica de la presente invención emplea, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, por ejemplo, tecnología de anticuerpos) y técnicas convencionales de preparación de polipéptidos. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y col., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); y Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel y col., John Wiley & Sons

(1992). Se describen sistemas modelo *in vitro* e *in vivo* para ensayar la biología del HCV, por ejemplo, en Cell culture models and animal models of viral hepatitis. Parte II: hepatitis C Lab. Anim. (NY); 34 (2): 39 - 47 (2005) y en The chimpanzee model of hepatitis C virus infections, ILAR J.; 42 (2): 117 - 26 (2001).

5 Líneas celulares

Todas las líneas celulares usadas en los experimentos descritos a continuación se obtuvieron en el National Cancer Institute o fueron proporcionadas por los investigadores, según se indica.

10 Líneas celulares:

MCF7- ATCC número de catálogo HTB-22

T47D- ATCC número de catálogo HTB-133

Colo357- estas células se obtuvieron a partir de un investigador académico y son descritas por Kolb y col. (2006)

15 Int. J. Cancer, 120: 514 - 523.

Du 145- ATCC número de catálogo HTB-81

OVCAR8- la fuente ya se ha descrito en la solicitud provisional.

H1975 ATCC número de catálogo CRL-5908

20 Pulverización de las células tumorales

Se usó un criopulverizador (Covaris Inc) para la pulverización de los tumores. Los tumores se almacenaron en bolsas especiales (pesadas previamente antes de la adición del tumor) y se colocaron en nitrógeno líquido durante su manipulación. Para los tumores pequeños se añadieron en primer lugar 200 µl de tampón de lisis a la bolsa que contenía el tumor, se congeló en nitrógeno líquido y después se pulverizó para mejorar la recuperación del tumor a partir de la bolsa. Los tumores pulverizados se transfirieron a tubos de Eppendorf de 2 ml y se colocaron en nitrógeno líquido hasta que estuvieron listos para su procesado adicional.

30 Lisis de las células tumorales

Los tumores fueron lisados en tampón de lisis complementado con inhibidores de la proteasa y de la fosfatasa. El tampón de lisis se añadió a las alícuotas tumorales hasta una concentración final de aproximadamente 62,5 mg/ml. Las muestras tumorales fueron homogeneizadas mediante agitación con vórtex durante 30 s y una incubación en hielo durante aproximadamente 30 min. Los lisados fueron rotados durante aproximadamente 10 min en columnas Qiashredder de Qiagen para una homogeneización adicional de las muestras. Los lisados clarificados se colocaron en alícuotas en tubos nuevos para su tratamiento adicional.

35 Ensayo de BCA

Se realizó un ensayo de BCA (Pierce) siguiendo el protocolo del fabricante en todas las muestras tumorales. La concentración proteica total (en mg/ml) de cada muestra tumoral se usó posteriormente en la normalización de los resultados del ELISA.

45 Ensayo de ELISA

Todos los reactivos del ELISA para los ELISAs total y de fosfo-ErbB3 se adquirieron en R&D Systems como kits Duoset. Se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc Maxisorb con 50 µl de un anticuerpo y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente las placas se lavaron 3 veces con 1000 µl/pocillo en el lavador de placas BioTek con PBST (0,05% de Tween-20). Las placas fueron subsiguientemente bloqueadas durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente con un 2% de BSA en PBS. Las placas se lavaron 3 veces con 1000 µl/pocillo en el lavador de placas BioTek con PBST (0,05% de Tween-20). Se diluyeron 50 µl de los lisados celulares y los estándares en un 50% de tampón de lisis y se usó un 1% de BSA en los duplicados para un tratamiento adicional. Las muestras se incubaron durante 2 h a 4°C en un agitador de placas y se lavaron 3 veces con 1000 µl/pocillo en el lavador de placas BioTek con PBST (0,05% de Tween-20). Se diluyeron aproximadamente 50 µl de un anticuerpo de detección en un 2% de BSA, se añadió PBST y se incubó durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente. Para la detección de la fosfo-ErbB3, el anticuerpo se conjugó directamente con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con 1000 µl/pocillo en el lavador de placas BioTek con PBST (0,05% de Tween-20). Se añadieron aproximadamente 50 µl de estreptavidina-HRP y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente (excepto para la pErbB3). Las placas se lavaron 3 veces con 1000 µl/pocillo en el lavador de placas BioTek con PBST (0,05% de Tween-20). Se añadieron aproximadamente 50 µl de sustrato Supersignal Pico ELISA y la placa se leyó usando un lector de placas Fusion. Los datos fueron analizados mediante el uso de EXCEL. Las muestras por duplicado se promediaron y las barras de error se usaron para representar la desviación estándar entre los dos replicados.

65

Ejemplo 1: producción de los anticuerpos usando expresión de fagos

Con objeto de obtener anticuerpos anti-ErbB3 humanos, denominados en este documento Ab #6, Ab #3, Ab #14, Ab #17 y Ab #19, inicialmente se cribó una genoteca de fagos Fab humana que incluía una combinación única de secuencias de inmunoglobulinas obtenidas a partir de donantes humanos (Hoet y col. *supra*) para comprobar los ligandos de la ErbB3.

Usando una ErbB3 purificada y una línea de células de ovario de hámster chino que expresan la ErbB3 en la superficie celular, se identificaron 73 secuencias únicas de Fab a partir de la genoteca. Estos 73 clones se reformatearon después como Fab solo, sin el fago. Usando procedimientos de alto rendimiento, estos Fabs fueron expresados a pequeña escala y ensayados para comprobar su unión mediante el uso de ELISA y el procedimiento Flexchip, que es una tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) de alto rendimiento. Los 73 Fabs sin el fago se motearon en la superficie de un chip y se midió la cinética de unión y el bloqueo del epítipo a una proteína de fusión objetivo ErbB3-his o a una proteína ErbB3-Fc (R & D Systems). La constante de unión en equilibrio y las velocidades de asociación/disociación para los Fabs se calcularon a partir de los datos obtenidos.

A continuación se examinó la unión de varios Fabs a células MALME-3M usando aproximadamente 500 nM de los Fabs y una dilución 1:750 de un anticuerpo secundario de cabra anti-humano Alexa 647. Según se muestra en las Figuras 1A y 1B, muchos de los Fabs candidatos mostraron una tinción apreciable de las células MALME-3M.

Ejemplo 2: optimización de los Fabs anti-ErbB3

Subsiguientemente a la identificación de los Fabs que bloqueaban la unión del ligando de la ErbB3, la herregulina, a la ErbB3, se optimizaron los codones de las secuencias VH y VL de los Fabs como sigue.

Específicamente, se reformatearon las regiones VH y VL usando constructos de expresión para la expresión como un isotipo de IgG1 o de IgG2. Los constructos incluían un esqueleto de Selexis que tiene un casete diseñado para la sustitución de las apropiadas secuencias de la cadena pesada y ligera. Los vectores Selexis incluían un promotor de CMV y una señal compatible de poli-A.

Las secuencias de ácidos nucleicos para los codones optimizados de las VH y VL del Ab #6 se establecen en las ID SEC N^{os}: 25 y 26, respectivamente, y las del Ab #3 se establecen en las ID SEC N^{os}: 27 y 28, respectivamente, según se muestra en la Figura 22.

Ejemplo 3: afinidad de unión por la ErbB3

Las constantes de disociación de los anticuerpos anti-ErbB3 se midieron usando dos técnicas independientes, es decir, un ensayo de resonancia de plasmón superficial y un ensayo de unión celular usando células MALME-3M.

Ensayo de resonancia de plasmón superficial

El ensayo de resonancia de plasma un superficial (también denominado ensayo Flexchip) se realizó según se describe en Wassaf y col. (2006) *Analytical Biochem.*, 351: 241 - 253. El valor de la K_D se calculó basándose en la fórmula $K_D = K_d/K_a$.

Los valores de la K_D de los Ab #6 y Ab #3, respectivamente, medidos mediante el uso del ensayo de resonancia de plasmón superficial, se representan en las Figuras 2A y 2B. El Ab #6 tenía un valor de la K_D de aproximadamente 4 nM y el Ab #3 tenía un valor de la K_D de aproximadamente 8 nM, según se representa en las Figuras 2A y 2B, respectivamente.

Ensayo de unión celular

El ensayo de unión celular para la determinación de los valores de la K_D de los Ab #6 y Ab #3 se realizó como sigue.

Se desprendieron células MALME-3M con 2 ml de tripsina-EDTA + 2 ml de RMPI + EDTA 5 mM a temperatura ambiente durante 5 minutos. Inmediatamente se añadió RPMI completo (10 ml) a las células tripsinizadas, se resuspendieron suavemente y se rotaron en una centrífuga de sobremesa Beckman a 1.100 rpm durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en tampón de tinción BD (PBS + 2% de suero bovino fetal + 0,1% de azida sódica, Becton Dickinson) a una concentración de 2×10^6 células por ml y se colocaron en placas alícuotas de 50 μ l (1×10^5 células) en una placa de titulación de 96 pocillos.

Se preparó una disolución de 150 μ l de anticuerpo anti-ErbB3 200 nM (el Ab #6 o el Ab #3) en tampón de tinción BD en un tubo de eppendorf y se diluyó sucesivamente dos veces en 75 μ l de tampón de tinción BD. Las concentraciones del anticuerpo diluido variaban entre 200 nM y 0,4 nM. Después se añadieron directamente alícuotas de 50 μ l de las diferentes disoluciones de proteínas a los 50 μ l de la suspensión de células, dando unas concentraciones finales de 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12 nM, 6 nM, 3 nM, 1,5 nM, 0,8 nM, 0,4 nM y 0,2 nM del

anticuerpo.

Las células alicuotadas en la placa de 96 pocillos se incubaron con las diluciones de proteínas durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador de plataforma y se lavaron 3 veces con 300 μ l de tampón de tinción BD.

5 Después las células se incubaron con 100 μ l de una dilución 1:750 de IgG de cabra anti-humana marcada con Alexa 647 en tampón de tinción BD durante 45 minutos en un agitador de plataforma en la habitación fría. Finalmente, las células se lavaron dos veces, se sedimentaron y se resuspendieron en 250 μ l de tampón de tinción BD + 0,5 μ g/ml de yoduro de propidio. El análisis de 10.000 células se realizó con un citómetro de flujo FACScalibur usando el canal FL4. Los valores de MFI y las correspondientes concentraciones de los anticuerpos anti-ErbB3 se representaron en el eje y, y en el eje x, respectivamente. La K_D de la molécula se determinó mediante GraphPad Prism usando el modelo de unión de sitio único para una curva de regresión no lineal.

10 El valor de la K_D se calculó basándose en la fórmula $Y = B_{max} * X / K_D + X$ (B_{max} = fluorescencia en la saturación. X = concentración del anticuerpo. Y = grado de unión). Según se muestra en las Figuras 2C y 2D, los Ab #6 y Ab #3 tenían unos valores de K_D de aproximadamente 4 nM y 1,3 nM, respectivamente, en un ensayo de unión celular usando células MALME-3M.

Ejemplo 4: especificidad de unión / unión del epítipo para la ErbB3

20 La especificidad de unión de un isotipo de la IgG2 del Ab #6 a la ErbB3 se ensayó usando un ELISA como sigue. También se analizó la identificación del epítipo unido por el Ab #6.

25 Específicamente, se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc Maxisorb con 50 μ l de 5 μ g/ml de proteína (ErbB3 humana recombinante, EGFR humano recombinante o una proteína no relacionada (BSA)) y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente las placas se lavaron 3 veces con 1000 μ l/pocillo de PBST (0,05% de Tween-20) en el lavador de placas BioTek. Los pocillos se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con un 2% de BSA en PBS. Las placas se lavaron 3 veces con 1000 μ l/pocillo de PBST (0,05% de Tween-20) en el lavador de placas BioTek. Se añadieron aproximadamente 50 μ l de los lisados celulares y los estándares en un 50% de tampón de lisis y se usó un 1% de BSA en los duplicados para un tratamiento adicional. Las muestras se incubaron durante 2 h a 4°C en un agitador de placas y se lavaron 3 veces con 1000 μ l/pocillo en el lavador de placas BioTek con PBST (0,05% de Tween-20). Se añadieron aproximadamente 50 μ l de Ab #6 a varias diluciones (1 μ M y diluciones seriadas dos veces) en un 2% de BSA, PBST. Todas las muestras se analizaron por duplicado y se incubaron durante 2 h a 4°C en un agitador de placas. Las placas se lavaron 3 veces con 1000 μ l/pocillo de PBST (0,05% de Tween-20) en el lavador de placas BioTek. Se añadieron 50 μ l de anticuerpo de detección de IgG humana (conjugado de HRP (Bethyl Inc; dilución de 1:75000 en un 2% de BSA, PBST)) y las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 1000 μ l/pocillo de PBST (0,05% de Tween-20) en el lavador de placas BioTek.

30 Según se muestra en la Figura 3, el Ab #6 se unió a la ErbB3 recombinante en un ELISA, pero no mostró ninguna unión apreciable a EGFR, BSA o TGF- α .

35 Se clonó un fragmento (mutante de truncamiento) correspondiente a los residuos de aminoácidos 20 - 202 de la ErbB3 en el vector de expresión de levadura pYD2 (una versión modificada de pYD1 (Invitrogen) con un codón de detención diseñado frente a la etiqueta de His) entre los sitios de restricción Nhe y BsiWI. El plásmido se transformó en la cepa de levadura EBY100 (Invitrogen) y los clones que contenían el plásmido se seleccionaron en medio selectivo de Trp-. El clon se hizo crecer en un medio que contenía glucosa durante una noche a 30°C y se indujo la expresión del mutante de truncamiento de la ErbB3 mediante la transferencia a un medio que contiene galactosa durante 2 días a 18°C. Las levaduras que mostraban el mutante de truncamiento de ErbB3 se tiñeron 50 nM de Ab #6, seguido de un anticuerpo de cabra anti-humano marcado con colorante Alexa-647. Una muestra por separado se tiñó con el anticuerpo de cabra anti-humano únicamente para demostrar que no hay unión no específica a la levadura por parte del anticuerpo secundario. El análisis se realizó mediante citometría de flujo en el clasificador celular FACS Calibur (BD Biosciences).

40 Según se muestra en la Figura 30, el Ab #6 se unió al mutante de truncamiento, es decir, a los residuos de aminoácidos 20 - 202 de la ErbB3.

Ejemplo 5: regulación por disminución de la ErbB3 total en células tumorales

45 Se ensayó la capacidad del Ab #6 para regular por disminución la expresión de la ErbB3 tanto *in vitro* como *in vivo* en células tumorales, como sigue.

50 Las células MALME-3M se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos y se hicieron crecer en medio RPMI-1640 complementado con antibióticos, L-glutamina 2 mM y un 10% de suero bovino fetal (FBS) durante 24 horas a 37°C y con un 5% de dióxido de carbono. Después el medio se cambió por MEDIO RPMI-1640 con antibióticos, L-glutamina 2 mM con y sin el anticuerpo a las concentraciones de 1 μ M, 250 nM, 63 nM, 16 nM, 4,0 nM, 1,0 nM, 240

- pM, 61 pM y 15 pM. Las células se hicieron crecer durante 24 horas a 37°C y con un 5% de dióxido de carbono, se lavaron con PBS frío, después se recogieron con tampón de lisis de extracto proteico de mamífero (MPER) (Pierce, 78505) que contiene NaCl 150 mM, pirofosfato sódico 5 mM, bpV (fen) 10 µM, fenarsina 50 µM, ortovanadato sódico 1 mM y un cóctel inhibidor de proteasas (Sigma, P714). Los lisados celulares se diluyeron dos veces con un 4% de suero bovino fetal en disolución salina tamponada con fosfato con un 0,1% de tween-20, después se analizaron mediante un ELISA con anticuerpo de captura de ratón anti-ErbB3 humana y un anticuerpo de detección secundario de ratón anti-ErbB3 humana biotinilado. La señal se generó con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante reaccionada con un sustrato quimioluminiscente (Pierce, 37070). Los ELISAs se visualizaron usando un luminómetro.
- Según se muestra en la Figura 4, el Ab #6 disminuyó los niveles totales de la ErbB3 en aproximadamente un 46,9% en células MALME-3M *in vitro*, medido mediante un ELISA. Como control se usó medio que no contenía suero ni anticuerpo.
- En un experimento adicional se examinó la regulación por disminución de los receptores de la ErbB3 en células MALME-3M usando los isotipos IgG1 e IgG2 del Ab #6 usando un análisis por FACS. Las células MALME-3M se tripsinizaron en una placa de 15 cm y se lavaron una vez con RPMI + 10% de suero bovino fetal. Los sedimentos celulares se resuspendieron a una densidad de 1×10^6 células por ml. Se añadieron dos alícuotas de 2×10^5 células a una placa de cultivo tisular de 12 pocillos y se resuspendieron en un volumen final de 800 µl de RPMI + 10% de suero bovino fetal. En un pocillo se añadió el isotipo IgG1 de Ab #6 o IgG2 de Ab #6 a una concentración final de 100 nM (muestra tratada) y en el otro pocillo se añadió un volumen equivalente de PBS (muestra no tratada).
- Al día siguiente, las células tratadas y no tratadas fueron tripsinizadas, lavadas e incubadas con 100 nM del Ab #6 en tampón de tinción BD durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de tampón de tinción BD y se incubaron con 100 µl de una dilución 1:500 de Alexa 647 anti-humano de cabra marcado con Alexa 647 durante 45 minutos en hielo. Después, las células se lavaron y se resuspendieron en 300 µl de tampón de tinción BD + 0,5 µg/ml de yoduro de propidio. El análisis de 10.000 células se realizó con un citómetro de flujo FACScalibur usando el canal FL4.
- Según se muestra en las Figuras 5A y 5B, ambos isotipos IgG1 y IgG2 del Ab #6 regularon por disminución la ErbB3 en células MALME-3M en aproximadamente el 62% y aproximadamente el 66%, respectivamente.
- Con objeto de determinar si esta disminución era debida a la internalización del receptor de la ErbB3 en la superficie de las células MALME-3M, se midió la expresión con el tiempo de la ErbB3 en presencia del anticuerpo. Específicamente, las células MALME-3M se tripsinizaron en una placa de 15 cm y se lavaron una vez con RPMI + 10% de suero bovino fetal. Los sedimentos celulares se resuspendieron a una densidad de 1×10^6 células por ml. Se añadieron dos alícuotas de 2×10^5 células a una placa de cultivo tisular de 12 pocillos y se resuspendieron en un volumen final de 800 µl de RPMI + 10% de suero bovino fetal. En un pocillo se añadió el anticuerpo anti-ErbB3 a una concentración final de 100 nM (muestra tratada) y en el otro pocillo se añadió un volumen equivalente de PBS (muestra no tratada). Al día siguiente, las células tratadas y no tratadas fueron tripsinizadas, lavadas e incubadas con 100 nM de anticuerpo anti-ErbB3 en tampón de tinción BD durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de tampón de tinción BD y se incubaron con 100 µl de una dilución 1:500 de Alexa 647 anti-humano de cabra marcado con Alexa 647 durante 45 minutos en hielo. Después, las células se lavaron y se resuspendieron en 300 µl de tampón de tinción BD + 0,5 µg/ml de yoduro de propidio. El análisis de 10.000 células se realizó con un citómetro de flujo FACScalibur usando el canal FL4.
- Según se muestra en la Figura 6, la regulación por disminución de la ErbB3 en presencia del Ab #6 fue medida a las 0 horas (Figura 6A), a las 0,5 horas (la Figura 6B), a las 2 horas (Figura 6C) y a las 24 horas (Figura 6D). Según se muestra en las Figuras 6A - 6D, aproximadamente el 50% de los receptores de la ErbB3 de la superficie celular fueron regulados por disminución después de aproximadamente 30 minutos, y aproximadamente a las 24 horas, aproximadamente el 93% de los receptores de la superficie celular estaban regulados por disminución.
- La capacidad del Ab #6 de provocar la regulación por disminución de la ErbB3 *in vivo* en células de melanoma también se examinó como sigue.
- En resumen, se adquirieron ratones nu/nu deficientes en linfocitos T (ratones hembra de 3 - 4 semanas de edad originados en NIH; no consanguíneos; de fondo albino) en Charles River Labs (Wilmington, MA). Las células MALME-3M para la implantación se hicieron crecer en cultivo (medio RPMI, 10% de FBS, L-glutamina y antibióticos, 37°C, 5% de CO₂) hasta aproximadamente un 80% de confluencia antes de recogerlas. Las células se mantuvieron en hielo hasta su implantación. A los ratones fueron se les implantaron mediante inyección subcutánea 100 µl de células MALME-3M en el costado derecho y se dejaron recuperar mientras eran monitorizados para controlar el crecimiento tumoral inicial.
- Los tumores se midieron (longitud por ancho) con un calibre digital, y a los ratones se les inyectó por vía intravenosa IgG2a (Sigma, M7769-5MG). A los ratones se les inyectó intraperitonealmente cada dos días con 15 µg o con 100

µg del anticuerpo número 6 y los tumores se midieron tres veces por semana y se registraron en una hoja de cálculo de Microsoft EXCEL.

5 Se realizaron las mediciones finales de los tumores (L x W), los ratones fueron sacrificados mediante asfixia con CO₂ y los tumores fueron extirpados, congelados al instante en nitrógeno líquido, y almacenados a -80°C (para su análisis bioquímico). Las mediciones finales de los tumores se analizaron y representaron gráficamente por área tumoral y volumen tumoral según se describe, por ejemplo, en Burtrum y col., (2003) Cancer Res., 63: 8912 - 8921. Los datos también se analizaron según las medias "normalizadas" y "no normalizadas" tanto para el volumen tumoral como para el área tumoral. Para la "normalización" de los datos, en cada punto temporal de medición, cada tumor de cada grupo fue dividido según el tamaño inicial del tumor determinado mediante una medición con un calibre.

10 Según se muestra en la Figura 7, de entre los diversos anticuerpos ensayados en este ensayo, el Ab #6 provocó la regulación por disminución total de la ErbB3 tan pronto como 24 horas tras la inyección en los tumores tratados con el isotipo IgG1 o IgG2 del Ab #6). Se usó PBS como control.

15 En un experimento adicional se examinó la capacidad del Ab #6 para regular por disminución la ErbB3 en xenoinjertos de ADRr *in vivo*.

20 En resumen, las muestras se pulverizaron con un criopulverizador (Covaris Inc). Los tumores se almacenaron en bolsas especiales (pesadas previamente antes de la adición del tumor) y se colocaron en nitrógeno líquido durante su manipulación. Para los tumores pequeños se añadieron en primer lugar 200 µl de tampón de lisis a la bolsa con el tumor, se congelaron en nitrógeno líquido y después se pulverizaron para mejorar la recuperación del tumor a partir de la bolsa. Los tumores pulverizados se transfirieron a tubos de Eppendorf de 2 ml y se colocaron en nitrógeno líquido hasta que fueron lisados. Los tumores fueron lisados con tampón de lisis complementado con inhibidores de la proteasa y de la fosfatasa. El tampón de lisis se añadió a las alícuotas tumorales a una concentración final de 62,5 mg/ml. Las muestras tumorales fueron homogeneizadas mediante agitación con vórtex durante 30 segundos y se dejaron asentar en hielo durante 30 min. Los lisados fueron rotados durante 10 min en columnas Qiashredder de Qiagen para una homogeneización adicional de las muestras. Los lisados clarificados se colocaron en alícuotas en tubos nuevos.

25 El ensayo de BCA se realizó según se establece en la sección de materiales y procedimientos, *supra*.

30 Los niveles totales de la ErbB3 se determinaron mediante ELISA. Los reactivos del ELISA fueron adquiridos en R&D Systems como kits Duoset. Se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc Maxisorb con 50 µl del respectivo anticuerpo de captura y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente las placas se lavaron 3 veces con 1000 µl/pocillo en un lavador de placas BioTek con PBST (0,05% de Tween-20) y después se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con un 2% de BSA en PBS. Después las placas se lavaron 3 veces con 1000 µl/pocillo en el lavador de placas BioTek con PBST (0,05% de Tween-20). Los lisados (50 µl) y los estándares se diluyeron en un 50% de tampón de lisis y en un 1% de BSA; todas las muestras se analizaron por duplicado. Las placas se incubaron durante 2 horas a 4°C en un agitador de placas y se lavaron tres veces con 1000 µl/pocillo en un lavador de placas BioTek con PBST (0,05% de Tween-20). Se diluyeron cincuenta microlitros de anticuerpo de detección en un 2% de BSA, se añadió PBST y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 1000 µl/pocillo en el lavador de placas BioTek con PBST (0,05% de Tween-20). Se añadieron aproximadamente cincuenta microlitros de estreptavidina-HRP y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo 3 veces con 1000 µl/pocillo en un lavador de placas BioTek con PBST (0,05% de Tween-20). Se añadieron cincuenta microlitros de sustrato Supersignal Pico ELISA y la lectura se realizó usando un lector de placas Fusion. Los datos fueron analizados mediante el uso de EXCEL. Las muestras por duplicado se promediaron y las barras de error representan la desviación estándar entre los dos replicados.

35 Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 8. Según se muestra en la Figura 8, el Ab #6 reguló por disminución la ErbB3 en xenoinjertos de ADRr *in vivo*.

55 **Ejemplo 6: inhibición de la proliferación de las células tumorales**

La capacidad del Ab #6 para inhibir la proliferación celular de células que expresan la ErbB3 (por ejemplo, células cancerosas) se examinó como sigue.

60 Se sembraron células MALME3M, ACHN y NCI/ADRr en placas de cultivo tisular de 96 pocillos y se hicieron crecer en medio RPMI-1640 complementado con antibióticos, L-glutamina 2 mM y un 10% de suero bovino fetal (FBS) durante 24 horas a 37 grados Celsius y con un 5% de dióxido de carbono. Después el medio se cambió por medio RPMI-1640 con antibióticos, L-glutamina 2 mM y con y sin el anticuerpo a las concentraciones de 1 µM, 250 nM, 63 nM, 16 nM, 4,0 nM, 1,0 nM, 240 pM, 61 pM y 15 pM. Las células se hicieron crecer en durante 96 horas a 37°C y con un 5% de dióxido de carbono, después se recogieron con el ensayo de viabilidad celular luminescente CellTiter-Glo®

(Promega, G7573) y se analizaron con un luminómetro. El medio que no contenía suero ni anticuerpo se usó como control.

Según se muestra en las Figuras 9, 10 y 11, el Ab #6 inhibió la proliferación de las células MALME-3M (Figura 9), de las células de cáncer de ovario ADRr (Figura 10) y de las células ACHN (Figura 11) que expresan la ErbB3. Específicamente, el Ab # 6 inhibió la proliferación de las células MALME-3M en aproximadamente el 19,6%, según se midió mediante el uso del ensayo Cell Titer Glow, e inhibió la proliferación de las células de cáncer de ovario ADRr en aproximadamente el 30,5%. También, según se muestra en la Figura 11, el Ab # 6 inhibió la proliferación de las células ACHN en aproximadamente el 25,4%.

Ejemplo 7: inhibición de la fosforilación de la ErbB3 en células tumorales

La capacidad del Ab #6 para inhibir la fosforilación de la ErbB3 *in vivo* se examinó como sigue.

Las muestras se pulverizaron usando la técnica descrita en el Ejemplo 5 *supra*, con respecto a la Figura 8. Se realizó el ensayo de BCA según se establece en la sección de materiales y procedimientos, *supra*, y el ensayo de ELISA se realizó según se describió en el Ejemplo 5 *supra*, con respecto a la Figura 8.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 12. Según se muestra en la Figura 12, el Ab #6 inhibió significativamente la fosforilación de la mErbB3 en xenoinjertos ováricos de ADRr *in vivo*, según se midió por la cantidad de ErbB3 fosforilada (pErbB3) en ng/mg de proteína total.

También se examinó la capacidad del Ab #6 para inhibir la fosforilación de la ErbB3 inducida por betacelulina (BTC) o por herregulina (HRG), como sigue.

Las células ováricas de ADRr se preincubaron con Ab #6 durante 30 minutos antes de su estimulación con BTC 50 mM, HRG 10 mM o TGF- α 333 nM. Después de la preincubación, se eliminó el medio y las células se estimularon durante 5 minutos a 37°C, y un 5% de CO₂ con BTC 50 nM o TGF- α 333 nM (para PE498). También se usaron controles de HRG (5 minutos, 5 nM), un 10% de suero y un 0% de suero. Las células se lavaron con 1 X de PBS frío y se lisaron con 30 μ l de tampón de lisis frío (tampón M-PER más vanadato sódico (NaVO₄, Sigma), 2-glicerofosfato, óxido de fenilarsina, BpV e inhibidores de la proteasa) mediante su incubación en hielo durante 30 minutos. Los lisados se almacenaron durante una noche a -80°C.

Según se muestra en las Figuras 13A - 13C, el Ab #6 inhibió significativamente la fosforilación mediada tanto por betacelulina como por herregulina de la ErbB3.

En un experimento adicional se examinó la capacidad del Ab #6 para inhibir la fosforilación de la ErbB3 en las líneas celulares de tumor de ovario OVCAR 5 y OVCAR 8, como sigue.

Las líneas celulares OVCAR 5 y OVCAR 8 se obtuvieron del National Cancer Institute, Division of Cancer Treatment and Diagnostics ("DCTD"). El ELISA se realizó según se describió en la sección de materiales y procedimientos, *supra*.

Los resultados de este experimento están representados en las Figuras 14A y 14B. Según se representa en las Figuras 14A y 14B, el Ab #6 inhibió la fosforilación de la ErbB3 en ambas líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR 5 y OVCAR 8.

Según se analizó anteriormente, el Ab #6 inhibe la fosforilación mediada por betacelulina de la ErbB3. Con objeto de investigar si la fosforilación mediada por betacelulina de la ErbB3 se produce hasta la ErbB1 o la ErbB3, se realizó el siguiente experimento.

Se preincubaron células ADRr o células MALME-3M (1×10^5) con Ab # 6 anti-ErbB3 25 mM o Erbitux 25 mM (como control) en 50 ml de tampón de tinción BD durante 30 minutos en hielo. Después de 30 minutos se añadieron 50 μ l de BTC biotinilada 400 nM a las células y se incubaron durante otros 30 minutos en hielo. Esto dio una concentración final de anticuerpos de 12,5 μ M y de BTC 200 nM. Después las células se lavaron dos veces con 500 μ l de tampón de tinción BD y se incubaron con 100 μ l de una dilución 1:200 de estreptavidina-PE (PE = ficocitrina) (Invitrogen) en tampón de tinción BD durante 45 minutos. Finalmente, las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en 300 μ l de tampón de tinción BD y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur. Como control positivo se incubaron 1×10^5 de células ADRr o MALME-3M con BTC 200 nM durante 30 minutos en hielo, se lavaron dos veces y se incubaron con una dilución 1:200 de estreptavidina-PE durante 45 minutos. Para evaluar la tinción de fondo del conjugado de estreptavidina-PE, las células se incubaron con 100 μ l de una dilución 1:200 sólo de estreptavidina-PE durante 45 minutos.

Los resultados de este experimento están representados en las Figuras 15A - 15C. Según se muestra en la Figura 15A, la betacelulina (BTC) no muestra ninguna unión apreciable a las células MALME-3M negativas para ErbB1. Sin

embargo, según se representa en las Figuras 15B y 15C, la BTC sí muestra una unión a las células ADRr positivas para ErbB1.

También, según se muestra en las Figuras 15B y 15C, esta unión fue bloqueada por Erbitux, que es un anticuerpo anti-EGFR que se une específicamente al EGFR y que fue incluido como control para demostrar que los ligandos de tipo EGF se unen al EGFR, y que se describe, por ejemplo, en Adams y col. (2005), Nature Biotechnology 23, 1147 - 1157.

Ejemplo 8: inhibición de la señalización mediada por herregulina en células tumorales

La capacidad del Ab # 6 para inhibir la señalización mediada por herregulina en células tumorales se investigó como sigue.

Se sembraron células MALME-3M en placas de cultivo tisular de 96 pocillos y se hicieron crecer en medio RPMI-1640 complementado con antibióticos, L-glutamina 2 mM y un 10% de suero bovino fetal (FBS) durante 24 horas a 37°C y con un 5% de dióxido de carbono. A las células se les privó de suero con medio RPMI-1640 con antibióticos y L-glutamina 2 mM durante 24 horas a 37°C y con un 5% de dióxido de carbono. Las células se pretrataron con y sin el anticuerpo anti-ErbB3 (isotipo IgG2 del Ab #6) a unas concentraciones de 1 µM, 250 nM, 63 nM, 16 nM, 4,0 nM, 1,0 nM, 240 pM y 61 pM durante 30 minutos, y después se estimularon con HRG1-beta1-ECD durante 10 minutos a 37°C y con un 5% de dióxido de carbono. Las células se lavaron con PBS frío y después se recogieron con tampón de lisis de extracto proteico de mamífero (MPER) (Pierce, 78505) que contenía NaCl 150 mM, pirofosfato sódico 5 mM, bpV 10 µM (fen), fenalarsina 50 mM, ortovanadato sódico 1 mM y un cóctel inhibidor de proteasas (Sigma, P714). Los lisados celulares se diluyeron dos veces con un 4% de albúmina sérica bovina en disolución salina tamponada con fosfato con un 0,1% de tween-20, y después se analizaron mediante ELISA para comprobar la fosforilación del AKT (un efector secuencia debajo de la ErbB3) y de la ErbB3.

Con objeto de ensayar la fosforilación del AKT, los lisados se analizaron en una placa de ELISA con un anticuerpo de captura específico para el anticuerpo AKT y una anticuerpo específico de detección biotinilado contra el sitio de fosforilación de la serina 473 del AKT. La señal se generó con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante reaccionada con un sustrato quimioluminiscente (Pierce, 37070). Con objeto de ensayar la fosforilación de la ErbB3, los lisados se analizaron en una placa de ELISA con un anticuerpo de captura específico para la ErbB3 y un anticuerpo de detección anti-fosfotirosina conjugado con peroxidasa de rábano picante. Después esto se hizo reaccionar con el sustrato quimioluminiscente (Pierce, 37070). Los ELISAs se visualizaron usando un luminómetro.

Según se muestra en las Figuras 16A y 16B, el Ab #6 era un potente inhibidor de la señalización mediada por herregulina en células MALME-3M, según se midió mediante la disminución en la fosforilación de la ErbB3 (Figura 16A) y del AKT (Figura 16B). Notablemente, el Ab #6 inhibió la fosforilación del AKT en prácticamente el 100%.

Ejemplo 9: inhibición del crecimiento tumoral ovárico, prostático y pancreático

Para evaluar la eficacia del Ab #6 *in vivo*, se establecieron varios modelos de xenoinjertos de cánceres humanos en ratones lampiños y la inhibición del crecimiento tumoral se evaluó con múltiples dosis. Por ejemplo, se adquirieron ratones nu/nu deficientes en linfocitos T (ratones hembra de 3 - 4 semanas de edad originados en NIH; no consanguíneos; de fondo albino) en Charles River Labs (Wilmington, MA) para los estudios con xenoinjertos. Las células ADRr para implantación se hicieron crecer en cultivo (medio RPMI, 10% de FBS, L-glutamina y antibióticos, 37°C, 5% de CO₂) hasta una confluencia de aproximadamente el 85% antes de recogerlas. Las células se mantuvieron en hielo hasta su implantación. A los ratones fueron se les implantaron mediante inyección subcutánea 100 µl de células ADRr en el costado derecho y se dejaron recuperar mientras eran monitorizados para controlar el crecimiento tumoral inicial.

Los tumores se midieron (longitud por ancho) con un calibre digital, y a los ratones se les inyectó por vía intravenosa IgG2a (Sigma, M7769-5MG). A los ratones se les inyectó intraperitonealmente cada tres días con 30 µg o con 300 µg de Ab #6 y los tumores se midieron tres veces por semana y se registraron en una hoja de cálculo de Microsoft EXCEL.

Se realizaron las mediciones finales de los tumores (L x W), los ratones fueron sacrificados mediante asfixia con CO₂ y los tumores fueron extirpados, congelados al instante en nitrógeno líquido, y almacenados a -80°C (para su análisis bioquímico). Las mediciones finales de los tumores se analizaron y representaron gráficamente por área tumoral y volumen tumoral según se describe en Burtrum y col., *supra*. Los datos también se analizaron según las medias "normalizadas" y "no normalizadas" tanto para el volumen tumoral como para el área tumoral. Para la "normalización" de los datos, en cada punto temporal de medición, cada tumor de cada grupo fue dividido según el tamaño inicial del tumor determinado mediante una medición con un calibre.

Los datos procedentes de tres modelos diferentes derivados de líneas celulares tumorales humanas, ADRr (de ovario), Du145 (de próstata) y OvCAR8 (de ovario) se muestran en las Figuras 17A-C y Colo357. El estudio con

xenoinjertos se muestra en la Figura 17D. Los datos de estos tres estudios demostraron que una dosis de 300 µg del Ab #6 cada tres días (Q3d) da como resultado una inhibición significativa del crecimiento tumoral ($p < 0,05$ para múltiples puntos temporales durante los estudios). Además, este efecto inhibitorio del Ab #6 se evaluó adicionalmente cuando se incrementó la dosis hasta 600 µg, Q3d, en el modelo de cáncer de próstata de Du145 así como un modelo de xenoinjerto de carcinoma renal y pancreático (ACHN y COLO357). Sin embargo, una elevación adicional de la dosis hasta 1500 µg Q3d no dio como resultado un aumento en la eficacia (OvCAR8 - Figura 17; COLO357) lo que sugiere que los 600 µg son saturantes con respecto a la inhibición del crecimiento tumoral. Los análisis farmacocinéticos (PK) del suero procedente de los animales de estos estudios demostraron un aumento dependiente de la dosis en la retención en suero del Ab #6. De forma análoga, los análisis bioquímicos de los niveles intratumorales del Ab #6 de estos diferentes estudios mostraron un intervalo dependiente de la dosis desde 0 hasta ~6 pg de MM121/mg de lisado tumoral total (datos no mostrados).

Ejemplo 10: inhibición de la unión de los ligandos de la ErbB3 a la ErbB3 en células tumorales

En un experimento adicional se investigó la especificidad de los anticuerpos de la invención para inhibir la unión de los ligandos de la ErbB3 a la ErbB3, y no de los ligandos de tipo EGF al EGFR, como sigue.

En un experimento se investigó la especificidad del Ab #6 y de una versión del Fab del Ab #3 (Ab/Fab #3) para inhibir la unión de los ligandos de la ErbB3 (por ejemplo, herregulina y epirregulina) a la ErbB3.

Con objeto de investigar la capacidad del Ab #6 y del Ab/Fab #3 para inhibir la unión de la herregulina a la ErbB3, se llevó a cabo el siguiente experimento.

Las células ADRr (1×10^5) se incubaron con 10 µM de un anticuerpo anti-ErbB3 (por ejemplo, de Ab #6 o de Ab/Fab #3) en 50 µl de tampón de tinción BD durante 30 minutos en hielo. Después de 30 minutos, se añadieron 50 µl de herregulina EGF 40 nM biotinilada a las células y se incubaron durante otros 10 minutos en hielo. Esto dio una concentración final de 5 µM de anticuerpo y 20 nM de herregulina EGF. Las células se lavaron después dos veces con 500 µl de tampón de tinción BD y se incubaron con 100 µl de una dilución 1:200 de estreptavidina-PE (PE = ficoeritrina) (Invitrogen) en tampón de tinción BD durante 45 minutos. Finalmente, las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en 300 µl de tampón de tinción BD y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur. Como control positivo se incubaron 1×10^5 células ADRr con herregulina EGF 20 nM durante 10 minutos en hielo, se lavaron dos veces y se incubaron con una dilución 1:200 de estreptavidina-PE durante 45 minutos. Con objeto de evaluar la tinción de fondo del conjugado de estreptavidina-PE, se incubaron 1×10^5 células ADRr con 100 µl de una dilución 1:200 de sólo estreptavidina-PE durante 45 minutos.

Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 18A y 18B. Según se representa en las Figuras 18A y 18B, tanto el Ab #6 como el Ab/Fab #3 eran capaces de inhibir la unión de la herregulina a la ErbB3.

De forma análoga, se examinó la capacidad del Ab #6 para inhibir la unión de otro ligando de la ErbB3, la epirregulina, a la ErbB3, como sigue.

Las células ADRr (1×10^5) se preincubaron con 25 µM de Ab #6 o con 25 µM de Erbitux (como control) en 50 µl de tampón de tinción BD durante 30 minutos en hielo. Después de 30 minutos, se añadieron a las células 50 µl de Epi 2 µM biotinilada y se incubaron durante otros 30 minutos en hielo. Esto dio una concentración final de 12,5 µM de anticuerpos y 1 µM de Epi. Después las células se lavaron veces con 500 µl de tampón de tinción BD y se incubaron con 100 µl de una dilución 1:200 de estreptavidina-PE (PE = ficoeritrina) (Invitrogen) en tampón de tinción BD durante 45 minutos. Finalmente, las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en 300 µl de tampón de tinción BD y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur. Como control positivo se incubaron 1×10^5 células ADRr con 1 µM de Epi durante 30 minutos en hielo, se lavaron dos veces y se incubaron con una dilución 1:200 de estreptavidina-PE durante 45 minutos. Con objeto de evaluar la tinción de fondo del conjugado de estreptavidina-PE, se incubaron las células con 100 µl de una dilución 1:200 de sólo estreptavidina-PE durante 45 minutos.

Los resultados de este experimento se representan en las Figuras 19A y 19B. Según se muestra en la Figura 19A, la epirregulina se une a las células ADRr positivas en ErbB3. Además, según se muestra en la Figura 19B, es también inhibida tanto por Erbitux como por el Ab #6, lo que sugiere que la que epirregulina puede unirse tanto al EGFR como al ErbB3.

Se realizó un experimento adicional para investigar si el Ab #6 es capaz de inhibir la unión de un ligando de tipo EGF (por ejemplo, HB-EGF) a las células tumorales.

Las células ADRr (1×10^5) se preincubaron con 25 µM de Ab #6 o con 25 µM de Erbitux (como control) en 50 µl de tampón de tinción BD durante 30 minutos en hielo. Después de 30 minutos, se añadieron a las células 50 µl de HB-EGF 400 nM biotinilado y se incubaron durante otros 30 minutos en hielo. Esto dio una concentración final de 12,5 µM de anticuerpos y 200 nM de HB-EGF. Después las células se lavaron veces con 500 µl de tampón de tinción BD

y se incubaron con 100 μ l de una dilución 1:200 de estreptavidina-PE (PE = ficoeritrina) (Invitrogen) en tampón de tinción BD durante 45 minutos. Finalmente, las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en 300 μ l de tampón de tinción BD y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur. Como control positivo se incubaron 1 x 10⁵ células ADRr con HB-EGF 200 nM durante 30 minutos en hielo, se lavaron dos veces y se incubaron con una dilución 1:200 de estreptavidina-PE durante 45 minutos. Con objeto de evaluar la tinción de fondo del conjugado de estreptavidina-PE, se incubaron las células con 100 μ l de una dilución 1:200 de sólo estreptavidina-PE durante 45 minutos.

Según se muestra en las Figuras 20A y 20B, el HB-EGF se une a la ErbB de las células ADRr y el Ab #6 no inhibe esta unión, lo que demuestra que el Ab #6 es específico para inhibir la unión de los ligandos de la ErbB3 (por ejemplo, herregulina y eprirregulina) a la ErbB3.

Ejemplo 11: inhibición de la secreción del VEGF en células tumorales

Se examinó la capacidad del Ab #6 para inhibir la secreción del VEGF en células que expresan la ErbB3 (por ejemplo; células cancerosas) usando un ensayo de secreción de VEGF (kit ELISA para el VEGF disponible en R&D Systems, Minneapolis, MN, número de catálogo DY293B). En primer lugar se analizó la capacidad del Ab #6 para inhibir la secreción del VEGF en las células MCF-7, T47D, y COLO-357 no tratadas y tratadas con HRG-beta1. Estos estudios revelaron que las COLO-357 secretaron una mayor cantidad de VEGF al medio. Como estas células también tenían unos niveles muy elevados de HRG (datos no mostrados), la adición de la HRG al medio no fue capaz de inducir la secreción adicional de VEGF (Fig. 24A). Por el contrario, la HRG fue capaz de inducir la secreción del VEGF en células MCF-7 y T47D.

El Ab #6 muestra un potente efecto inhibitor a elevados niveles en las tres líneas celulares, siendo el mayor en COLO-357 (Fig. 24A). El Ab #6 también muestra un efecto similar *in vivo* inhibiendo la secreción del VEGF en tres xenoinjertos diferentes, siendo el mayor en el xenoinjerto de COLO-357 (Fig. 24B). La inhibición del VEGF se correlaciona con la inhibición de la fosforilación de la ErbB3 (Fig. 24 C). La inhibición de la secreción del VEGF también se correlaciona con la inhibición de la angiogénesis en las células tumorales. En particular, se ha identificado que los factores secretados por las células de mieloma, tales como el VEGF y el bFGF, desencadenan la angiogénesis (véase, por ejemplo, Leung y col. (1989) Science 246 (4935): 1306 - 9; Yen y col. (2000) Oncogene 19 (31): 3460 - 9).

Ejemplo 12: inhibición de la migración celular

Se examinó la capacidad del Ab #6 para inhibir la migración de las células que expresan la ErbB3 (por ejemplo, células MCF-7) usando un ensayo transpocillo (Millipore Corp., Billerica, MA, número de catálogo ECM552). En primer lugar, a las MCF-7 células se les privó de suero durante una noche y después se incubaron en presencia o en ausencia de Ab #6 (concentración final 8 μ M) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después las células se transfirieron a una cámara superior que está separada de la cámara inferior por una membrana recubierta de colágeno de tipo I a través de la cual pueden migrar las células. Se añadió FBS al 10% al medio de la cámara inferior para que actuara como quimioatractivo en presencia o en ausencia del Ab #6. Las cámaras se incubaron a 37°C durante 16 horas y después las células que habían migrado a través de la membrana se eliminaron usando un tampón de desprendimiento, y se incubaron con un pigmento fluorescente de unión a las células. La fluorescencia se cuantificó usando un lector de placas fluorescentes. La fluorescencia media \pm EEM (n = 2) se muestra en la Figura 25.

Según se muestra en la Figura 25, el FBS al 10% estimula la migración celular (carril 3) en comparación con el control no tratado (carril 1) y el Ab #6 8 M inhibe la migración celular inducida por el FBS (carril 4).

Ejemplo 13: inhibición del crecimiento esférico

Se examinó la capacidad del Ab #6 para inhibir el crecimiento esférico de células que expresan la ErbB3 usando un ensayo que simula las condiciones de desarrollo de un tumor en crecimiento (Herman y col. (2007) Journal of Biomolecular Screening Electronic publication). Los esferoides de ADRr y de DU145 se iniciaron a una frecuencia de 1 esferoide por pocillo en una placa de 96 pocillos usando el método de la gota colgante (Herrman y col., 2008). Entonces los esferoides individuales se trataron con Ab #6 (concentración final 8 μ M), dominio de Herregulina- β 1 EGF (R&D Systems, Minneapolis, MN, número de catálogo 396-HB, concentración final de 3,4 nM), o una combinación de ambos, según se indique. Los diámetros de los esferoides se midieron usando microscopía óptica (objetivo de 10X) en el día 1 y en el día 13.

El Ab #6 inhibe el crecimiento esférico en células ADRr (Fig. 26A). Además, la HRG 3,4 nM estimula el crecimiento esférico y el Ab #6 inhibe el efecto de la HRG (Fig. 26B). Los esferoides derivados de DU145 no aumentaron su tamaño durante los 13 días del experimento, sin embargo, el crecimiento fue significativamente estimulado por la HRG1-beta 1. En estas células, el Ab #6 8 M inhibe el crecimiento esférico inducido por la HRG (Fig. 26C).

Ejemplo 14: inhibición de la señalización

Se examinó la capacidad del Ab #6 para inhibir la señalización inducida por diferentes ligandos. Por ejemplo, se ensayó el efecto del Ab #6 sobre la unión de la HRG y de la BTC a las células ADR que expresan el receptor de la ErbB3. Según se muestra en las Figuras 27A y B, usando un análisis mediante FACS, el Ab #6 compite con la HRG pero no con la BTC por la unión a las células ADR: consecuentemente, el bloqueo por parte del Ab #6 de la unión de la HRG a la ErbB3 impediría la señalización inducida por la HRG.

Adicionalmente, se ensayaron varios ligandos para comprobar la inducción de la fosforilación de la ErbB3. Tres ligandos, HRG, BTC y HGF, fueron capaces de estimular la fosforilación inducida por la ErbB3 en células ADR, mientras que el EGF no pudo. Según se muestra en la Figura 28, el Ab #6 inhibe la fosforilación de la pErbB3 inducida por el HGF en células ADR (Fig. 28). Además, como se sabe en la técnica (véase, por ejemplo, Wallenius y col. (2000) Am J Pathol. 156 (3): 821 - 9 10702398), se ha encontrado un aumento de la señalización por HGF en varios tumores epiteliales y no epiteliales.

Interacción ErbB3/cMET y papel del Ab #6 en la modulación de esta interacción

Se ha demostrado que los cánceres de pulmón de células no microcíticas portadores de mutaciones que activan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) desarrollan resistencia a los inhibidores de las cinasas de tirosinas mediante el reclutamiento de las tirosinas MET y HER3 y activando así la vía de supervivencia celular PI3K-AKT (Engelmann y col. (2007) Science 316: 1039 - 1043; Gou (2007) PNAS: 105 (2): 692 - 697). La asociación entre EGFR y c-MET en las líneas celulares que portan mutaciones activadoras del EGFR ha sido bien establecida mediante co-inmunoprecipitación (Engelmann y col. 2007; Gou 2007). Guo y col. demostraron recientemente que también existen c-MET y ErbB3 en un complejo en una línea celular gástrica MKN45 conocida por ser dependiente de la c-MET amplificada, usando co-inmunoprecipitación.

Esta interacción entre c-MET y erbB3 también se produce en las células ADR portadoras del EGFR natural y no es dependiente de la c-MET amplificada. El HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) induce la fosforilación de la ErbB3 en células ADR de una forma dependiente de la dosis, según se muestra en la Figura 28. Además, el Ab #6 inhibe la fosforilación de la erbB3 inducida por el HGF.

También se ha investigado el efecto de la HRG y de la BTC sobre la fosforilación de la ErbB1 y de la ErbB3, y se ha averiguado que la HRG y la BTC inducen la fosforilación de la ErbB1 y de la ErbB3. Se averiguó que la HRG era un inductor más potente de la fosforilación de la ErbB3, mientras que la BTC era un potente inductor de la fosforilación de la ErbB1 (Fig. 29). Es probable que esta fosforilación esté dirigida por el complejo entre la ErbB1 y la ErbB3. En resumen, la unión de la HRG a la ErbB3 induce la formación de un complejo entre la ErbB1 y la ErbB3, dando lugar a la activación de ambos receptores. Parece probable el mismo fenómeno para la BTC, donde la unión de la BTC a la ErbB1 estimula la formación de un complejo entre la ErbB1 y la ErbB3, dando lugar a la fosforilación de la ErbB1 y de la ErbB3.

Inhibición por anticuerpo de la fosforilación estimulada por ligando (HRG, BTC, EGF y HGF) de la ErbB3.

Se examinó la capacidad del Ab #6 para inhibir la fosforilación inducida por ligando (HRG, BTC, EGF y HGF) de la ErbB3 basándose en el siguiente procedimiento:

1. Se colocaron células ADR en placas de 96 pocillos a una densidad de 30.000 células/pocillo/100 µl en medio RPMI que contenía un 10% de FBS y se dejaron crecer durante una noche;
2. Al día siguiente las células fueron privadas de suero cambiando el medio por medio sin FBS y se dejaron crecer durante una noche;
3. Las células se pretrataron con diferentes concentraciones de Ab #6 (desde 0,01 nM hasta 100 nM) o de tampón (control), durante 2 horas;
4. Después las células fueron estimuladas con HRG y HGF 10 nM durante 10 minutos, o con BTC y EGF 10 nM durante 5 minutos;
5. La reacción se detuvo extrayendo el medio de cultivo y lavando las células una vez con PBS enfriado en hielo;
6. Después las células se lisaron con Tris 25 mM, pH +7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1,0% de Triton X-100, 1,0% de CHAPS, 10% v/v de glicerol, que contenía 1X de inhibidor de la proteasa y 1X de inhibidor de la fosfatasa; y
7. Se midió la fosforilación de la ErbB3 en los lisados celulares usando el kit ELISA de Human Phospho-ErbB3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, número de catálogo DYC1769) según las instrucciones del fabricante.

Inhibición por anticuerpo de la formación del complejo de proteínas ErbB2-ErbB3.

Las células ADR se preincubaron con tampón (control) o con Ab #6 250 nM durante 60 minutos a temperatura ambiente, después se trataron con HRG 10 nM o con BTC 10 nM o con un tampón de control durante 10 minutos. Las células se lisaron con Tris 25 mM, pH +7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1,0% de Triton X-100, 1,0% de CHAPS,

10% v/v de glicerol, que contenía PMSF 0,2 mM, 50 mTU/ml de aprotinina y leupeptina 100 μ M, y el lisado en bruto se centrifugó brevemente para eliminar el material insoluble. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de eppendorf y se añadió el anticuerpo anti-ErbB3 (Santa Cruz sc-285) a una dilución de 1:500. Los sobrenadantes se incubaron durante una noche con agitación suave a 4°C. En primer lugar se lavaron 60 μ l de microesferas de proteína A/G inmovilizada sobre agarosa (Pierce, Rockford, IL, número de catálogo 20421) con 1X de PBS. La mezcla de lisado celular-anticuerpo se añadió a las microesferas lavadas con PBS, y se incubó durante 2 horas con agitación suave a 4°C. Entonces los inmunoprecipitados se lavaron 3 veces con tampón de lisis enfriado en hielo, se resuspendieron en 30 μ l de 2X tampón de muestra en SDS, se desnaturalizaron por calor a 95°C durante 7 minutos y se analizaron en geles Bis-Tris de SDS-PAGE al 4 - 12% y se electrotransferieron a una membrana de PVDF en tampón de Tri-Glicina con un 10% de MeOH. La membrana se bloqueó durante 1 hora en 10 ml de tampón de bloqueo (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, número de catálogo 927-40000) y después se incubó con el anticuerpo anti-ErbB2 a 1:1000 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, número de catálogo 29D8) en 10 ml de tampón de bloqueo (Li-Cor Biosciences, número de catálogo 927-40000). La señal se detectó usando IRDye800 anticonejo de cabra a 1 5000 (2 μ l) en 10 ml de tampón de bloqueo (Li-Cor Biosciences, número de catálogo 927-40000).

15 También se demostró que el Ab #6 inhibía completamente la formación del complejo ErbB2/3 estimulada por la HRG (Fig. 29B).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de unión al antígeno del mismo que se une a la ErbB3 humana y que comprende:
- 5 (a) una región variable de la cadena pesada, donde la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8 y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 9; y
 10 una región variable de la cadena ligera, donde la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 10, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 12; o
 (b) una región variable de la cadena pesada, donde la CDR1, la CDR2 y la CDR3 comprenden unas secuencias de aminoácidos que son idénticas en al menos el 90% a las secuencias de aminoácidos de la CDR1, de la CDR2 y de la CDR3 definidas en (a); y
 15 una región variable de la cadena ligera, donde la CDR1, la CDR2 y la CDR3 comprenden unas secuencias de aminoácidos que son idénticas en al menos el 90% a las secuencias de aminoácidos de la CDR1, de la CDR2 y de la CDR3 definidas en (a), y donde el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo es capaz de inhibir la fosforilación mediada por el ligando de tipo EGF de la ErbB3.
- 20 2. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, donde la CDR1 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7, la CDR2 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8, la CDR3 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 9, la CDR1 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 10, la CDR2 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, y la CDR3 de la
 25 cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 12.
3. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1 o 2, donde la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.
- 30 4. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, donde el ligando de tipo EGF es betacelulina.
5. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 4, que es capaz de inhibir la
 35 fosforilación mediada por betacelulina de la ErbB3 en células AdrR *in vitro*.
6. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo se elige de entre el grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico y un anticuerpo quimérico.
- 40 7. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo se elige de entre el grupo que consiste en un Fab, un Fab'2, un ScFv y un anticuerpo de dominio.
- 45 8. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el isotipo de anticuerpo se elige de entre el grupo que consiste en un anticuerpo de una IgG1, de una IgG2, de una IgG3, de una IgG4, de una IgM, de una IgA1, de una IgA2, de una IgAsec, de una IgD y de una IgE.
- 50 9. Una composición que comprende el anticuerpo o una porción de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en un portador farmacéuticamente aceptable.
10. Una composición de un ácido nucleico aislado que codifica para un anticuerpo humano que se une a la ErbB3 humana según la reivindicación 1, composición que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia
 55 que codifica para una región variable de la cadena pesada, secuencia que es idéntica en al menos el 90% a, o es una secuencia que hibrida en condiciones de alta rigurosidad con, la SEC ID N°: 25, y un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para una región variable de la cadena ligera, secuencia que es idéntica en al menos el 90% a, o es una secuencia que hibrida en condiciones de alta rigurosidad con, la SEC ID N°: 26.
- 60 11. La composición de ácidos nucleicos de la reivindicación 10, en la que la secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable de la cadena pesada comprende la SEC ID N°: 25 y la secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable de la cadena ligera comprende la SEC ID N°: 26.
- 65 12. La composición de ácidos nucleicos de la reivindicación 10 u 11, donde cada ácido nucleico está comprendido en un vector de expresión.

13. Una célula hospedadora que comprende la composición de ácidos nucleicos de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.
- 5 14. Un mamífero transgénico no humano o una planta transgénica que expresa el anticuerpo o una porción de unión al antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
15. Una célula hospedadora que produce un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 10 16. Una célula hospedadora según la reivindicación 15 donde el anticuerpo está codificado por la secuencia de nucleótidos de una región variable de la cadena pesada establecida en la SEC ID N°: 25 y la secuencia de nucleótidos de una región variable de la cadena ligera establecida en la SEC ID N°: 26, y modificaciones conservativas de la secuencia de las mismas.
- 15 17. Un kit que comprende un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, e instrucciones para su uso en el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad asociada con la señalización dependiente de la ErbB3, donde opcionalmente la enfermedad es un cáncer.
- 20 18. Un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un procedimiento para inhibir la fosforilación mediada por ligando de tipo EGF de la ErbB3 o para el tratamiento del cáncer en un sujeto humano.
- 25 19. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso según la reivindicación 18, donde el cáncer es cáncer de páncreas, melanoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, carcinoma renal, cáncer gastrointestinal/de colon, cáncer de pulmón, sarcoma de células claras o cáncer de próstata.
- 30 20. Un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso según la reivindicación 18, donde:
- el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo se administra por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea al sujeto; y/o
 - el anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo se administra junto con un segundo agente terapéutico, donde el segundo agente terapéutico es (a) un segundo anticuerpo antineoplásico; o (b) una molécula antineoplásica pequeña.
- 35
- 40 21. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso según la reivindicación 20, donde el anticuerpo antineoplásico es un anticuerpo anti-IGF1R, un anticuerpo anti-EGFR o un anticuerpo anti-cMet.
- 45 22. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso según la reivindicación 20, donde la pequeña molécula antineoplásica es un antimetabolito, un agente alquilante, un inhibidor de la topoisomerasa, un agente dirigido a los microtúbulos, un inhibidor de la cinasa, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inmunoterapéutico, una hormona o un análogo de la misma, un análogo de somatostatina, un glucocorticoide, un inhibidor de la aromatasa, un inhibidor de la mTOR, una molécula pequeña dirigida al IGF1R o una molécula pequeña dirigida al EGFR.
- 50 23. Un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un procedimiento para diagnosticar un cáncer asociado con la ErbB3 en un sujeto humano, que comprende (a) poner en contacto *ex vivo* o *in vivo* células procedentes del sujeto con dicho anticuerpo o con una porción de unión al antígeno del mismo, y (b) medir el nivel de unión de dicho anticuerpo o porción de unión al antígeno a la ErbB3 en las células, donde unos niveles anormalmente elevados de unión de dicho anticuerpo o porción de unión al antígeno a la ErbB3 indican que el sujeto tiene un cáncer asociado con la ErbB3.

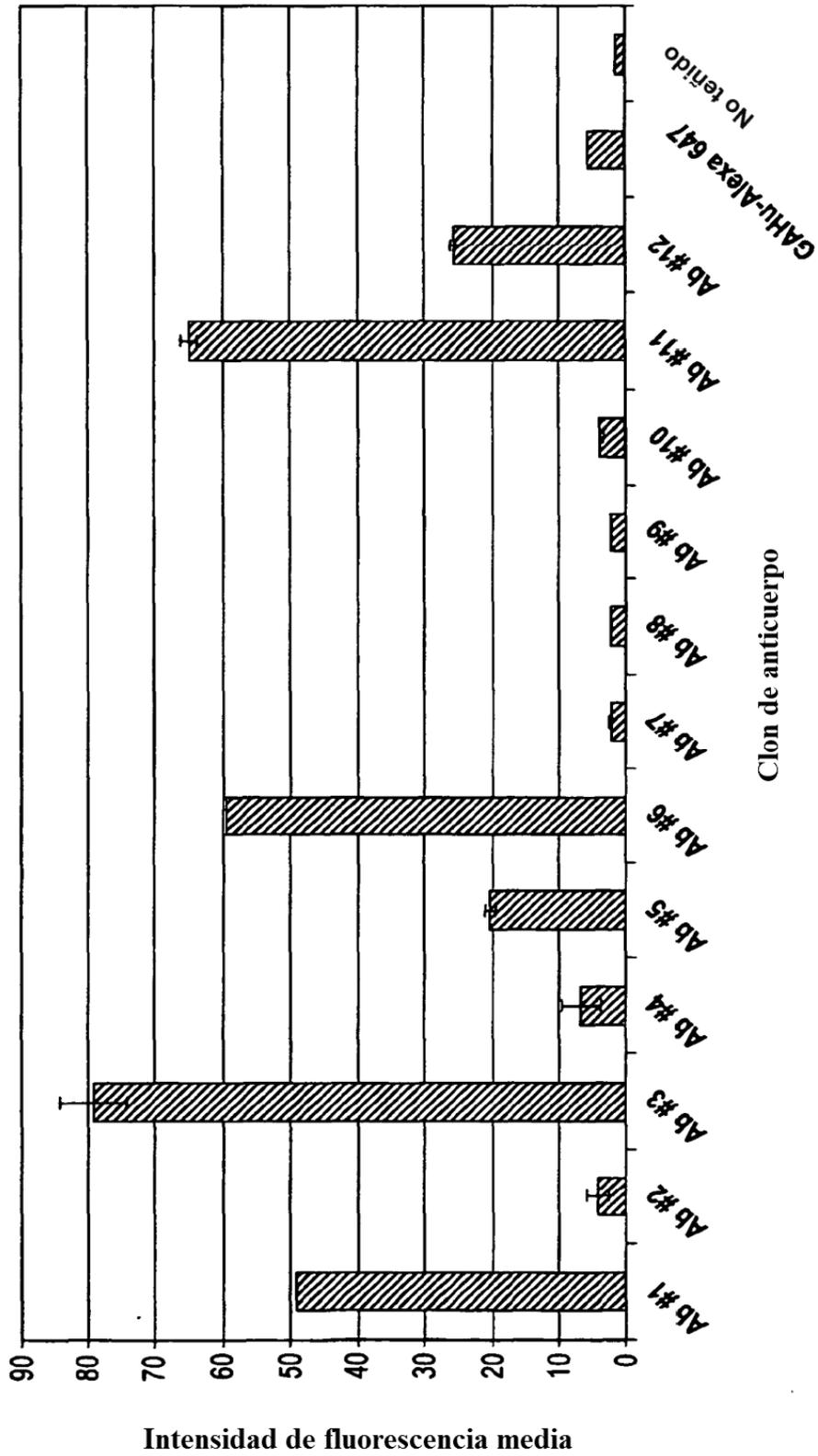


Fig. 1A

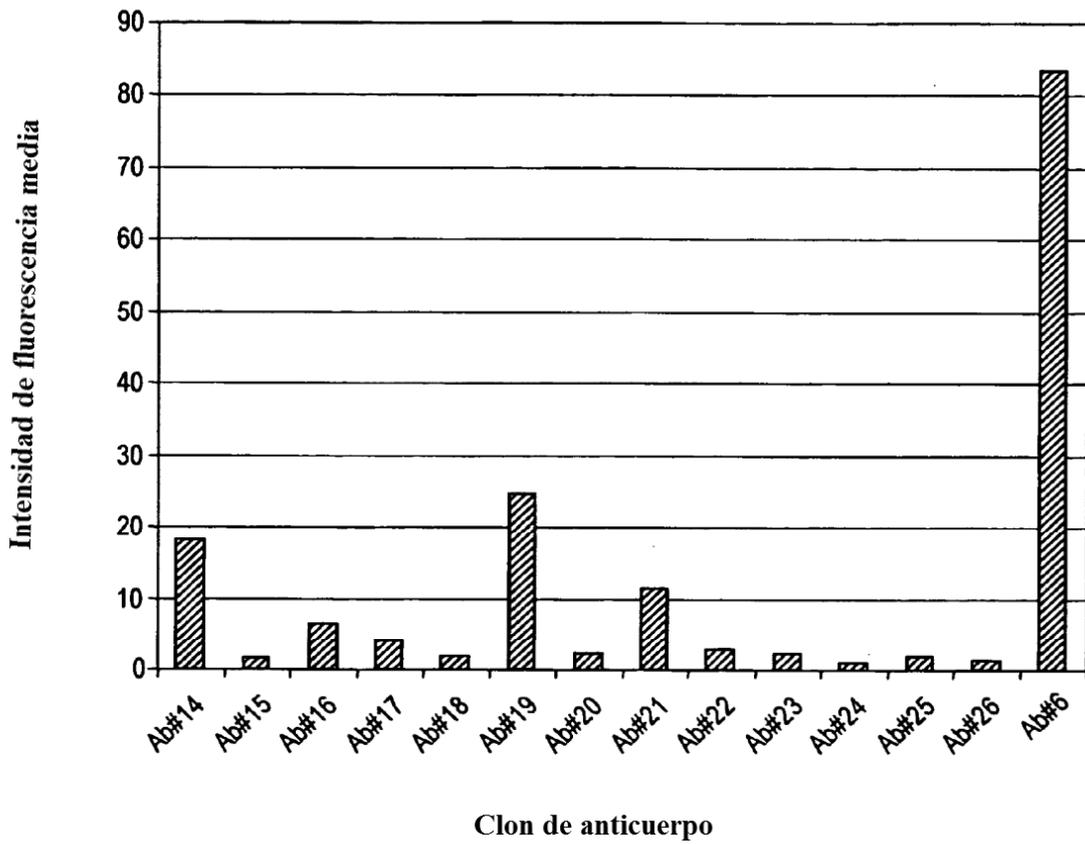


Fig. 1B

Unión de anticuerpos a la ErbB3 medida mediante SPR

$$K_D = k_d/k_a$$

Afinidad

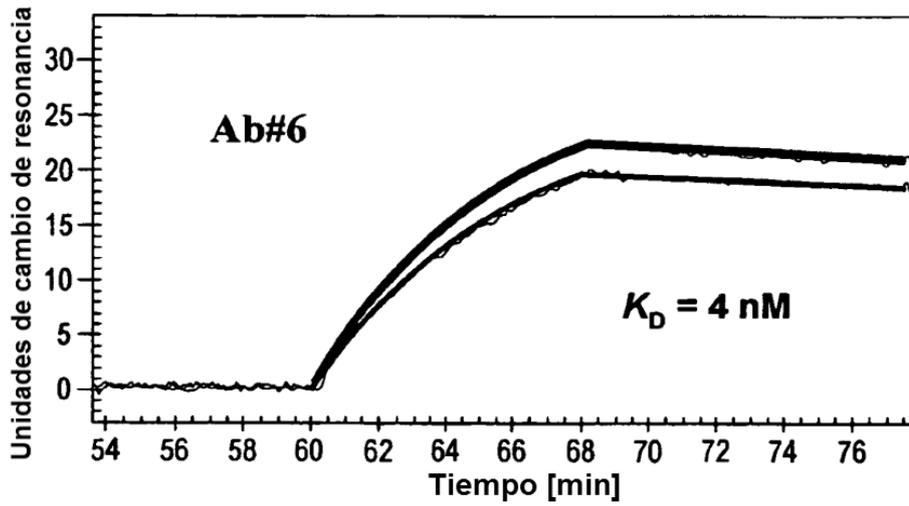


Fig. 2A

Afinidad

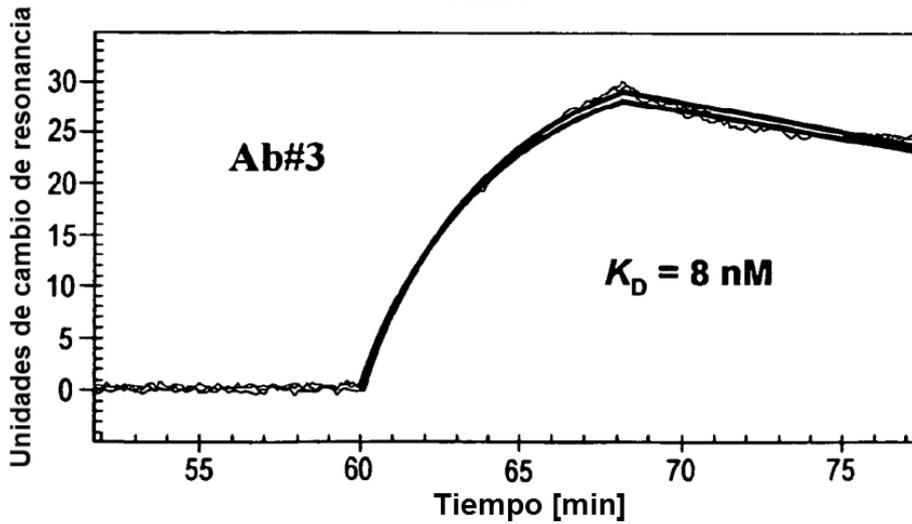


Fig. 2B

Ensayo de unión celular para anticuerpos a células MALME-3M

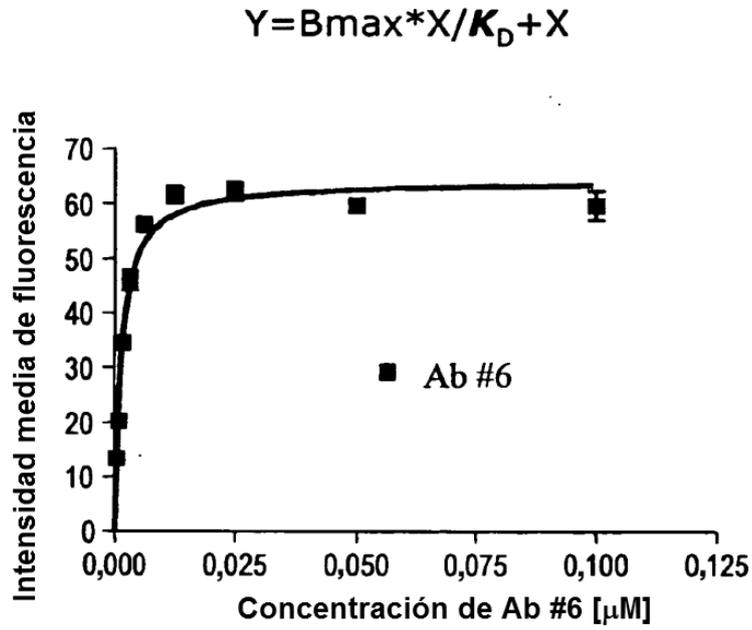


Fig. 2C

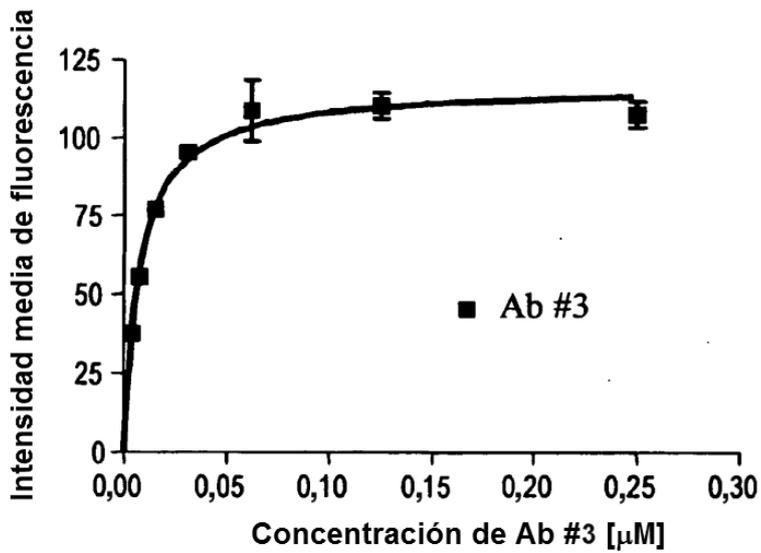


Fig. 2D

La unión Ab #6 a IgG2 es específica para la ErbB3

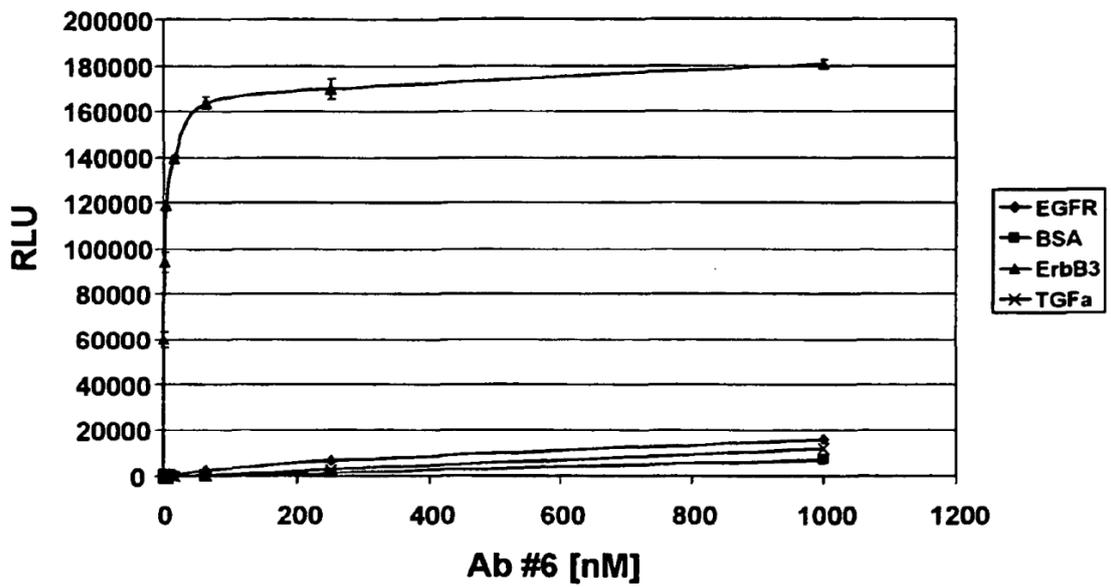


Fig. 3

El anticuerpo #6 provoca una disminución en los niveles totales de ErbB3 en células de melanoma MALME-3M in vitro, medido mediante ELISA.

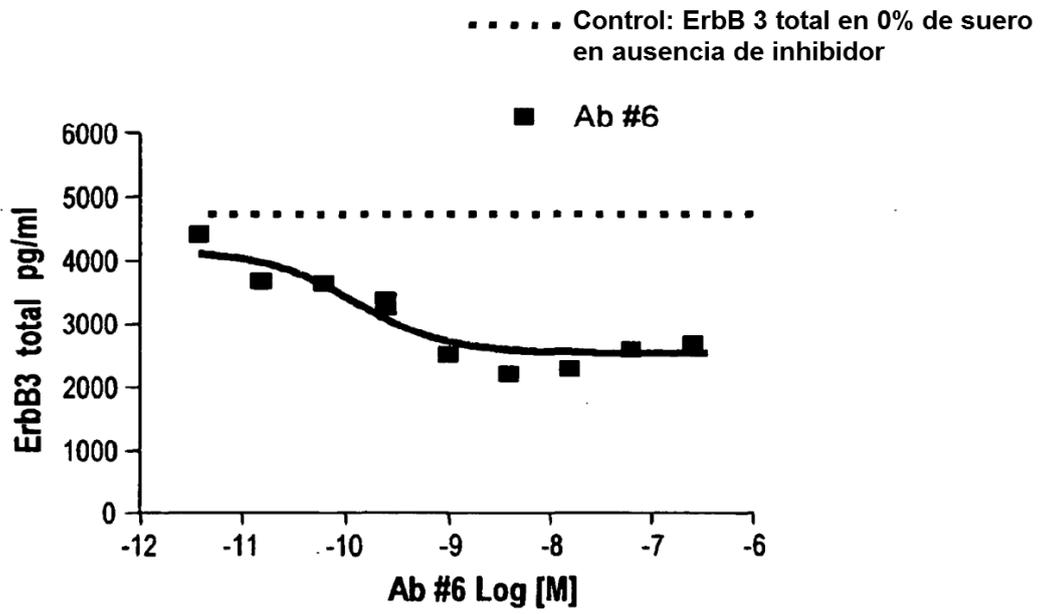


Fig. 4

Regulación por disminución
 los receptores ErbB3 en células
 MALME-3M (melanoma) con IgG1 e IgG2
 del Ab #6 medido mediante FACS.

Regulación por disminución
 los receptores ErbB3 en células
 MALME-3M (melanoma) con IgG1 e IgG2
 del Ab #6 medido mediante FACS.

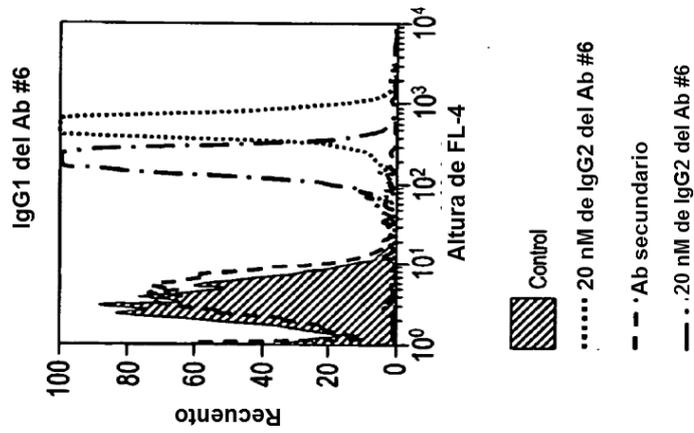
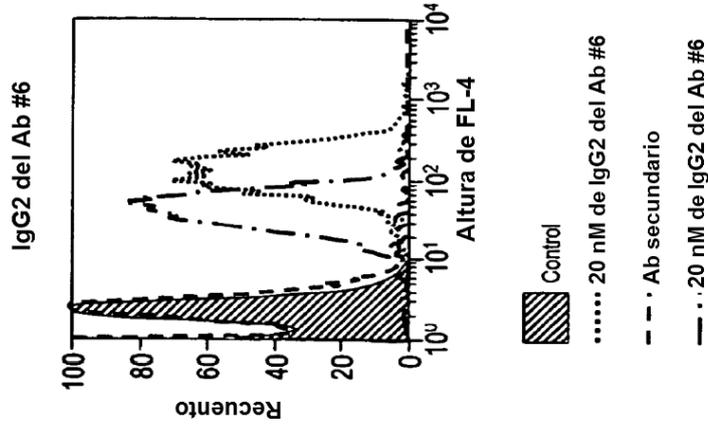


Fig. 5B

Fig. 5A

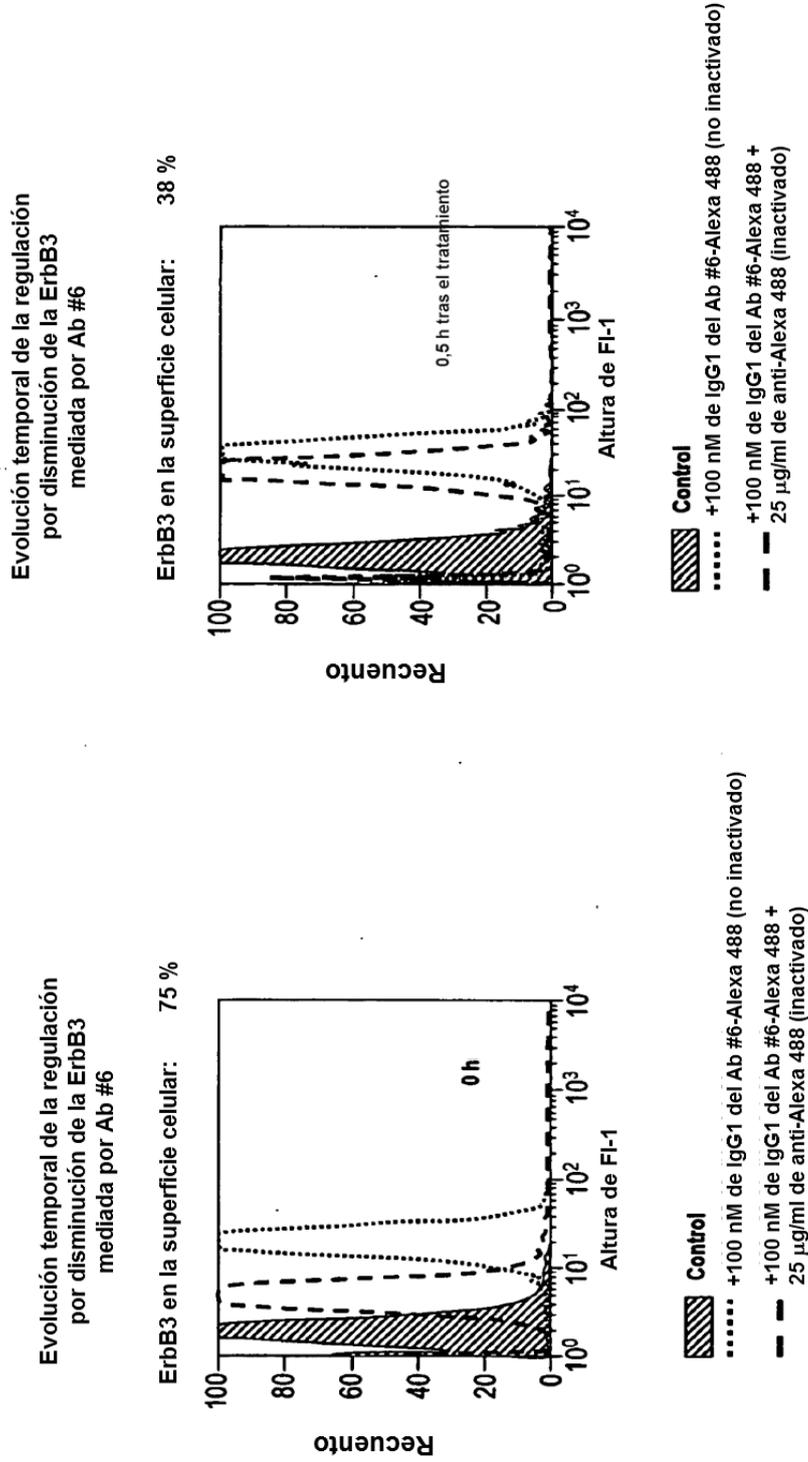
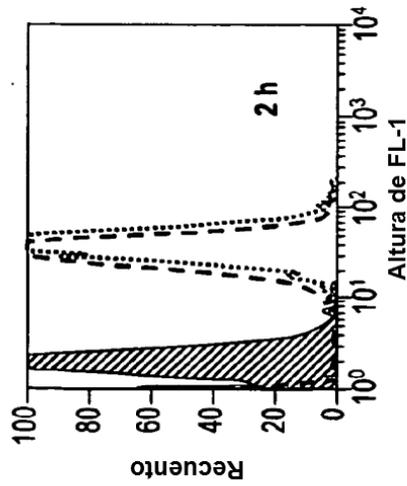


Fig. 6A

Fig. 6B

Evolución temporal de la regulación por disminución de la ErbB3 mediada por Ab #6

ErbB3 en la superficie celular: 18 %

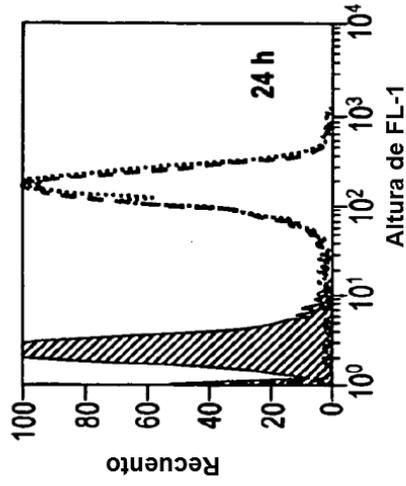


Control
 +100 nM de IgG1 del Ab #6-Alexa 488 (no inactivado)
 --- +100 nM de IgG1 del Ab #6-Alexa 488 + 25 µg/ml de anti-Alexa 488 (inactivado)

Fig. 6C

Evolución temporal de la regulación por disminución de la ErbB3 mediada por Ab #6

ErbB3 en la superficie celular: 5 %



Control
 +100 nM de IgG1 del Ab #6-Alexa 488 (no inactivado)
 --- +100 nM de IgG1 del Ab #6-Alexa 488 + 25 µg/ml de anti-Alexa 488 (inactivado)

Fig. 6D

El Ab #6 provoca la regulación se por disminución de la ErbB3 en células de melanoma *in vivo*

Niveles totales de ErbB3 en MALME-3M PD estudio 24 h tras la inyección

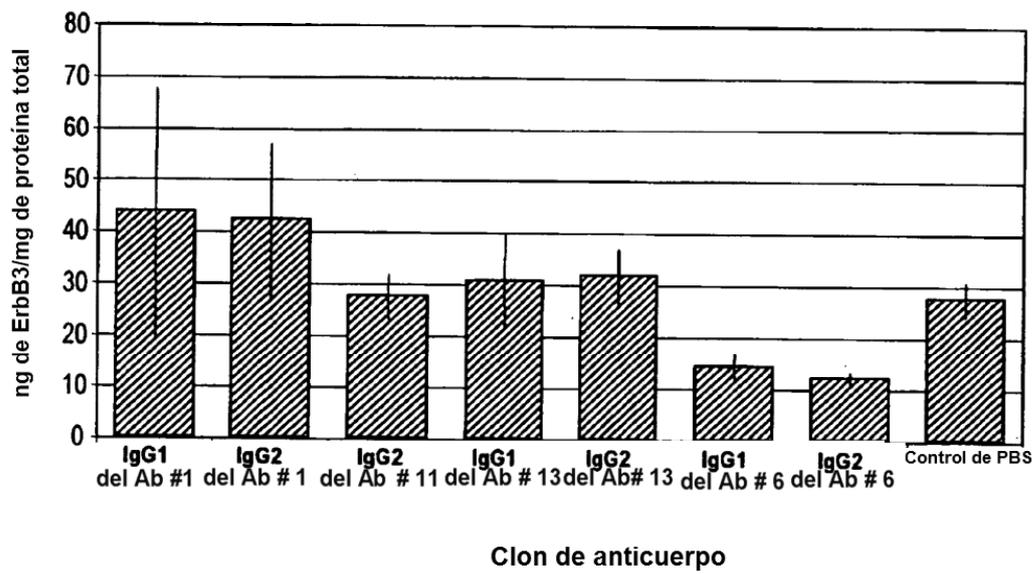
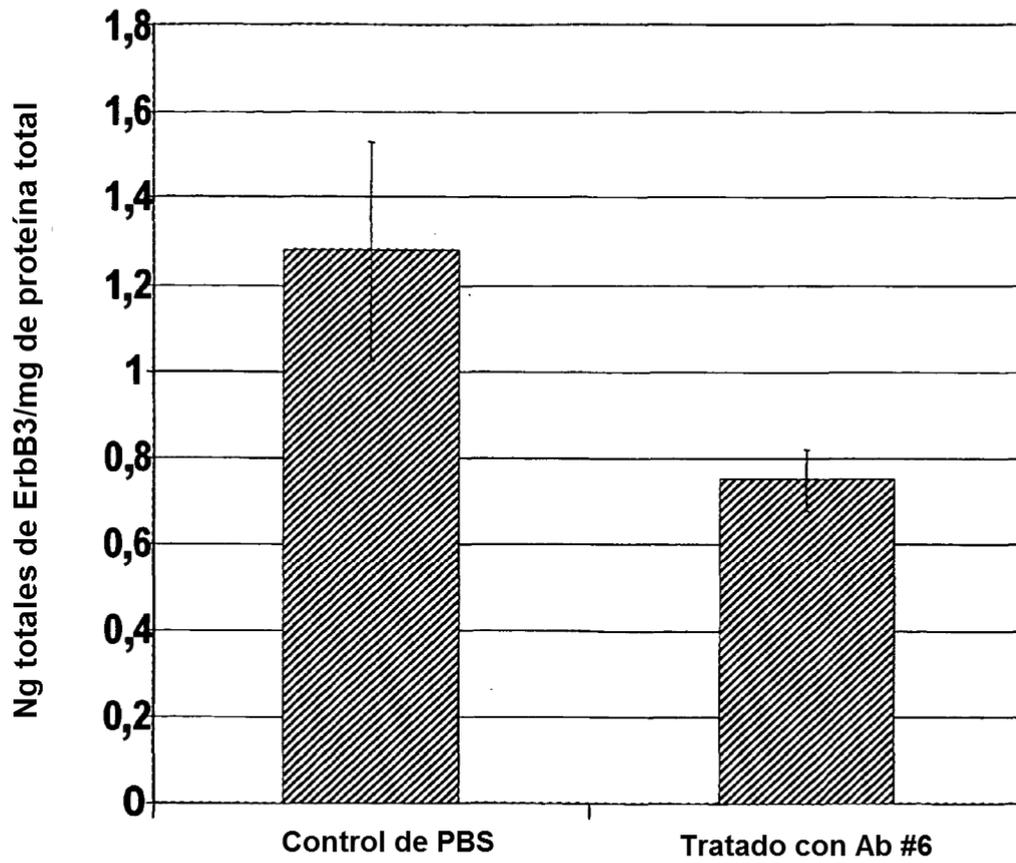


Fig. 7

Niveles totales de ErbB3 en xenoinjertos de ADRr



Tratamiento con anticuerpo

Fig. 8

El Ab #6 inhibe la proliferación en células de melanoma MALME-3M medido mediante un ensayo de Cell Titer Glow

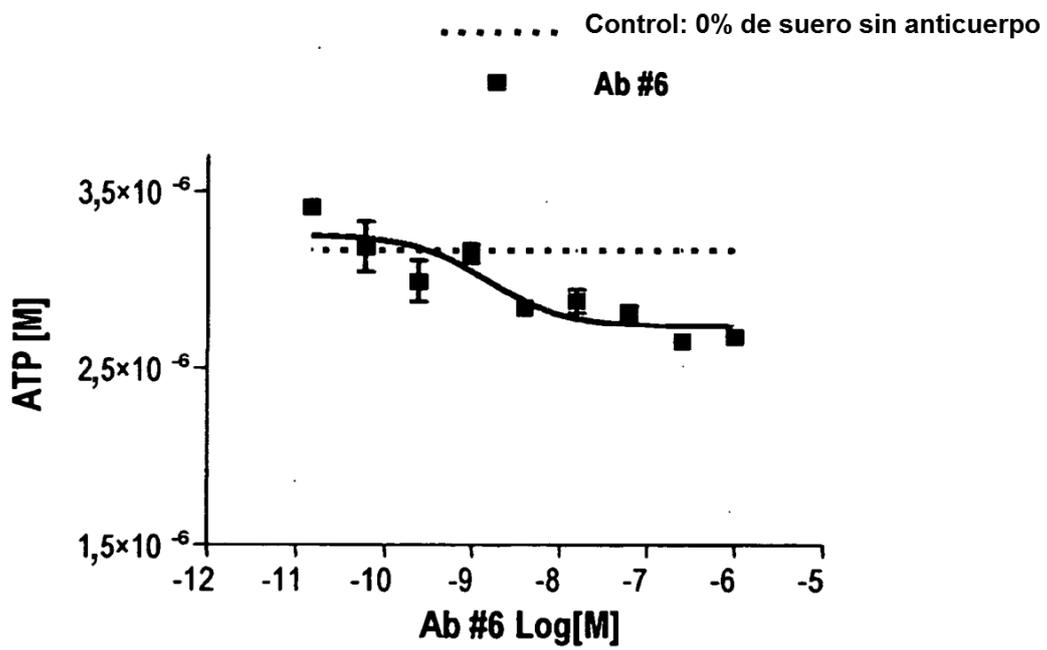


Fig. 9

El Ab #6 inhibe la proliferación celular en una línea celular ADRr (de ovario)

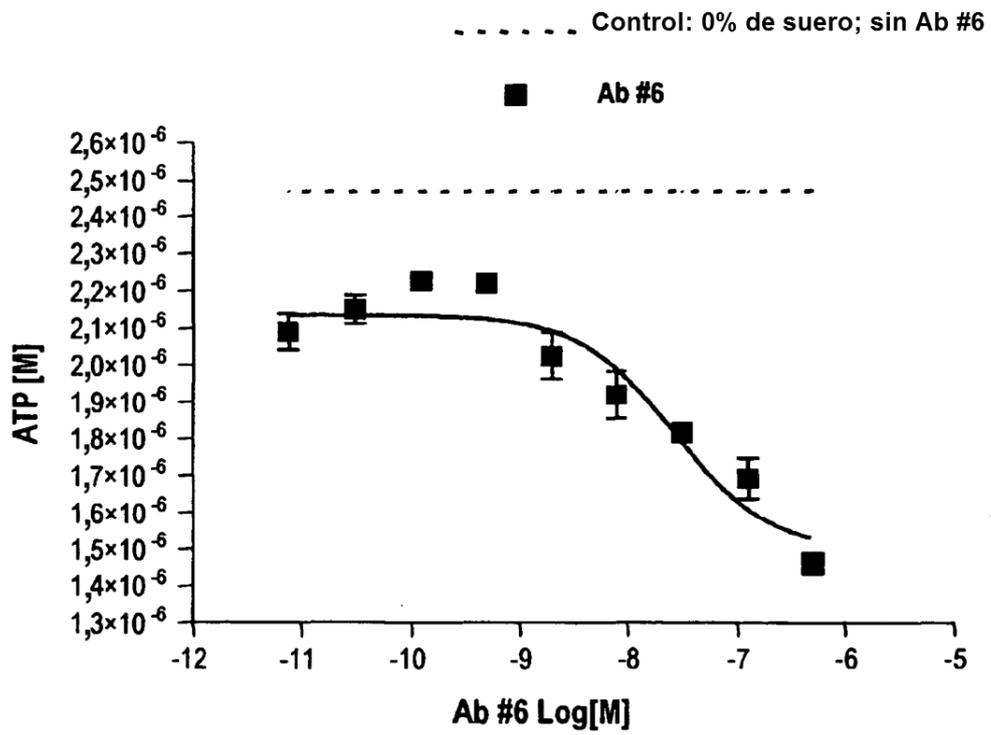


Fig. 10

El Ab #6 inhibe la proliferación en la línea celular ACHN

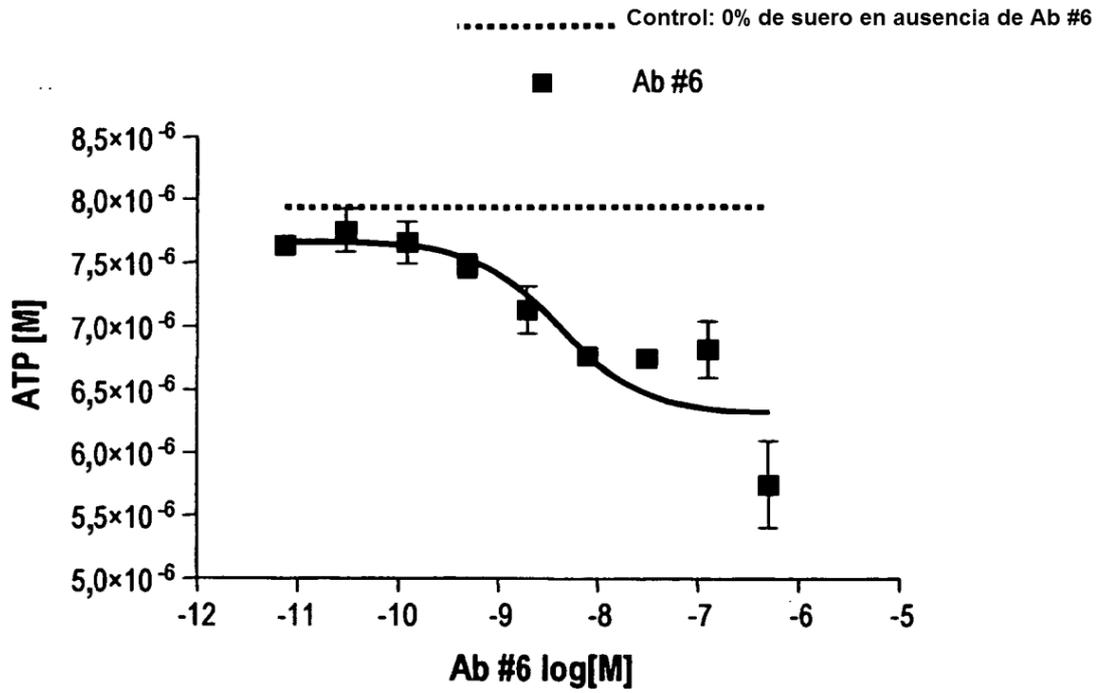


Fig. 11

El Ab #6 inhibe la fosforilación de la ErbB3 en xenoinjertos de ADRr *in vivo*

Niveles de pErbB3 en xenoinjertos de ADRr

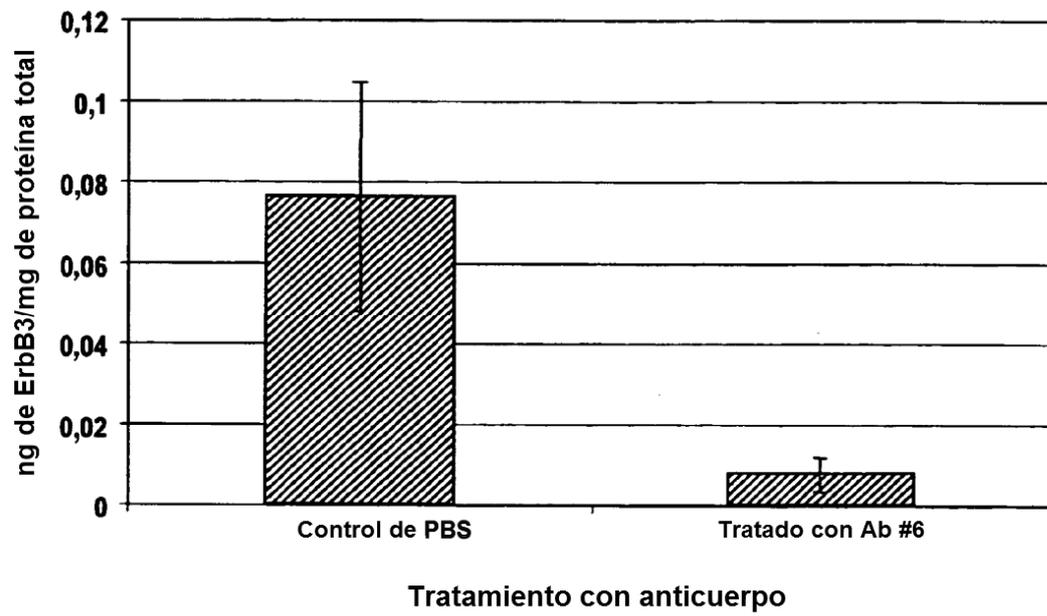


Fig. 12

IgG2 de Ab #6/BTC

CI50	8,37e-10 M
95% CI	5,32e-10 a 1,32e-9

CI50 de Ab #6 en NCI-células ADRr-0% de suero

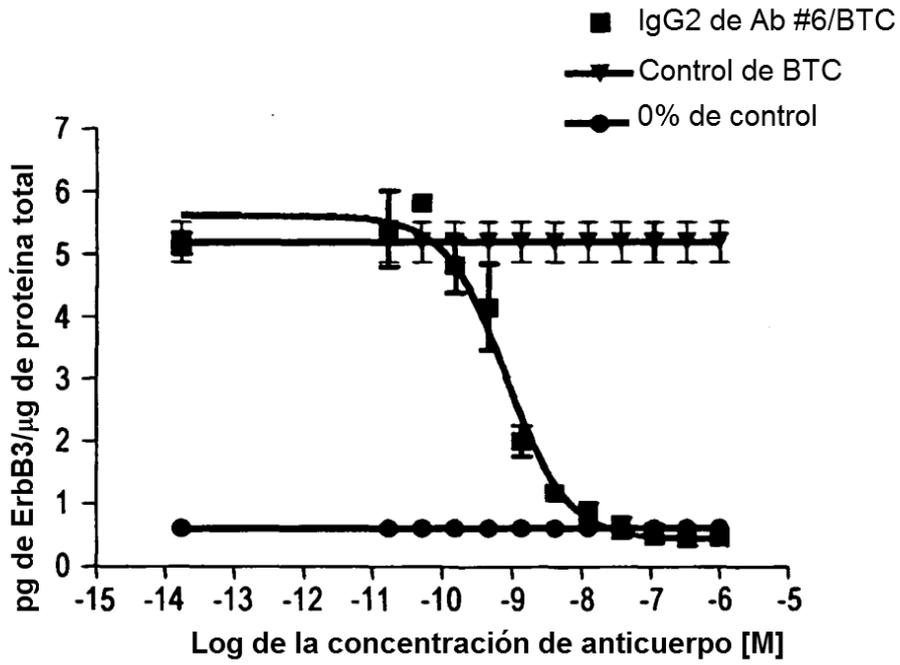


Fig. 13A

IgG2 de Ab #6 en NCI-células ADRr-0% de suero

IgG2 de Ab #6/BTC

CI50	2,488e-009
95% CI	1,051e-009 a 5,889e-009

Ab #6 IgG2 in NCI-ADRr cells-0% serum

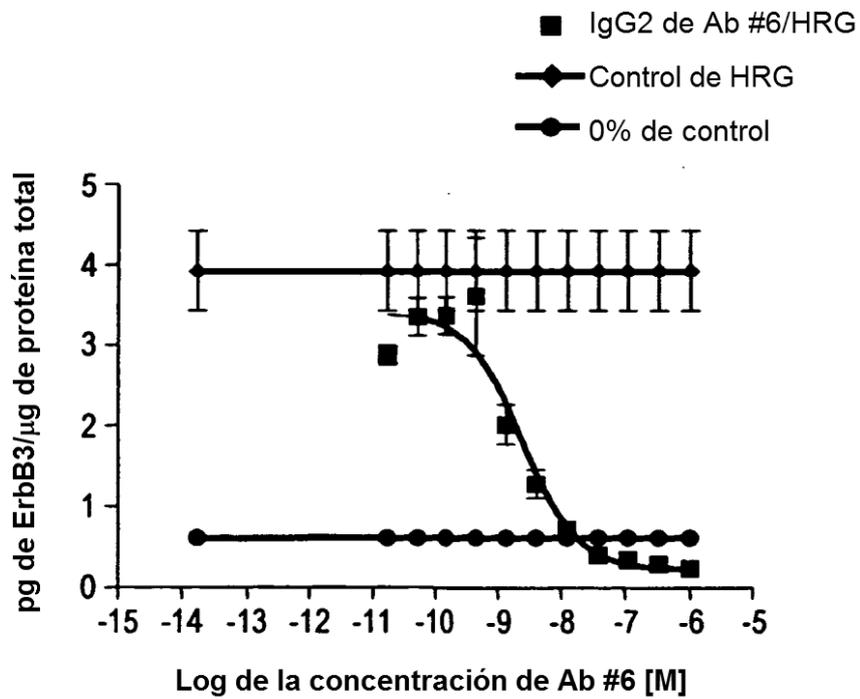


Fig. 13B

IgG2 de Ab #6/TGF- α

CI50	4,901e-009
95% CI	1,965e-009 a 1,222e-008

CI50 de Ab #6 en NCI-células ADRr-0% de suero

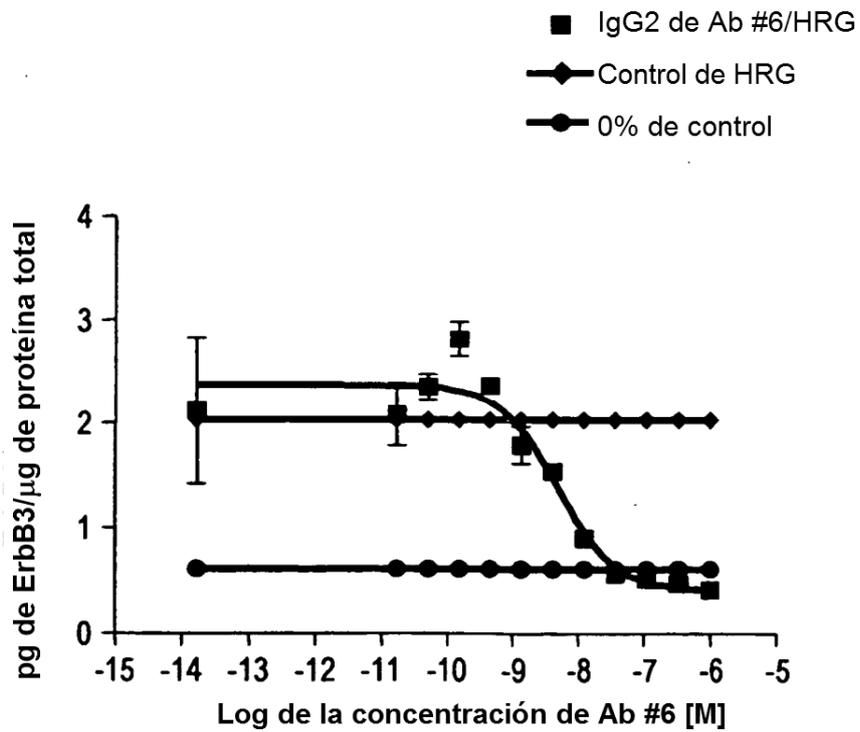
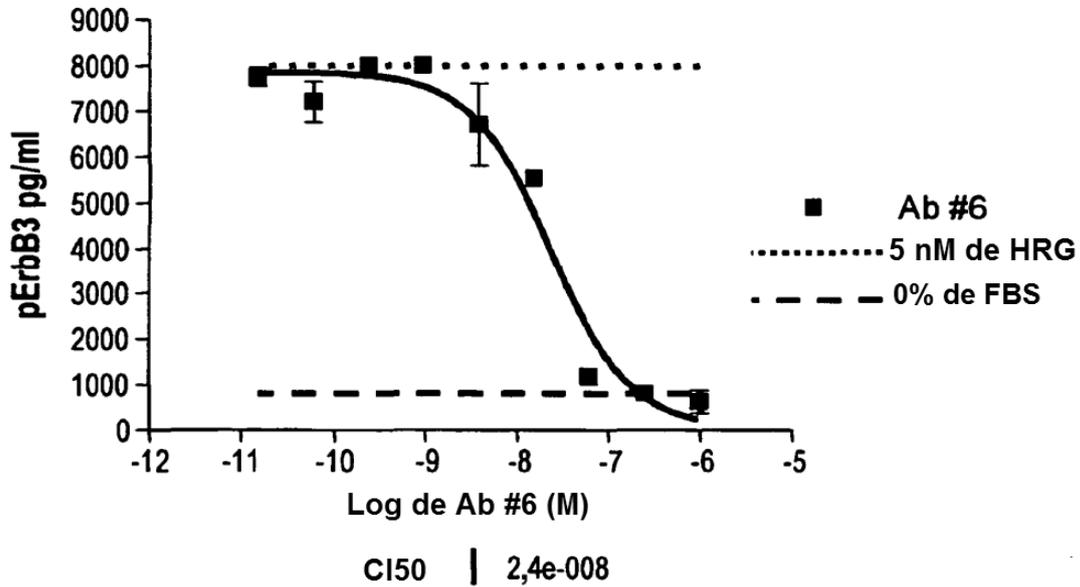


Fig. 13C

Inhibición del IgG2 del Ab #6 de la fosfoErbB3 en OVCAR 5



pg de ErbB3/ml

Fig. 14A

Inhibición del IgG2 del Ab #6 de la fosfoErbB3 en OVCAR 8

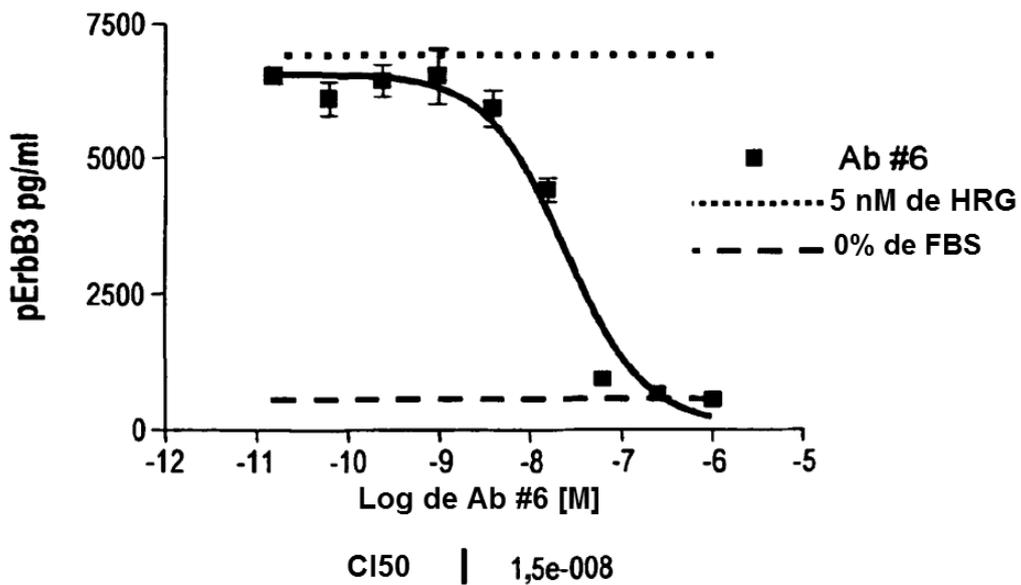


Fig. 14B

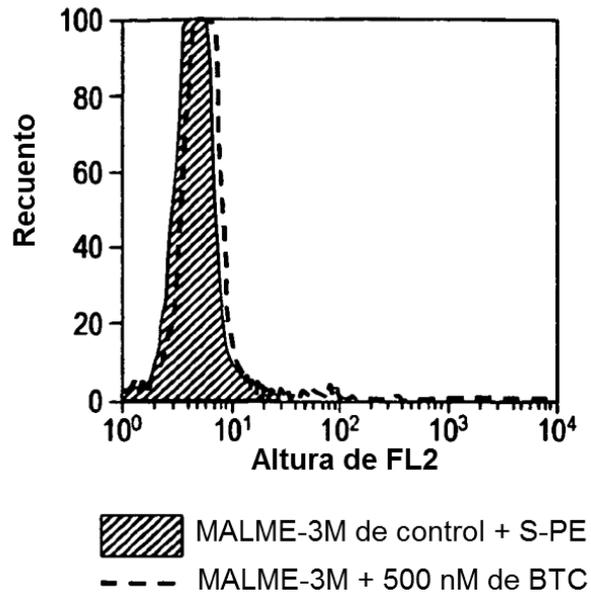


Fig. 15A

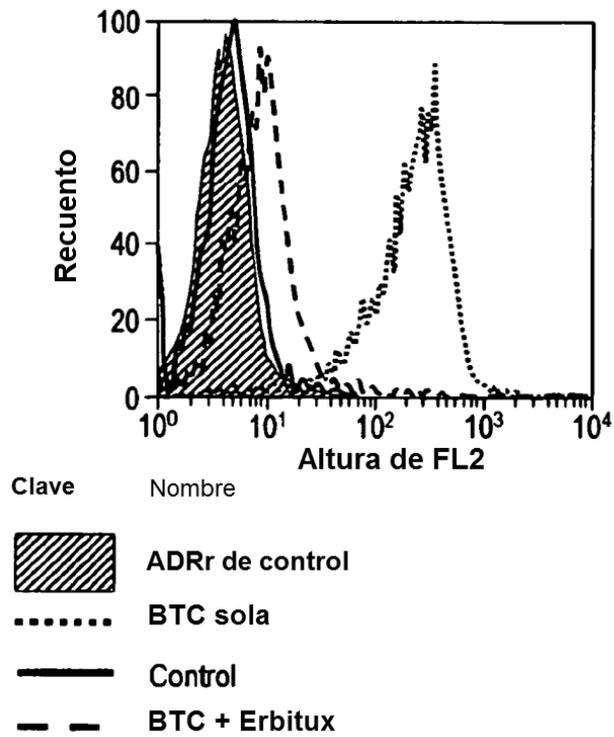


Fig. 15B

Bloqueo de la unión de la BTC por Erbitux pero no Ab #6

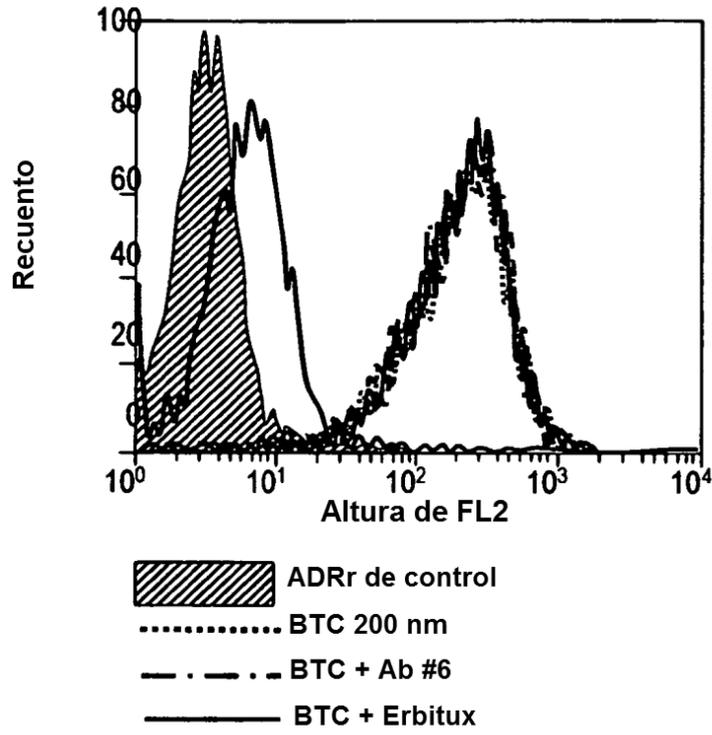


Fig. 15C

El IgG2 del Ab #6 inhibe la señalización mediada por heregulina con CI50 similares en MALME-3M.

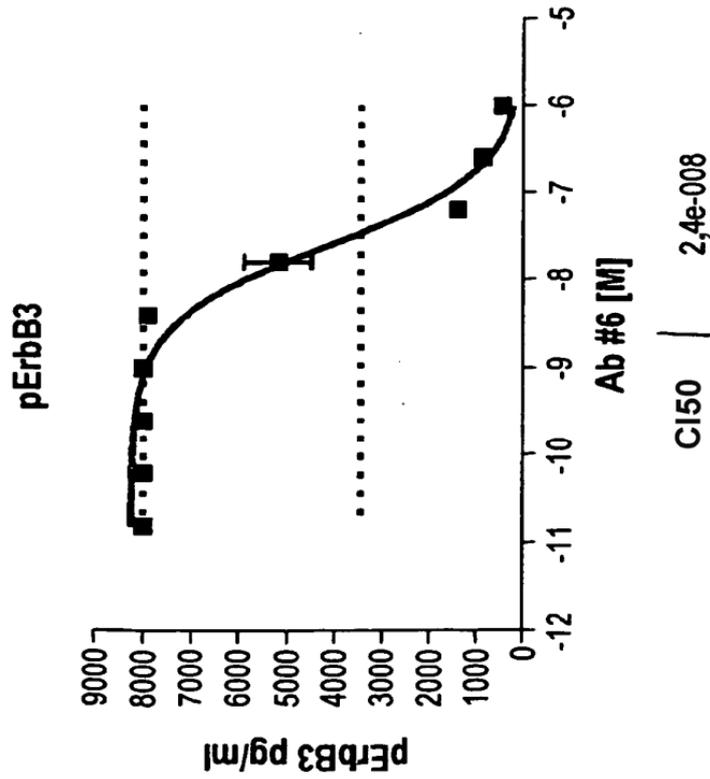


Fig. 16A

El IgG2 del Ab #6 inhibe la señalización mediada por heregulina con CI50 similares en MALME-3M

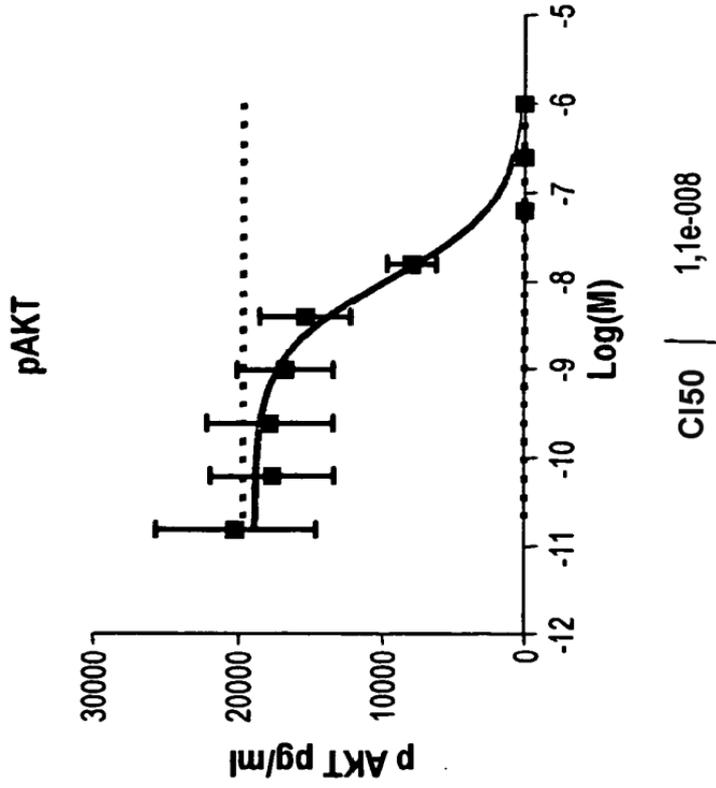


Fig. 16B

Inhibición del crecimiento tumoral del Ab #6

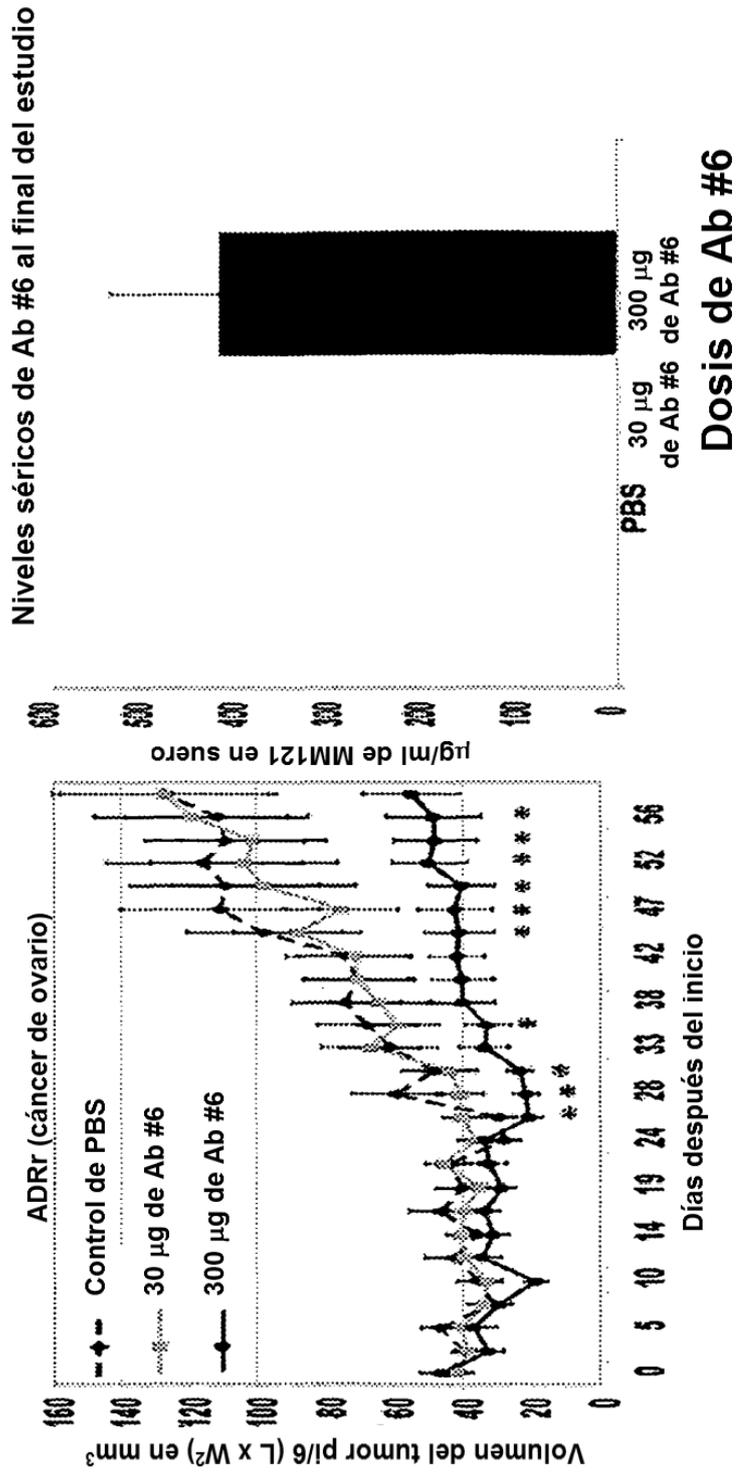


Fig. 17A

Inhibición del crecimiento tumoral del Ab #6

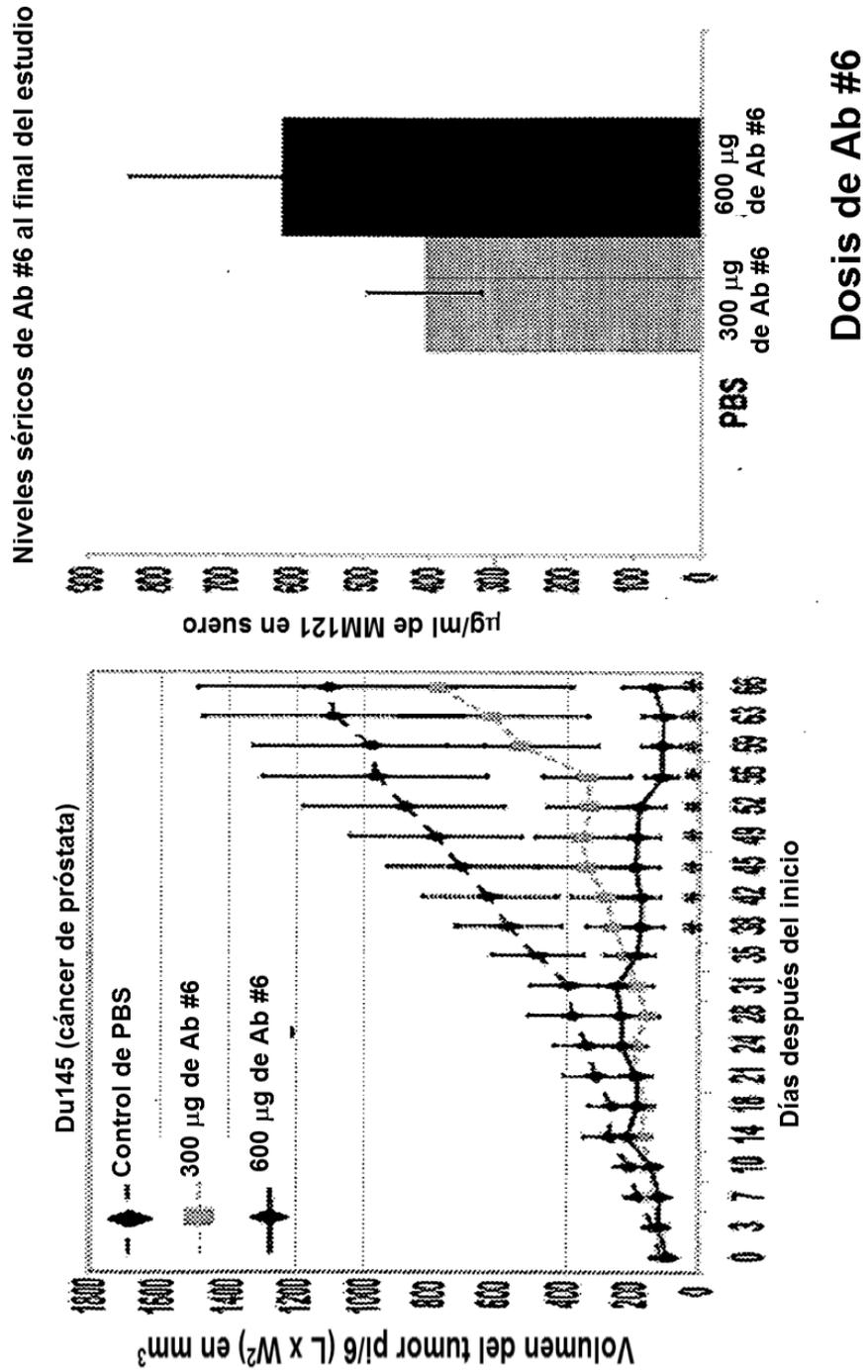


Fig. 17B

*P<0,05

Inhibición del crecimiento tumoral del Ab #6

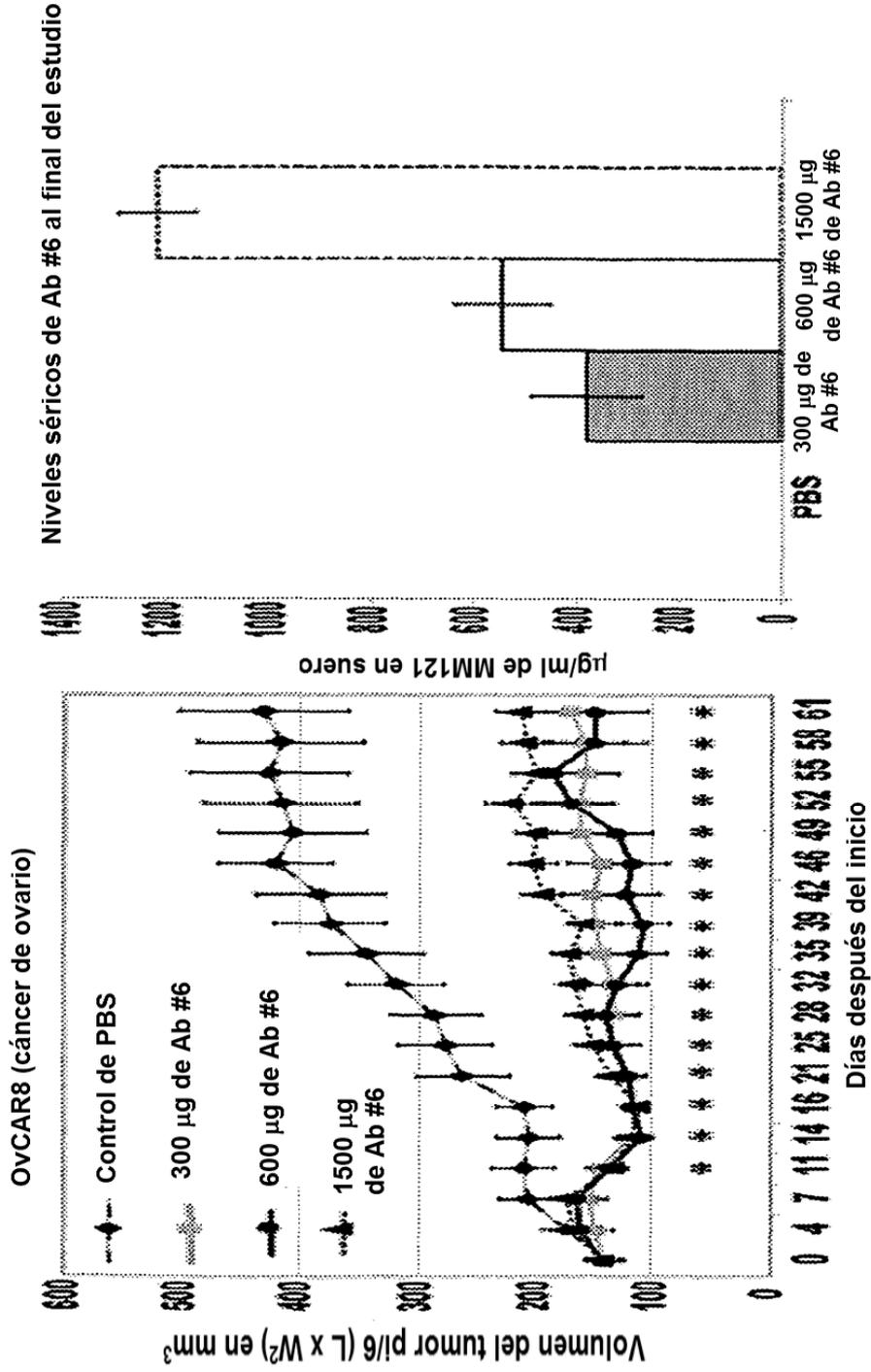


Fig. 17C

*P<0,05

Inhibición del crecimiento tumoral del Ab #6

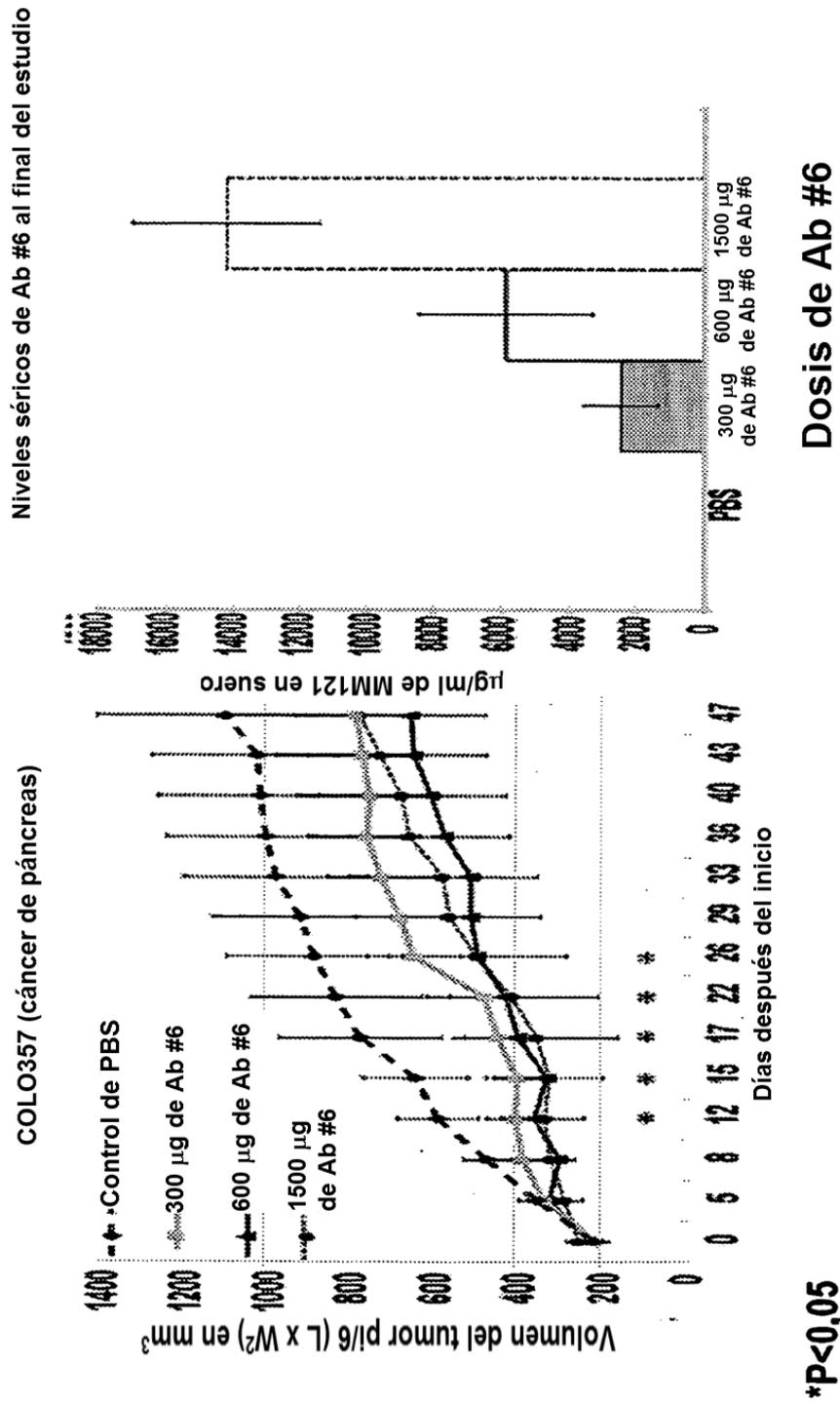


Fig. 17D

Bloqueo de la unión de la HRG a MALME-3 por Ab #6

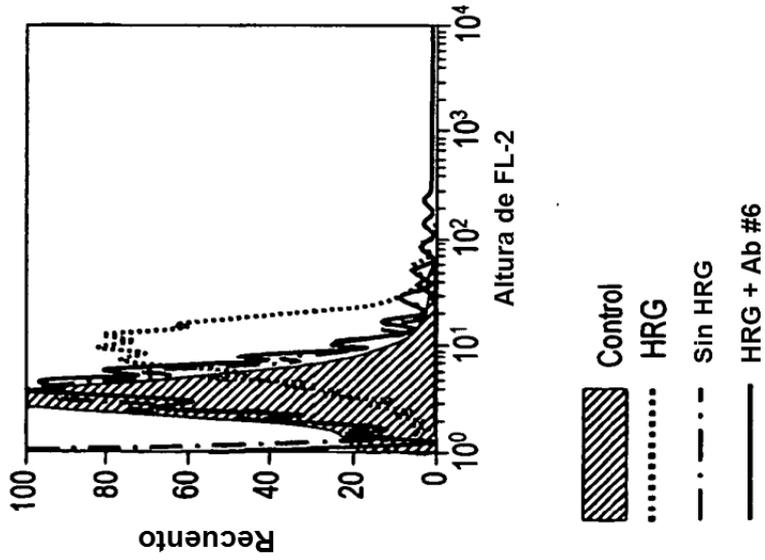


Fig. 18A

Bloqueo de la unión de la HRG a MALME-3 por Ab #3

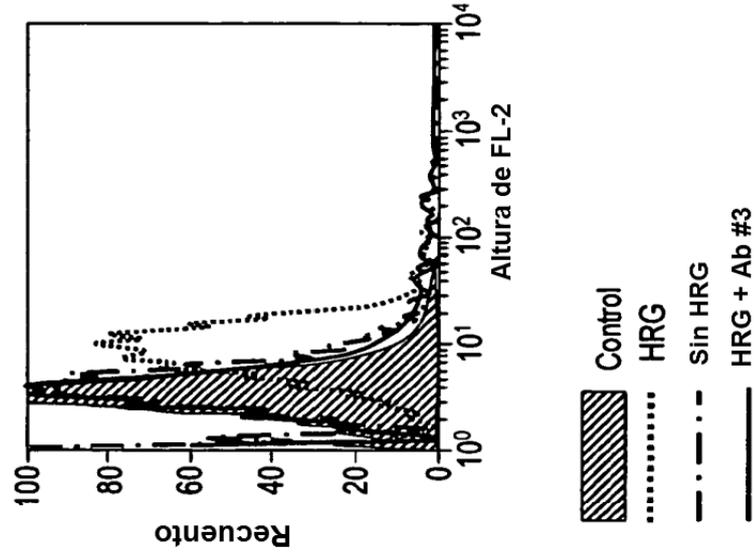


Fig. 18B

Unión de la epirregulina a ADRr

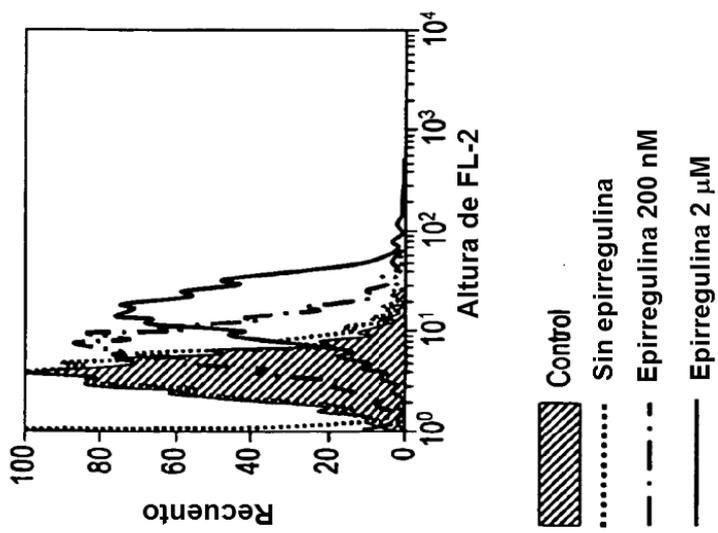


Fig. 19A

Bloqueo de la unión de la epirregulina a ADRr por Ab #6 y Erbitux

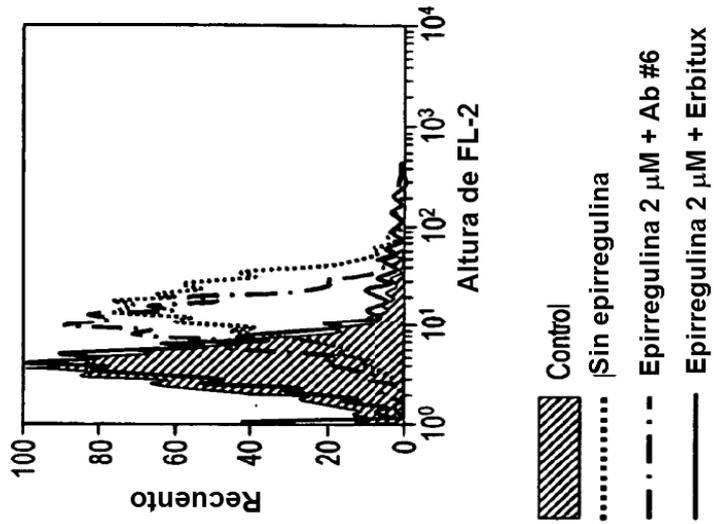


Fig. 19B

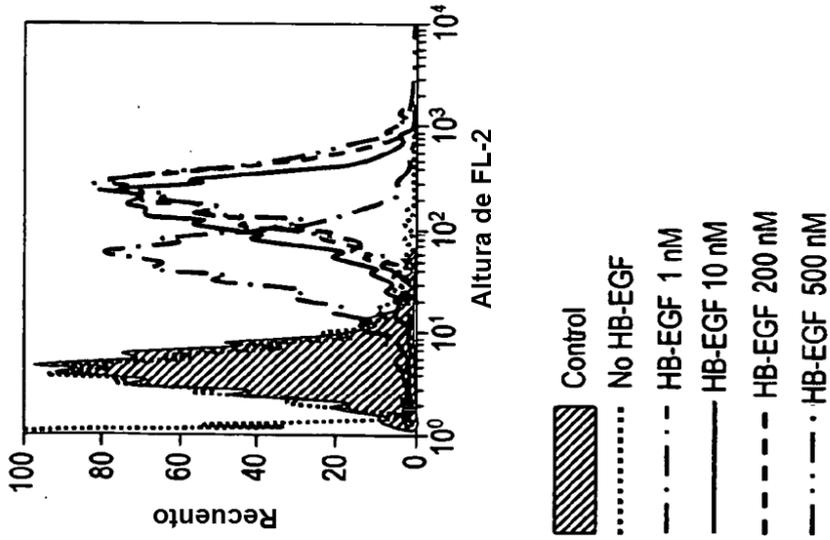
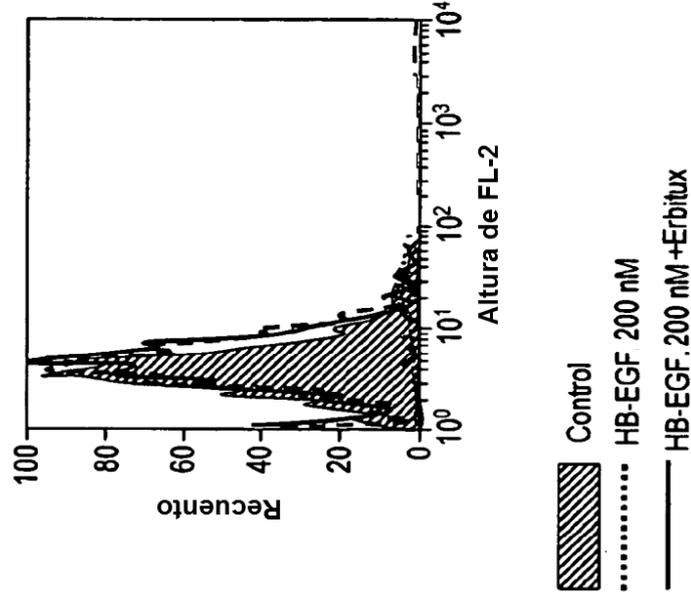


Fig. 20B

Fig. 20A

Secuencia de aminoácidos de la VH del Ab # 6 (SEC ID N°: 1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLEWVSSISS
GGWTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFD
YWGQGLTVTVSS

Secuencia de aminoácidos de la VL del Ab # 6 (SEC ID N°: 2)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVVSQHPGKAPKLIIEVSR
PSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGGKVTVL

Secuencia de aminoácidos de la VH del Ab # 3 (SEC ID N°: 3)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYNMRWVRQAPGKGLEWVSVIYPS
GGATRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYYYGMDV
WGQGLTVTVSS

Secuencia de aminoácidos de la VL del Ab # 3 (SEC ID N°: 4)

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSDSNIGRNYIYQYQFPGTAPKLLIYRNNQRP
SGVPDRISGSKSGTASLAISGLRSEDEAEYHCGTWDDSLSGPVFGGGKLTVL

Secuencia de aminoácidos de la VH del Ab # 14 (SEC ID N°: 5)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYGMGWVRQAPGKGLEWVSYISPS
GGHTKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLETGLLVD
AFDIWGQGMVTVSS

Secuencia de aminoácidos de la VL del Ab # 14 (SEC ID N°: 6)

QYELTQPPSVSVYPGQTASITCSGDQLGSKFVSWYQQRPGQSPVLVMYKDKRRP
SEIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAIDEADYYCQAWDSSTYVFGTGTKVTVL

Secuencia de aminoácidos de la VH del Ab # 17 (SEC ID N°: 35)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYGMGWVRQAPGKGLEWVSYISPS
GGITVYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLNYYYGLDV
WGQGTTVTVSS

Secuencia de aminoácidos de la VL del Ab # 17 (SEC ID N°: 36)

QDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDIGDSLWYQKPGKAPRLLIYDASNLE
TGVPFRFSGSGSDFTFTFRSLQPEDIATYFCQQSANAPFTFGPGTKVDIK

Secuencia de aminoácidos de la VH del Ab # 19 (SEC ID N°: 37)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMWVRQAPGKGLEWVSYIGSS
GGPTYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGRGTPYYFDS
WGQGLTVTVSS

Secuencia de aminoácidos de la VL del Ab # 19 (SEC ID N°: 38)

QYELTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGRWNIVSWYQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVS
NRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSTSSSTWVFGGKLTVL

Fig. 21A

CDR1 de la VH del Ab # 6 (SEC ID N°: 7)

HYVMA

CDR2 de la VH del Ab # 6 (SEC ID N°: 8)

SISSGGWTLYADSVKG

CDR3 de la VH del Ab # 6 (SEC ID N°: 9)

GLKMATIFDY

CDR1 de la VL del Ab # 6 (SEC ID N°: 10)

TGTSSDVGSYNVVS

CDR2 de la VL del Ab # 6 (SEC ID N°: 11)

EVSQRPS

CDR3 de la VL del Ab # 6 (SEC ID N°: 12)

CSYAGSSIFVI

CDR1 de la VH del Ab # 3 (SEC ID N°: 13)

AYNMR

CDR2 de la VH del Ab # 3 (SEC ID N°: 14)

VIYPSGGATRYADSVKG

CDR3 de la VH del Ab # 3 (SEC ID N°: 15)

GYYYYGMDV

CDR1 de la VL del Ab # 3 (SEC ID N°: 16)

SGSDSNIGRNYIY

CDR2 de la VL del Ab # 3 (SEC ID N°: 17)

RNNQRPS

CDR3 de la VL del Ab # 3 (SEC ID N°: 18)

GTWDDSLSGPV

Fig. 21B

CDR1 de la VH del Ab # 14 (SEC ID N°: 19)

AYGMG

CDR2 de la VH del Ab # 14 (SEC ID N°: 20)

YISPSGGHTKYADSVKG

CDR3 de la VH del Ab # 14 (SEC ID N°: 21)

VLETGLLVDAFDI

CDR1 de la VL del Ab # 14 (SEC ID N°: 22)

SGDQLGSKFVS

CDR2 de la VL del Ab # 14 (SEC ID N°: 23)

YKDKRRPS

CDR3 de la VL del Ab # 14 (SEC ID N°: 24)

QAWDSSTYV

CDR1 de la VH del Ab # 17 (SEC ID N°: 39)

WYGMG

CDR2 de la VH del Ab # 17 (SEC ID N°: 40)

YISPSGGITVYADSVKG

CDR3 de la VH del Ab # 17 (SEC ID N°: 41)

LNYYYGLDV

CDR1 de la VL del Ab # 17 (SEC ID N°: 42)

QASQDIGDSLN

CDR2 de la VL del Ab # 17 (SEC ID N°: 43)

DASNLET

CDR3 de la VL del Ab # 17 (SEC ID N°: 44)

QQSANAPFT

CDR1 de la VH del Ab # 19 (SEC ID N°: 45)

RYGMW

CDR2 de la VH del Ab # 19 (SEC ID N°: 46)

YIGSSGGPTYVDSVKG

CDR3 de la VH del Ab # 19 (SEC ID N°: 47)

GRGTPYYFDS

CDR1 de la VL del Ab # 19 (SEC ID N°: 48)

TGTSSDIGRWNIVS

CDR2 de la VL del Ab # 19 (SEC ID N°: 49)

DVSNRPS

CDR3 de la VL del Ab # 19 (SEC ID N°: 50)

SSYTSSTWV

Fig. 21C

Secuencia de ácidos nucleicos optimizada del codón de la VH del Ab # 6 (SEC ID N°: 25)

gaggtgcagctgctggagagcggcggagggtggtccagccaggcggcagcctgaggctgtcctgcgccagcggcttcac
cttcagccactacgtgatggcctgggtgcggcaggccccaggcaaggcctggaatgggtgtccagcatcagcagcagcggcgg
ctggaccctgtacgccgacagcgtgaaggcagggtcaccatcagcagggacaacagcaagaacacacctgtacctgcagatgaac
agcctgagggccgaggacaccgccgtgtactactgcaccaggggcctgaagatggccaccatcttcgactactggggccagggc
accctggtgaccgtgagcagc

Secuencia de ácidos nucleicos optimizada del codón de la VL del Ab # 6 (SEC ID N°: 26)

cagtccgcctgaccagccccgacgctgagcggcagcccaggccagagcatcaccatcagctgcaccggcaccagcagcga
cgtgggcagctacaacgtggtgtcctgtatcagcagcaccggcaaggcccccaagctgatcatctacgaggtgtcccagagg
cccagcggcgtgagcaacaggttcagcggcagcaagagcggcaacaccgccagcctgacctcagcggcctgcagaccgagg
acgaggccgactactactgtgcagctacgccggcagcagcatcttcgtgatcttcggcggagggaaccaaggtgaccgtccta

Secuencia de ácidos nucleicos optimizada del codón de la VH del Ab # 3 (SEC ID N°: 27)

gaggtgcagctgctggaaagcggcggagggtggtgcagccaggcggcagcctgaggctgtcctgcgccagcggcttcac
cttcagcgcctacaacatgagatgggtgcggcaggccccaggcaaggcctggaatgggtgtccgtgatctacccagcggcgg
agccaccagatacggcagcgtgaaggcagggtcaccatcagcagggacaacagcaagaacacctgtacctgcagatgaa
cagcctgagggccgaggacaccgccgtgtactactgcgccaggggtactactactacggcatggacgtgtggggccagggcac
cctggtgaccgtgagcagc

Secuencia de ácidos nucleicos optimizada del codón de la VL del Ab # 3 (SEC ID N°: 28)

cagagcgtgctgaccagcccccaagcgcagcggcaccggcaggggtgacctcagctgcagcggcagcgacagca
acatcggcaggaactacatctactgtatcagcaggtccccggcaccgcccccaagctgctgatctacaggaacaaccagaggccc
agcggcgtgcccagcagatcagcggcagcaagagcggcaccagcggcctggccatcagcggcctgagaagcaggac
gaggccgagtaccactgcggcacctgggacgacagcctgagcggcccagtggtcggcggagggaaccaagctgaccgtccta

Fig. 22A

Secuencia de ácidos nucleicos de la VH del Ab # 14 (SEC ID N°: 29)

gaagttcaattgtagagtctgggtggcggtctgttcagcctgggtggtctttacgtctttctgcgctgctccggattcactttctct
gcttacggtatgggttgggttcgccaagctcctgtaaaaggttggagtggttcttatactctcctctggtggccatactaag
tatgctgactccgtaaaaggtcgttcaactatcttagagacaactctaagaatactctacttgcagatgaacagcttaagggtc
tgaggacacggcgtatattactgtgcgaaagtactggaaactggcttattggtgatgctttgatctggggccaaggga
atggtcaccgtctcaagc

Secuencia de ácidos nucleicos de la VL del Ab # 14 (SEC ID N°: 30)

cagtacgaattgactcagccaccctcagtgctcgtgtaccaggacagacagccagcatcacctgctctggagatcaattggg
gagtaaatgttctcgtgtatcagcagaggccaggccagctccctgtgttgggtcatgtataaagataaaaggcggccgtcaga
gatccctgagcgattctctggctccaactctgggaacacagccactctgacatcagcgggacccaggctatagatgaggct
gactattatgtcaggcgtgggacagcagcactatgtcttcggcactgggaccaaggtcaccgtccta

Pre-optimización de la secuencia de ácidos nucleicos de la VH del Ab # 6 (SEC ID N°: 31)

gaagttcaattgtagagtctgggtggcggtctgttcagcctgggtggtctttacgtctttctgcgctgctccggattcactttctct
cattacgttatggcttgggttcgccaagctcctgtaaaaggttggagtggttcttctatctctctctctggtggctggactctttat
gctgactccgtaaaaggtcgttcaactatcttagagacaactctaagaatactctacttgcagatgaacagcttaagggtcgt
aggacacagccgtgtattactgtactagaggtctcaagatggctacaattttgactactggggccagggcaccctggtcaccg
tctcaagc

Pre-optimización de la secuencia de ácidos nucleicos de la VL del Ab # 6 (SEC ID N°: 32)

cagagcgttggactcagcctgcctcgtgtctgggtcctcctggacagtcgatcaccatctcctgactggaaccagcagtgat
gttgggagttataatgtgtctcctggtaccaacaacaccaggcaaaagccccaaactcatcattatgaggtcagtcagcggg
ccctcaggggttctaactcgtctctggctccaagtctggcaacacggcctccctgacaatctctgggctccagactgaggac
gaggctgattactgtctcatatgcaggtagtagtatttctgtatattcggcggagggaaccaaggtgaccgtccta

Pre-optimización de la secuencia de ácidos nucleicos de la VH del Ab # 3 (SEC ID N°: 33)

gaagttcaattgtagagtctgggtggcggtctgttcagcctgggtggtctttacgtctttctgcgctgctccggattcactttctct
gcttacaatatgcgttgggttcgccaagctcctgtaaaaggttggagtggttctgttatctatcctctggtggcgtactcgtt
atgctgactccgtaaaaggtcgttcaactatcttagagacaactctaagaatactctacttgcagatgaacagcttaagggtc
gaggacacggcgtgtattactgtgcgagaggttactactactacggtatggagctctggggccaaggcaccctggtcaccg
tctcaagc

Pre-optimización de la secuencia de ácidos nucleicos de la VL del Ab # 3 (SEC ID N°: 34)

cagagcgttggactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggagagggtcaccatctcgtgttctggaagcgactcca
acatcggaaagaaattatataattggtaccagcaattccagggaacggcccccaagctcctcatctataggaataatcagcggc
cctcaggggtccctgaccgaatctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagtggtcctccggtccgaggat
gaggctgagtatcactgtggaacatgggatgacagcctgagtggtccggtattcggcggagggaactaagctgaccgtccta

Fig. 22B

- VLb del Ab #6:
 - QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVSWYQQHPGKAPK
LMIYEVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYA
GSSIFVIFGGGTKVTVL (SEC ID N°: 51)
- VK1b del Ab #17:
 - QDIQMTQSPSSLSASVGDRITITCQASQDIGDSLNWYQQKPGKAPRLL
IYDASNLETGVPPRFSGSGSGTDFTFTRSLQPEDIATYFCQQSANAP
FTFGPGTKVDIR (SEC ID N°: 52)
- VL2B del Ab #19:
 - QYELTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGRWNIVSWYQQHPGKAPK
LMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYTS
SSTVVFGGGTKLTVL (SEC ID N°: 53)

Fig. 23

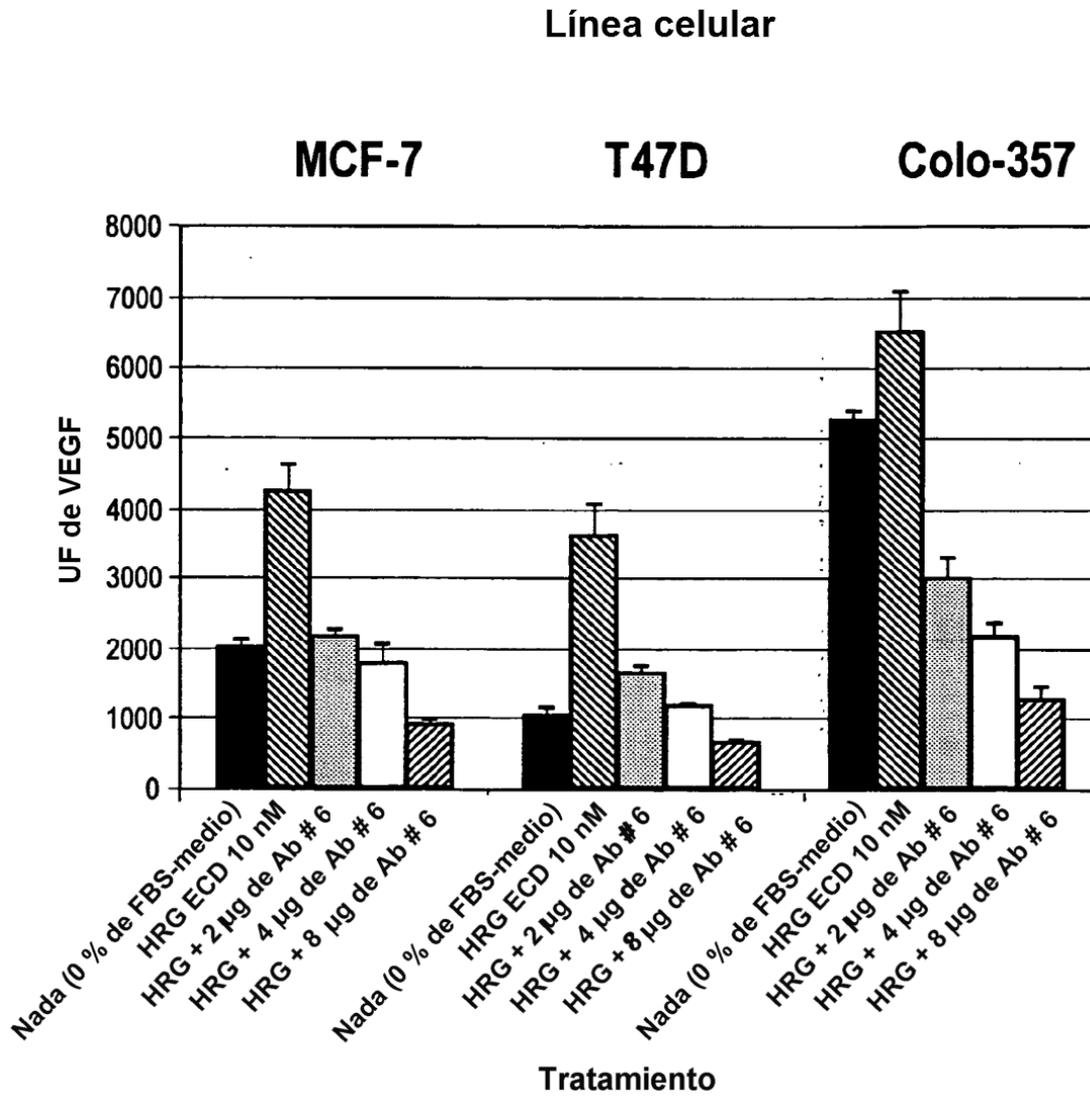


Fig. 24A

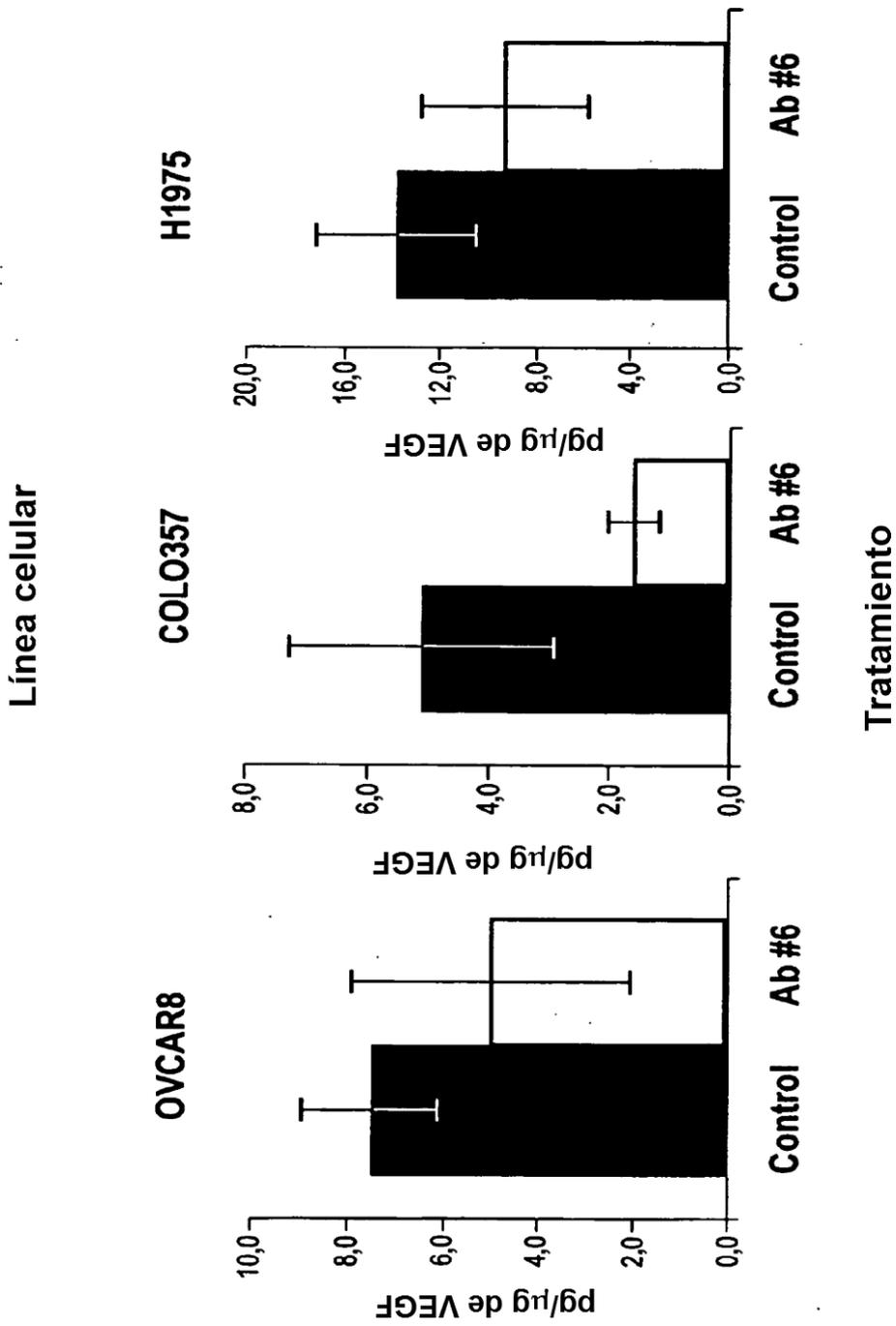


Fig. 24B

**Correlación entre la inhibición de la fosfoErbB3
y la inhibición de la secreción del VEGF**

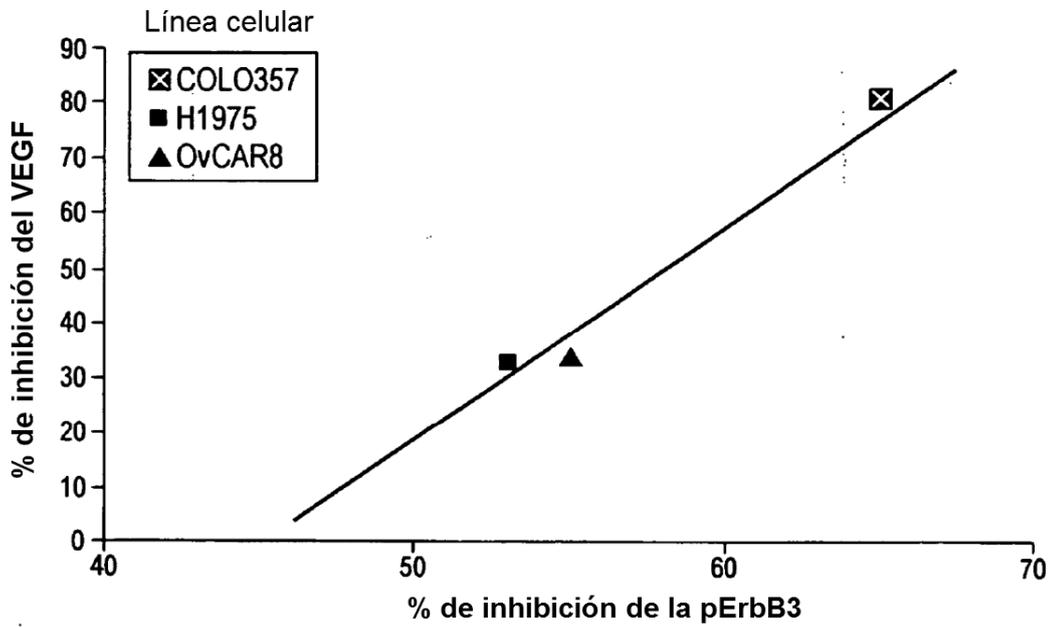
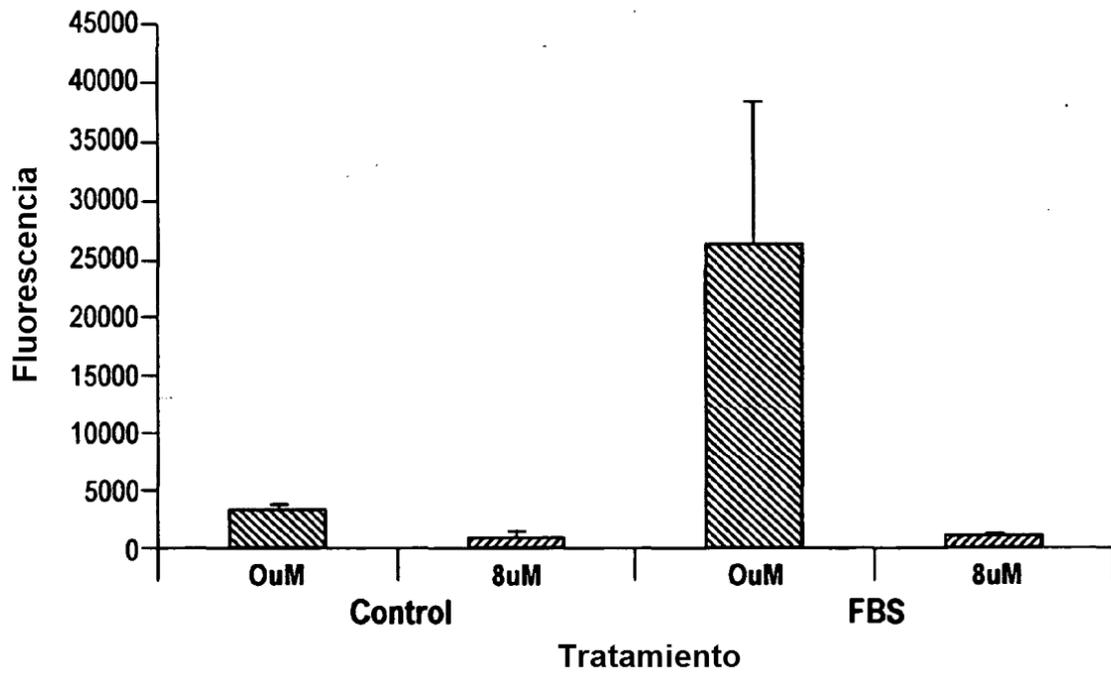


Fig. 24C

Efecto del Ab #6 sobre la migración celular



Medio RPMI solo
RPMI + 8 μ M de Ab #6
RPMI + 10% de FBS
10% de FBS + 8 μ M de Ab #6

Fig. 25

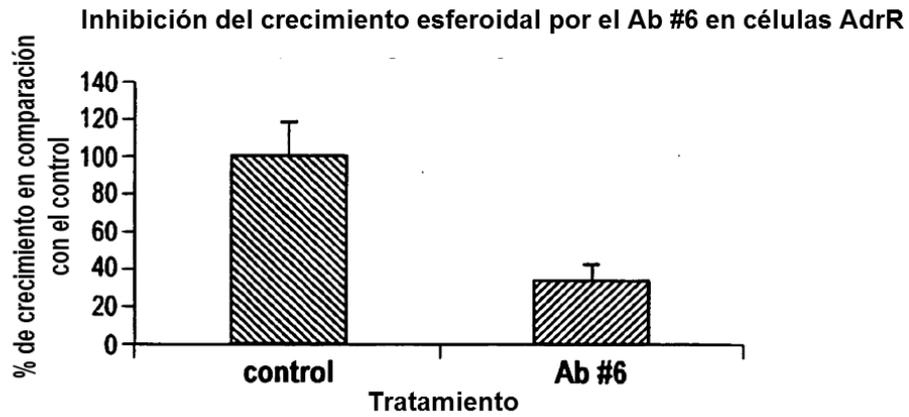


Fig. 26A

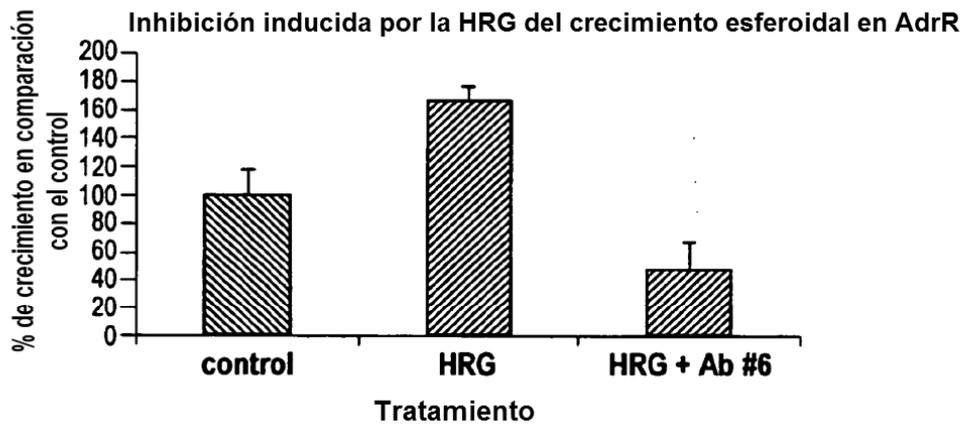


Fig. 26B

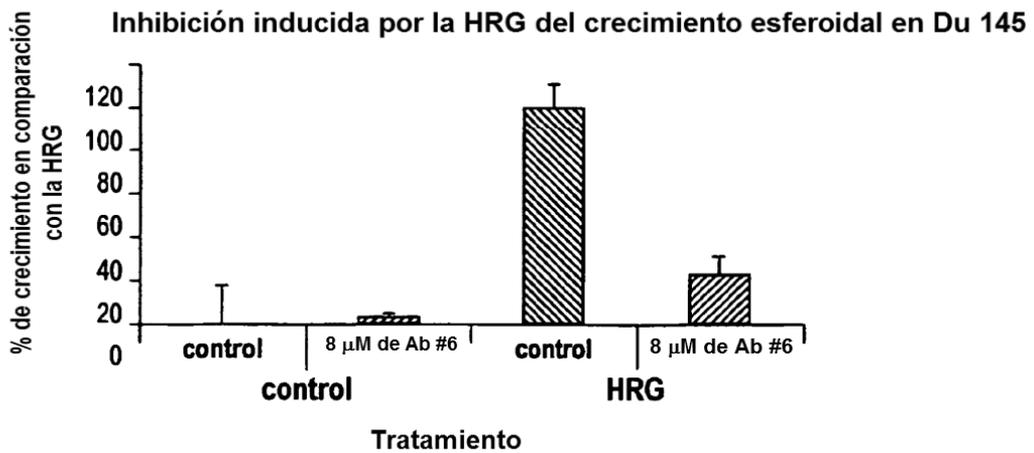


Fig. 26C

Efecto del Ab #6 en la unión de la HRG a células AdrR

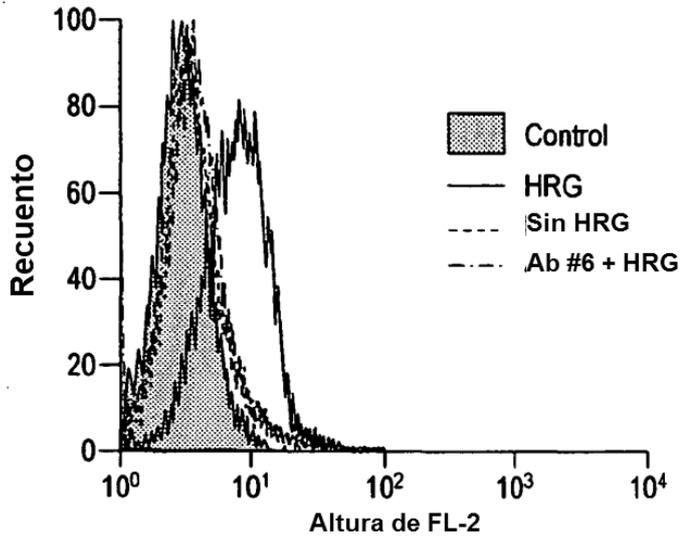


Fig. 27A

Efecto del Ab #6 en la unión de la BTC a células AdrR

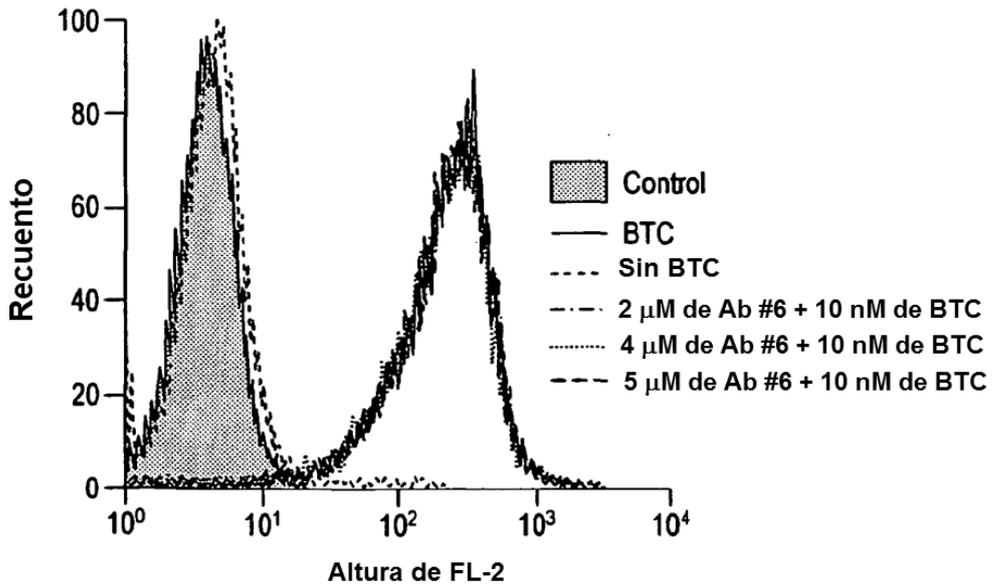


Fig. 27B

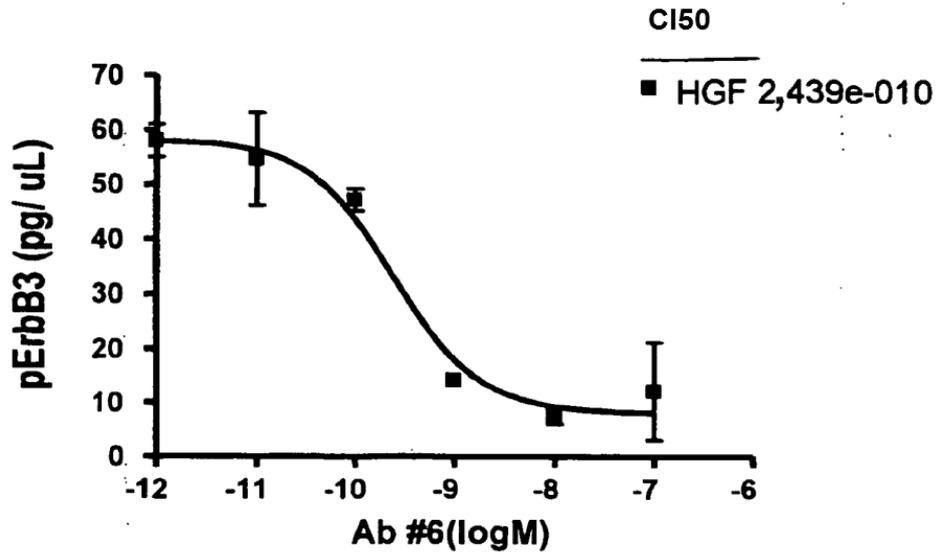


Fig. 28

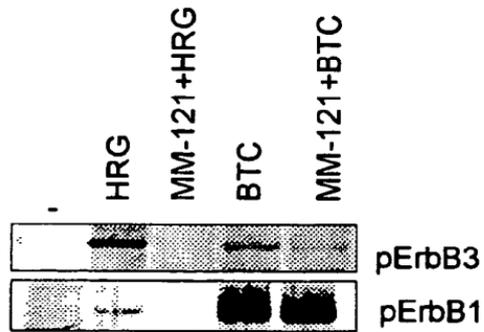


Fig. 29A

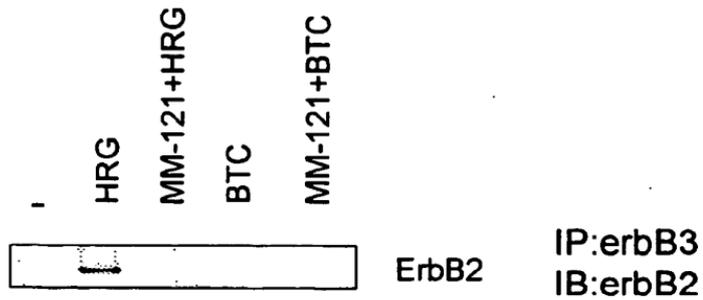


Fig. 29B

Fig. 30

