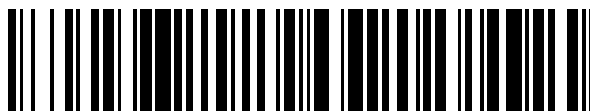


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 450 922**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 16/32** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 31/7068** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.1998 E 98963840 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 1037926**

54 Título: **Tratamiento con anticuerpos anti-ErbB2**

30 Prioridad:

**12.12.1997 US 69346 P**

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

**25.03.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SHAK, STEVEN;  
PATON, VIRGINIA, E. y  
DESMOND-HELLMANN, SUSAN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 450 922 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento con anticuerpos anti-ErbB2

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al tratamiento de trastornos caracterizados por la sobreexpresión de ErbB2 de mama maligno. Más específicamente, la invención se refiere al tratamiento de pacientes humanos con cáncer de mama maligno que sobreexpresa ErbB2 con una combinación de un anticuerpo anti-ErbB2 y un agente quimioterapéutico que es un taxoide, en ausencia de una antraciclina, por ejemplo, doxorubicina o epirubicina.

15 **Antecedentes de la invención**

Se ha identificado que proto-oncogenes que codifican factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento desempeñan importantes tareas en la patogénesis de diversas neoplasias humanas, incluyendo cáncer de mama. Se ha descubierto que el gen humano de ErbB2 (*erbB2*, también conocido como *her2*, o *c-erbB-2*), que codifica un receptor de glucoproteína transmembrana de 185-kd (p185<sup>HER2</sup>) relacionado con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se sobreexpresa en aproximadamente el 25 % al 30 % de los cánceres de mama humanos (Slamon et al., *Science* 235:177-182 [1987]; Slamon et al., *Science* 244:707-712 [1989]).

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

Se han descrito anticuerpos dirigidos contra productos de la proteína *erbB2* humana y proteínas codificadas por el equivalente de rata del gen *erbB2* (*neu*). Drebin et al., *Cell* 41:695-706 (1985) se refieren a un anticuerpo monoclonal IgG2a que está dirigido contra el producto de rata del gen *neu*. Este anticuerpo llamado 7.16.4 causa modulación negativa de la expresión de p185 en superficie celular sobre células B104-1-1 (células NIH-3T3 transfectadas con el proto-oncogén *neu*) e inhibe la formación de colonias de estas células. En Drebin et al. *PNAS (USA)* 83:9.129-9133 (1986), se demostró que el anticuerpo 7.16.4 inhibía el crecimiento tumorigénico de células NIH-3T3 transformadas con *neu* así como células de neuroblastoma de rata (a partir de las cuales se aisló inicialmente el oncogén *neu*) implantadas en ratones desnudos. Drebin et al. en *Oncogene* 2:387-394 (1988) analizan la producción de un panel de anticuerpos contra el producto de rata del gen *neu*. Se descubrió que todos los anticuerpos ejercían un efecto citostático sobre el crecimiento de células transformadas con *neu* suspendidas en agar blando. Anticuerpos de los isotipos IgM, IgG2a e IgG2b eran capaces de mediar la lisis *in vitro* significativa de células transformadas con *neu* en presencia del complemento, mientras que ninguno de los anticuerpos era capaz de mediar elevados niveles de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de las células transformadas con *neu*. Drebin et al. *Oncogene* 2:273-277 (1988) informan de que mezclas de anticuerpos reactivos con dos regiones distintas sobre la molécula p185 provocan efectos antitumorales sinérgicos sobre células NIH-3T3 transformadas con *neu* implantadas en ratones desnudos. Se revisan los efectos biológicos de anticuerpos anti-*neu* en Myers et al., *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991). Véase también el documento WO94/22478 publicado el 13 de octubre de 1994.

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

65 Tagliabue et al. *Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991) describen dos anticuerpos que se seleccionaron por su reactividad sobre la línea celular de adenocarcinoma pulmonar (Calu-3) que sobreexpresa ErbB2. Uno de los anticuerpos, llamado MGR3, se descubrió que se internalizaba, inducía la fosforilación de ErbB2, e inhibía el crecimiento de las células tumorales *in vitro*.

McKenzie et al. *Oncogene* 4:543-548 (1989) generaron un panel de anticuerpos anti-ErbB2 con especificidades variables de epítipo, incluyendo el anticuerpo denominado TA1. Se descubrió que este anticuerpo TA1 inducía endocitosis acelerada de ErbB2 (véase Maier et al. *Cancer Res.* 51:5361-5369 [1991]). Bacus et al. *Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990) informaron que el anticuerpo TA1 inducía la maduración de las líneas celulares de cáncer de mama AU-565 (que sobreexpresa el gen *erbB2*) y MCF-7 (que no). Se descubrió que la inhibición del crecimiento y la adquisición de un fenotipo maduro en estas células estaba asociado con niveles reducidos de receptor de ErbB2 en la superficie celular y niveles aumentados transitorios en el citoplasma.

Stancovski et al. *PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991) generaron un panel de anticuerpos anti-ErbB2, los inyectaron i.p. en ratones desnudos y evaluaron su efecto sobre el crecimiento tumoral de fibroblastos murinos transformados por sobreexpresión del gen *erbB2*. Se detectaron diversos niveles de inhibición tumoral para cuatro de los anticuerpos, pero uno de los anticuerpos (N28) estimulaba constantemente el crecimiento tumoral. El anticuerpo monoclonal N28 inducía fosforilación significativa del receptor de ErbB2, mientras que los otros cuatro anticuerpos generalmente presentaban baja o ninguna actividad inductora de fosforilación. El efecto de los anticuerpos anti-ErbB2 sobre la proliferación de células SKBR3 también se ensayó. En este ensayo de proliferación de células SKBR3, dos de los anticuerpos (N12 y N29) causaron una reducción en la proliferación celular relativa al control. Se evaluó la capacidad de los diversos anticuerpos de inducir lisis celular *in vitro* mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y citotoxicidad dependiente de células mediada por anticuerpos (ADCC), concluyendo los autores de este artículo que la función inhibidora de los anticuerpos no se atribuía significativamente a CDC o a ADCC.

Bacus et al. *Cancer Research* 52:2580-2589 (1992) caracterizaron adicionalmente los anticuerpos descritos en Bacus *et al.* (1990) y Stancovski *et al.* de los párrafos precedentes. Extendiendo los estudios i.p. de Stancovski *et al.*, se evaluó el efecto de los anticuerpos después de inyección i.v. en ratones desnudos que albergaban fibroblastos de ratón que sobreexpresaban ErbB2 humano. Como se observaba en su trabajo anterior, N28 aceleraba el crecimiento tumoral mientras que N12 y N29 inhibían significativamente el crecimiento de las células que expresan ErbB2. También se observó inhibición tumoral parcial con el anticuerpo N24. Bacus *et al.* también ensayaron la capacidad de los anticuerpos de promover un fenotipo maduro en las líneas celulares de cáncer de mama humano AU-565 y MDA-MB453 (que sobreexpresa ErbB2) así como MCF-7 (que contiene bajos niveles del receptor). Bacus *et al.* observaron una correlación entre la inhibición tumoral *in vivo* y la diferenciación celular: el anticuerpo estimulador tumoral N28 no tenía efectos sobre la diferenciación, y la acción inhibidora tumoral de los anticuerpos N12, N29 y N24 se correlacionaba con el grado de diferenciación que inducían.

Xu et al. *Int. J. Cancer* 53:401-408 (1993) evaluaron un panel de anticuerpos anti-ErbB2 para su especificidades de unión a epítipo, así como su capacidad de inhibir el crecimiento independiente de anclaje y dependiente de anclaje de células SKBR3 (por anticuerpos individuales y en combinaciones), modular ErbB2 de superficie celular, e inhibir el crecimiento independiente de anclaje estimulado por ligando. Véase también el documento WO94/00136 publicado el 6 de enero de 1994 y Kasprzyk et al. *Cancer Research* 52:2771-2776 (1992) que se refiere a combinaciones de anticuerpos anti-ErbB2. Otros anticuerpos anti-ErbB2 se analizan en Hancock et al. *Cancer Res.* 51:4575-4580 (1991); Shawver et al. *Cancer Res.* 54:1367-1373 (1994); Arteaga et al. *Cancer Res.* 54: 3758-3765 (1994); y Harwerth et al. *J. Biol. Chem.* 267:15160-15167 (1992).

Un anticuerpo monoclonal anti-ErbB2 humanizado recombinante (una versión humanizada del anticuerpo murino anti-ErbB2 4D5, mencionado como rhuMAb HER2 o HERCEPTIN®) ha sido clínicamente activo en pacientes con cánceres de mama metastásicos que sobreexpresan ErbB2 que habían recibido terapia extensiva anti-neoplásica previa (Baselga et al., *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 [1996]).

La sobreexpresión de ErbB2 habitualmente se considera como un predictor de un mal pronóstico, especialmente en pacientes con enfermedad primaria que implica ganglios linfáticos axilares (Slamon *et al.*, [1987] y [1989], *supra*; Ravidin y Chamness, *Gene* 159:19-27 [1995]; e Hynes y Stern, *Biochim Biophys Acta* 1198:165-184 [1994]), y se ha ligado a sensibilidad y/o resistencia a terapia hormonal y regímenes quimioterapéuticos, incluyendo CMF (ciclofosfamida, metotrexato, y fluororacilo) y antraciclinas (Baselga et al., *Oncology* 11(3 Supl. 1):43-48 [1997]). Sin embargo, a pesar de la asociación de la sobreexpresión de ErbB2 con un mal pronóstico, las probabilidades de pacientes Her-2 positivos que responden clínicamente al tratamiento con taxanos eran de más de tres veces las de pacientes Her-2 negativos (*Id. ibid.*). Se demostró que rhuMAb HER2 potenciaba la actividad de paclitaxel (TAXOL®) y doxorubicina, contra xenoinjertos de cáncer de mama en ratones desnudos a los que se había inyectado células de adenocarcinoma de mama humano BT-474, que expresan elevados niveles de HER2 (Baselga et al., *Breast Cancer. Proceedings of ASCO*, Vol. 13, Abstract 53 [1994]).

## 60 Sumario de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento de trastornos caracterizados por la sobreexpresión de ErbB2, y se basa en el reconocimiento de que aunque un tratamiento con anticuerpos anti-ErbB2 potencia marcadamente el beneficio clínico del uso de agentes quimioterapéuticos en general, un síndrome de disfunción de miocardio que se ha observado como efecto secundario de derivado de antraciclina se aumenta por la administración de anticuerpos anti-ErbB2.

Por consiguiente, la invención proporciona la materia objeto de las reivindicaciones.

El agente quimioterapéutico es un taxoide, tal como TAXOL® (paclitaxel) o un derivado de TAXOL®.

- 5 Aunque es suficiente un efecto antiproliferativo, en una realización preferida, el anticuerpo anti-ErbB2 es capaz de inducir muerte celular o es capaz de inducir apoptosis. Más preferiblemente, el anticuerpo es el anticuerpo 4D5, mucho más preferiblemente en una forma humanizada.

10 La presente invención es una composición o fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer de mama, caracterizado por la sobreexpresión del receptor ErbB2 según se reivindica.

15 El medicamento puede proporcionarse dentro de un artículo de fabricación, que comprende un recipiente, una composición dentro del recipiente que comprende un anticuerpo anti-ErbB2, opcionalmente una etiqueta sobre o asociada con el recipiente que indica que la composición puede usarse para tratar una afección caracterizada por la sobreexpresión del receptor de ErbB2, y un prospecto que contiene instrucciones para evitar el uso de agentes quimioterapéuticos de tipo antraciclina en combinación con la composición.

### Breve descripción de los dibujos

20 La Fig. 1 muestra el mapeado de epítomos del dominio extracelular de ErbB2 determinado por análisis de mutantes de truncamiento y mutagénesis dirigida al sitio (Nakamura et al. J. of Virology 67(10):6179-6191 [Oct 1993]; Renz et al. J. Cell Biol. 125(6):1395-1406 [Jun 1994]). Los MAb antiproliferativos 4D5 y 3H4 se unen adyacentes en el dominio transmembrana. Los diversos truncamientos ErbB2-ECD o mutaciones puntuales se prepararon a partir de ADNc usando tecnología de reacción en cadena de la polimerasa. Los mutantes ErbB2 se expresaron como proteínas de fusión gD en un plásmido de expresión de mamífero. Este plásmido de expresión usa el promotor/potenciador de citomegalovirus con las señales de terminación y poliadenilación de SV40 localizadas cadena abajo del ADNc insertado. El ADN plasmídico se introdujo por transfección en células 293S. un día después de la transfección, las células se marcaron metabólicamente durante una noche en metionina y DMEM con bajo contenido en glucosa libre de cisteína que contenía suero bovino fetal dializado al 1 % y 25 µCi de cada uno de <sup>35</sup>S metionina y <sup>35</sup>S cisteína. Se recogieron los sobrenadantes, se añadieron los MAb contra ErbB2 o anticuerpos de control al sobrenadante y se incubaron 2-4 horas a 4 °C. Los complejos se precipitaron, se aplicaron a un gel con gradiente de Tricina SDS del 10-20 % y se sometieron a electroforesis a 100 V. el gel se electrotransfirió a una membrana y se analizó por autorradiografía. Las SEC ID N° 8 y 9 representan los epítomos 3H4 y 4D5, respectivamente.

35 La Fig. 2 representa con subrayado la secuencia de aminoácidos del Dominio 1 de ErbB2 (SEC ID N° 1). Los aminoácidos en negrita indican la localización del epítomo reconocido por los Mab 7C2 y 7F3 determinados por mapeado de delección, es decir, el "epítomo 7C2/7F3" (SEC ID N° 2).

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

40 **I. Definiciones**

Los términos "HER2", "ErbB2", "c-Erb-B2" se usan de forma intercambiable. Salvo que se indique otra cosa, los términos "ErbB2", "c-Erb-B2" y "HER2" cuando se usan en este documento se refieren a la proteína humana y "her2", "erbB2" y "c-erb-B2" se refieren al gen humano. El gen *erbB2* humano y la proteína ErbB2 se describen, por ejemplo, en Semba et al., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985) y Yamamoto et al. Nature 319:230-234 (1986) (Número de acceso a Genebank X03363). ErbB2 comprende cuatro dominios (Dominios 1-4).

50 El "epítomo 4D5" es la región en el dominio extracelular de ErbB2 al cual se une el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463). Este epítomo está cerca de la región transmembrana de ErbB2. Para seleccionar anticuerpos que se unan al epítomo 4D5, puede realizarse un ensayo rutinario de bloqueo cruzado tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse mapeado de epítomos (véase la Fig. 1) para evaluar si el anticuerpo se une al epítomo 4D5 de ErbB2 (es decir, uno cualquiera o más restos en la región cerca del resto 529, por ejemplo, aproximadamente el resto 561 a aproximadamente el resto 625, incluidos).

60 El "epítomo 3H4" es la región en el dominio extracelular de ErbB2 al cual se une al anticuerpo 3H4. Este epítomo se muestra en la Fig. 1, e incluye los restos de aproximadamente 541 a aproximadamente 599, incluidos, en la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de ErbB2.

65 El "epítomo 7C2/7F3" es la región en el extremo N-terminal del dominio extracelular de ErbB2 a la cual se unen los anticuerpos 7C2 y/o 7F3 (cada uno depositado en la ATCC, véase a continuación). Para seleccionar anticuerpos que se unan al epítomo 7C2/7F3, puede realizarse un ensayo rutinario de bloqueo cruzado tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse mapeado de epítomos para establecer si el anticuerpo se une al epítomo 7C2/7F3 en ErbB2 (es decir, uno cualquiera o más de los restos en la región de aproximadamente el resto 22 a aproximadamente el resto

53 de ErbB2; SEC ID N° 2).

La expresión "induce muerte celular" o "capaz de inducir muerte celular" se refiere a la capacidad del anticuerpo de hacer que una célula viable llegue a ser no viable. La "célula" aquí es una que expresa el receptor de ErbB2, especialmente donde la célula sobreexpresa el receptor ErbB2. Una célula que "sobreexpresa" ErbB2 tiene niveles significativamente mayores que los normales de ErbB2 en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo tisular. Preferiblemente, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estomago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreática o de vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SKBR3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. La muerte celular *in vitro* puede determinarse en ausencia de complemento y células efectoras inmunes para distinguir la muerte celular inducida por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por tanto, el ensayo para la muerte celular puede realizarse usando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia del complemento) y en ausencia de células efectoras inmunes. Para determinar si el anticuerpo es capaz de inducir muerte celular, puede evaluarse la pérdida de integridad de membrana por captación de yoduro de propidio (PI), azul tripiano (véase Moore et al. Cytotechnology 17:1-11 [1995]) o 7AAD con relación a células no tratadas. Los anticuerpos inductores de muerte celular preferidos son aquellos que inducen captación de PI en el "ensayo de captación de PI en células BT474".

La expresión "induce apoptosis" o "capaz de inducir apoptosis" se refiere a la capacidad del anticuerpo de inducir muerte celular programada determinada por unión de anexina V, fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplasmático, fragmentación celular, y/o formación de vesículas de membrana (llamadas cuerpos apoptóticos). La célula es una que sobreexpresa el receptor de ErbB2. Preferiblemente la "célula" es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estomago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreática o de vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SKBR3, BT474, célula Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o célula SKOV3. Están disponibles diversos métodos para evaluar los eventos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, puede medirse la translocación de fosfatidil serina (PS) por la unión a nexina; la fragmentación de ADN puede evaluarse a través de la formación de ADN escalonado desvelado en el ejemplo de este documento; y la condensación nuclear/de la cromatina junto con la fragmentación del ADN puede evaluarse por cualquier aumento en las células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo que induce apoptosis es uno que provoca una inducción de aproximadamente 2 a 50 veces, preferiblemente de aproximadamente 5 a 50 veces, y mucho más preferiblemente de aproximadamente 10 a 50 veces, de unión de anexina con relación a una célula no tratada en un "ensayo de unión de anexina usando células BT474" (véase a continuación).

"Heregulina" (HRG) cuando se usa en este documento se refiere a un polipéptido que activa los complejos proteicos ErbB2-ErbB3 y ErbB2-ErbB4 (es decir, induce fosforilación de restos de tirosina en el complejo tras la unión al mismo). Se desvelan diversos polipéptidos de heregulina abarcados por este término en Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); documento WO 92/20798; Wen et al., Mol. Cell. Biol., 14(3):1909-1919 (1994); y Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993), por ejemplo. El término incluye fragmentos biológicamente activos y/o variantes de un polipéptido HRG de origen natural, tal como un fragmento del dominio tipo EGF del mismo (por ejemplo, HRGβ<sub>1177-244</sub>).

El "complejo proteico ErbB2-ErbB3" y "complejo proteico ErbB2-ErbB4" son oligómeros asociados no covalentemente del receptor de ErbB2 y el receptor de ErbB3 o el receptor de ErbB4, respectivamente. Los complejos se forman cuando una célula que expresa estos dos receptores se expone a HRG y puede aislarse por inmunoprecipitación y analizarse por SDS-PAGE como se describe en Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994).

"Anticuerpos" (Ab) e "inmunoglobulinas" (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Aunque los anticuerpos muestran especificidad de unión por un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas tipo anticuerpo que carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos del último tipo se producen, por ejemplo, a bajos niveles por el sistema linfático y a niveles elevados por mielomas.

"Anticuerpos nativos" e "inmunoglobulinas nativas" son habitualmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque la cantidad de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V<sub>H</sub>) seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V<sub>L</sub>) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos aminoacídicos particulares forman una superficie de contacto entre los dominios variable de cadena ligera y pesada.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida de forma uniforme a lo largo de todos los dominios

variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman la región flanqueante (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina- $\beta$ , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina- $\beta$ . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en cercana proximidad por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase, Kabat et al., Publ. NIH. N° 91-3242, Vol. I, páginas 647-669 [1991]). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

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

"Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Esta región consta de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero  $V_H-V_L$ . Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas por un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unir antígeno, aunque a una afinidad inferior que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en este documento para Fab' en que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes albergan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo  $F(ab')_2$  se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basándose en la secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados por al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad biológica deseada.

"Fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab',  $F(ab')_2$ , y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpo.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones convencionales de anticuerpo (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítotos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan por el cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe entenderse como que requiere producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o puede prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N°

4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fago usando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

5 Los anticuerpos monoclonales en este documento específicamente incluyen anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico a u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 [1984]).

15 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se remplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se remplazan restos de la región flanqueante (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se hallan ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o las secuencias flanqueantes. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente y maximizar el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en que todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo PRIMATIZED™ en que la región de unión a anticuerpo del anticuerpo se obtiene de un anticuerpo producido por inmunización de monos macaco con el antígeno de interés.

35 Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "sFv" comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo, en que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que posibilita que el sFv forme la estructura deseada para la unión de antígeno. Para una revisión de sFv véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pág. 269-315 (1994).

40 El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) en la misma cadena polipeptídica (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>). Usando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a que los dominios aparezcan con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, el documento EP 404,097; documento WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

50 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con uso de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso del anticuerpo determinado por el método de Lowry, y más preferiblemente más del 99 % en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador con cubeta de centrifugación, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

60 Como se usa en este documento, la expresión "epítipo de unión a receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, o IgG<sub>4</sub>) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula IgG.

65 "Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen un trastorno así como aquellos en que tiene que prevenirse el trastorno.

"Mamífero" para propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, animales para deportes; o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

5 Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo anti-ErbB2. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas o agudas incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos de trastornos incluyen tumores benignos y malignos; leucemias y neoplasias linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, de macrófagos, epiteliales, estromáticos y blastocélulas; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

10 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa para hacer referencia a una cantidad que tiene efecto antiproliferativo. Preferiblemente, la cantidad terapéuticamente eficaz tiene actividad apoptótica, o es capaz de inducir muerte celular, y preferiblemente muerte de células tumorales benignas o malignas, en particular células cancerosas. La eficacia puede medirse de modos convencionales, dependiendo de la afección a tratar. Para terapia  
15 contra el cáncer, la eficacia puede medirse, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP), o determinando las tasas de respuesta (RR) (véase el Ejemplo a continuación).

20 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen el estado fisiológico en mamíferos que está normalmente caracterizado por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, carcinoma de glándulas salivales, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma  
25 hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

La expresión "agente citotóxico" como se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de células y/o causa la destrucción de células. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$  y  $\text{Re}^{186}$ ), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.  
30

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina (doxorubicina), epirubicina, 5-fluorouracilo (5-FU), arabinósido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida (CYTOXAN<sup>TM</sup>), tiotepa, busulfán, taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y docetaxel (Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia), metotrexato, cisplatino, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfámid, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (véase, la patente de Estados Unidos N° 4.675.187), melfalán y otras mostazas de nitrógeno relacionadas. También se incluyen en esta definición agentes hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre tumores tales como tamoxifeno y onapristona.  
35  
40

Otros ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen alquil sulfonatos tales como improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocuoona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo alretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clomafazina, colofosfamida, estramustina, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carzinofilina, cromomicinas, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, daunorubicina, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, gentamicina; análogos de ácido fólico tales como denopterina, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, y floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfomitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; platino; navelbina; novantrona; xeloda; ibandronato; CPT-II; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina; así como sales farmacéuticamente aceptables, ácido o derivados de cualquiera de los anteriores.  
45  
50  
55  
60

65 Otros ejemplos de agentes hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre tumores incluyen otros antiestrógenos, tales como raloxifeno (Evista), 4(5)-imidazoles inhibidores de aromataza, 4-



hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, y LY117018; y anti-andrógenos tales como flutamida y nilutamida; así como sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

5 Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que sobreexpresa ErbB2 *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan ErbB2 en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio diferente a fase S), tales como agentes que inducen la detención en G1 y la detención en fase M. Los bloqueantes clásicos en fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), TAXOL®, e  
10 inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Aquellos agentes que detienen en G1 también extienden sus efectos a la detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede hallarse información adicional en *The Molecular Basis of cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami et al. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la pág. 13. El anticuerpo 4D5 (y equivalentes funcionales del mismo)  
15 también puede emplearse para este propósito.

La "doxorubicina" es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- $\alpha$ -L-lixo-hexopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona.  
20

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citoquinas la hormona del crecimiento tal como la hormona del crecimiento humana, N-metionil hormona del crecimiento humana, y hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; pro-relaxina; hormonas glucoproteicas tales como hormona folículo-estimulante (FSH), hormona estimuladora de tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral- $\alpha$  y  $\beta$ ; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento del endotelio vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factor de crecimiento tipo insulina-I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón- $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ; factores estimuladores de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ ; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando kit (KL). Como se usa en este documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.  
25  
30  
35

40 El término "profármaco" como se usa en esta solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco precursor y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma precursora más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pág. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchart et al., (ed.), pág. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, aunque sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados con D-aminoácido, profármacos glucosilados, profármacos que contienen  $\beta$ -lactama, opcionalmente profármacos que contienen fenoxiacetamida sustituida u opcionalmente profármacos que contienen fenilacetamida sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco para su uso en esta invención incluyen, aunque sin limitación, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.  
45  
50

Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que pueden adherirse los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención. Ejemplos de fases sólidas abarcadas en este documento incluyen aquellas formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la patente de Estados Unidos N° 4.275.149.  
55  
60

Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para el suministro de un fármaco (tal como los anticuerpos anti-ErbB2 desvelados en este documento y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de membranas biológicas.  
65

El término "prospecto" se usa para hacer referencia a instrucciones habitualmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias referentes al uso de dichos productos terapéuticos.

## 5 II. Producción de anticuerpos anti-ErbB2

Lo siguiente es una descripción en cuanto a técnicas ejemplares para la producción de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención. El antígeno ErbB2 a usar para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de ErbB2 o una parte del mismo, que contiene el epítipo deseado. Como alternativa, pueden usarse células que expresan ErbB2 en su superficie celular (por ejemplo, células NIH-3T3 transformadas para sobreexpresar ErbB2; o una línea celular de carcinoma tal como células SKBR3, véase Stancovski et al. PNAS (USA) 88:8691-8695 [1991]) para generar anticuerpos. Otras formas de ErbB2 útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los especialistas en la técnica.

### 15 (i) Anticuerpos policlonales

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

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados combinando, por ejemplo, 100  $\mu\text{g}$  o 5  $\mu\text{g}$  de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días después, se exanguina a los animales y se ensaya el suero para el título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta que el título se estanca. Preferiblemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un agente de reticulación diferente. Los conjugados también pueden prepararse en cultivo celular recombinante como fusiones de proteína. Además, se usan adecuadamente agentes de agregación tales como alumbre para potenciar la respuesta inmune.

### 35 (ii) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos diferentes.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (patente de Estados Unidos N° 4.816.567).

En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se ha descrito anteriormente en este documento para provocar linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág.59-103 [Academic Press, 1986]).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), que son sustancias que evitan el crecimiento de células HGPRT-deficientes.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de forma eficaz, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EEUU, y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Mariland EEUU. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y

heteromioma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 [Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987]).

5 El medio de cultivo en que se cultivan las células de hibridoma se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

10 La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 [Academic Press, 1986]). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

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

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se introducen por transfección en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra et al., Curr. Opin. Immunol., 5:256-262 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188(1992).

En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de bibliotecas en fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas en fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por reordenamiento de cadenas (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 [1992]), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas en fagos muy grandes (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21: 2265-2266 [1993]). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison, et al., Proc. Natl Acad Sci. USA, 81:6851 [1984]), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no de inmunoglobulina.

Normalmente dichos polipéptidos no de inmunoglobulina se sustituyen en el lugar de los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen en el lugar de los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprenda un sitio de combinación de antígeno que tenga especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tenga especificidad por un antígeno diferente.

(iii) Anticuerpos humanizados y humanos

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoácidos introducidos en el mismo desde una fuente que es no humana. Estos restos aminoácidos no humanos a menudo se mencionan como restos de "importación", que se cogen normalmente de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 [1988]), sustituyendo las CDR o secuencias de CDR de roedor en el lugar de las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos N° 4.816.567) en que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en que algunos restos CDR y posiblemente algunos restos FR se sustituyen por restos de sitios análogos en

anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a usar en el preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método del "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias conocidas de dominios variables humanos. La secuencia humana que está más cerca a la de roedor entonces se acepta como la región flanqueante (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chotia et al., J. Mol. Biol., 196:901 [1987]). Otro método usa una región flanqueante particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede usarse la misma región flanqueante para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 [1993]).

Es adicionalmente importante humanizar los anticuerpos con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están habitualmente disponibles y son familiares para los especialistas en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias candidatas de inmunoglobulina seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia candidata de inmunoglobulina, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De este modo, pueden seleccionarse restos FR y combinarse a partir de las secuencias receptora y de importación de modo que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad aumentada por el antígeno o antígenos diana. En general, los restos CDR están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia de la unión de antígeno.

Como alternativa, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo ( $J_H$ ) en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal provoca la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal provocará la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993). Los anticuerpos humanos también pueden obtenerse de bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 [1991]).

*(iv) Fragmentos de anticuerpo*

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) y Brennan et al., Science, 229:81 [1985]). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas en fago de anticuerpos analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos  $F(ab')_2$  (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 [1992]). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos  $F(ab')_2$  pueden aislarse directamente de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para los especialistas en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase el documento WO 93/16185.

*(v) Anticuerpos biespecíficos*

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítopos diferentes de la proteína ErbB2. Por ejemplo, un brazo puede unirse a un epítipo en el dominio 1 de ErbB2 tal como el epítipo 7C2/7F3, el otro puede unirse a un epítipo diferente de ErbB2, por ejemplo el epítipo 4D5. Otros de estos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a ErbB2 con uno o más sitios de unión para EGFR, ErbB3 y/o ErbB4. Como alternativa, puede combinarse un brazo anti-ErbB2 con un brazo que se une a una molécula activadora en un leucocito tal como una molécula receptora de célula T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores de Fc para IgG ( $Fc\gamma R$ ), tales como  $Fc\gamma RI$  (CD64),  $Fc\gamma RII$  (CD32) y  $Fc\gamma RIII$  (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa ErbB2. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos en células que expresan ErbB2. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a ErbB2 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón- $\alpha$ , alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos  $F(ab')_2$ ).

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein et al., Nature, 305:537-539 [1983]). A causa del ordenamiento aleatorio de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos

5 hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas diferentes de anticuerpo, de los cuales solamente uno tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se hace por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Trauneker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

10 De acuerdo con un enfoque diferente, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2, y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada

15 (CH 1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión diferentes, y se introducen por co-transfección en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas

20 usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales provoca altos rendimientos o cuando las proporciones no son de importancia particular.

25 En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones indeseadas de cadena de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de

30 inmunoglobulina en solamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales para generar anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986). De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento W096/27011, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivo celular recombinante. La superficie de contacto preferida comprende al menos una parte del dominio C<sub>H</sub>3 de un dominio

35 constante de anticuerpo. En este método, se reemplaza una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácido de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes sobre la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácido con las más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar la producción del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

40

45 Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células indeseadas (patente de Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes adecuados de entrecruzamiento son bien conocidos en la técnica, y se desvelan en la patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

50

También se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan et al., Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para

55 generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de formación de complejos de ditiol arsenito sódico para estabilizar ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados después se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB después se reconvierte en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

60

Los recientes progresos han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpo biespecífico completamente humanizada. Cada

65 fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse a células que

sobreexpresaban el receptor de ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

5 También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se re-oxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un fragmento se fuerzan a aparearse con los dominios  $V_L$  y  $V_H$  complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

20 Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

*(vi) Selección de anticuerpos con las propiedades deseadas*

25 Anteriormente se han descrito técnicas para generar anticuerpos. Se seleccionan aquellos anticuerpos que tienen las características descritas en este documento.

30 Para seleccionar anticuerpos que inducen muerte celular, pérdida de integridad de membrana indicada por, por ejemplo, la captación de PI, azul de tripano o 7AAD, que se evalúa relativa al control. El ensayo preferido es el "ensayo de captación de PI usando células BT474". De acuerdo con este ensayo, se cultivan células BT474 (que pueden obtenerse de la American Type Culture Collection [Rockville, MD]) en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM):F-12 de Ham (50:50) suplementado con FBS inactivado por calor al 10 % (Hyclone) y L-glutamina 2 mM. (Por tanto, el ensayo se realiza en ausencia de complemento y células efectoras inmunes). Las células BT474 se siembran a una densidad de  $3 \times 10^6$  por placa en placas de 100 x 20 mm y se dejan adherir durante una noche. El medio después se retira y se reemplaza con medio fresco solo o medio que contiene 10  $\mu\text{g/ml}$  del MAb apropiado. Las células se incuban durante un periodo de tiempo de 3 días. Después de cada tratamiento, se lavan las monocapas con PBS y se desprenden por tratamiento con tripsina. Las células después se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C, se resuspende el sedimento en 3 ml de tampón de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  enfriado en hielo (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM) y se separa en alícuotas en tubos de 12 x 75 con tapón de filtro de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de los grumos celulares. Los tubos después reciben PI (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y el software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Se seleccionan aquellos anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular determinada por captación de PI.

45 Para seleccionar anticuerpos que inducen apoptosis, está disponible un "ensayo de unión de anexina usando células BT474". Las células BT474 se cultivan y siembran en placas como se ha analizado en el párrafo precedente. El medio después se retira y se reemplaza con medio fresco solo o medio que contiene 10  $\mu\text{g/ml}$  del MAb. Después de un periodo de incubación de tres días, se lavan las monocapas con PBS y se desprenden por tratamiento con tripsina. Las células después se centrifugan, se resuspenden en tampón de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  y se separan en alícuotas en tubos como se ha analizado anteriormente para el ensayo de muerte celular. Los tubos después reciben anexina marcada (por ejemplo, anexina V-FTIC) (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y el software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Se seleccionan aquellos anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión de anexina relativa al control como anticuerpos inductores de apoptosis.

55 Además del ensayo de unión de anexina, está disponible un "ensayo de tinción de ADN usando células BT474". Para realizar este ensayo, se incuban células BT474 que se han tratado con el anticuerpo de interés como se ha descrito en los dos párrafos precedentes con 9  $\mu\text{g/ml}$  de HOECHST 33342™ durante 2 h a 37 °C, después se analizan en un citómetro de flujo EPICS ELITE™ (Coulter Corporation) usando el software MODFITLT™ (Verity Softwson House). Pueden seleccionarse anticuerpos que inducen un cambio en el porcentaje de células apoptóticas que es 2 veces o mayor (y preferiblemente 3 veces o mayor) que las células no tratadas (hasta el 100 % de células apoptóticas) como anticuerpos pro-apoptóticos usando este ensayo.

65 Para seleccionar anticuerpos que se unen a un epítipo sobre ErbB2 unido por un anticuerpo de interés, puede realizarse un ensayo rutinario de bloqueo cruzado tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse mapeado de

epítomos por métodos conocidos en la técnica.

Para identificar anticuerpos anti-ErbB2 que inhiben el crecimiento de células SKBR3 en cultivo celular en un 50-100 %, puede realizarse el ensayo de SKBR3 descrito en el documento WO89/06692. De acuerdo con este ensayo, se cultivan células SKBR3 en una mezcla 1:1 de medio F12 y DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina y penicilina-estreptomicina. Las células SKBR3 se siembran a 20.000 células en una placa de cultivo celular de 35 mm (2 ml/placa de 35 mm). Se añaden 2,5 µg/ml del anticuerpo anti-ErbB2 por placa. Después de seis días, se cuenta la cantidad de células, en comparación con las células no tratadas usando un contador celular electrónico COULTER™. Se seleccionan aquellos anticuerpos que inhiben el crecimiento de las células SKBR3 en un 50-100 % para su combinación con los anticuerpos apoptóticos según se desee.

(vii) *Diseño por ingeniería de la función efectora*

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, para potenciar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer, por ejemplo. Por ejemplo puede introducirse uno o más restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener capacidad de internalización mejorada y/o eliminación celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) aumentadas. Véase Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad anti-tumoral potenciada usando agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales como se describe en Wolff et al. Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Como alternativa, puede por ingeniería un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y de este modo puede tener capacidades potenciadas de lisis por complemento y ADCC. Véase Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

(viii) *Inmunoconjugados*

La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo descrito en este documento conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Anteriormente se han descrito agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Está disponible diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos anti-ErbB2 radioconjugados. Ejemplos incluyen  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  y  $^{186}\text{Re}$ .

Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se preparan usando diversos agentes de acoplamiento proteico bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), éteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazo-niumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisocianato), y compuestos bis-flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al. Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el direccionamiento tumoral en que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y después la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

(ix) *Inmunoliposomas*

Los anticuerpos anti-ErbB2 desvelados en este documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contiene el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); y las patentes de Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545. Se desvelan liposomas con tiempo potenciado en circulación en la patente de Estados Unidos N° 5.013.556.

Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-

PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse a los liposomas como se describe en Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente hay un agente quimioterapéutico contenido dentro del liposoma. Véase, Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989).

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

Los anticuerpos también pueden usarse en ADEPT conjugando el anticuerpo a una enzima de activación de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, véase el documento WO81/01145) en un fármaco anti-cáncer activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la patente de Estados Unidos N° 4.975.278.

El componente enzimático del inmunocombinado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal modo que lo convierta en su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles incluyen, aunque sin limitación, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contiene sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anti-cáncer, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de serrata, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contiene péptido en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácidos; enzimas de escisión de carbohidratos tales como  $\beta$ -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres;  $\beta$ -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con  $\beta$ -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", pueden usarse para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 [1987]). Los conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse como se ha descrito en este documento para el suministro de la abzima a una población de células tumorales.

Las enzimas pueden unirse covalentemente a los anticuerpos anti-ErbB2 mediante técnicas bien conocidas en la técnica tales como el uso de los reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales analizados anteriormente. Como alternativa, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo unida a al menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la invención usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger et al., Nature. 312: 604-608 [1984]).

(xi) *Fusiones de anticuerpo-epítipo de unión a receptor de rescate*

En ciertas realizaciones de la invención, puede ser deseable usar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intacto, para aumentar la penetración en el tumor, por ejemplo. En este caso, puede ser deseable modificar el fragmento de anticuerpo para aumentar su semi-vida en suero. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión a receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo (por ejemplo, mediante mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o incorporando el epítipo en una marca peptídica que después se fusiona al fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el centro, por ejemplo, por síntesis de ADN o peptídica).

Un método sistemático para preparar dicho anticuerpo variante que tiene semi-vida aumentada *in vivo* comprende varias etapas. La primera implica identificar la secuencia y conformación de un epítipo de unión a receptor de rescate de una región Fc de una molécula IgG. Una vez identificado este epítipo, se modifica la secuencia del anticuerpo de interés para que incluya la secuencia y conformación del epítipo de unión identificado. Después de mutar la secuencia, se ensaya el anticuerpo variante para ver si tiene mayor semi-vida *in vivo* que la del anticuerpo original. Si el anticuerpo variante no tiene mayor semi-vida *in vivo* tras el ensayo, se altera adicionalmente su secuencia para que incluya la secuencia y conformación del epítipo de unión identificado. El anticuerpo alterado se ensaya para una semi-vida *in vivo* más larga, y este proceso se continúa hasta que se obtiene una molécula que muestra una mayor semi-vida *in vivo*.

El epítipo de unión a receptor de rescate que se incorpora de este modo en el anticuerpo de interés es cualquiera de dichos epítipos adecuados definidos anteriormente, y su naturaleza dependerá, por ejemplo, del tipo de anticuerpo que se esté modificando. La transferencia se hace de modo que el anticuerpo de interés aún posea las actividades biológicas descritas en este documento.

El epítipo preferiblemente constituye una región en que uno cualquiera o más restos aminoácidos de uno o dos bucles de un dominio Fc se transfieren a una posición análoga del fragmento de anticuerpo. Incluso más preferiblemente, se transfieren tres o más restos de uno o dos bucles del dominio Fc. Aún más preferido, el epítipo se coge del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo, de una IgG) y se transfiere a la región CH1, CH3, o V<sub>H</sub>, o más



de una de dichas regiones, del anticuerpo. Como alternativa, el epítipo se coge del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región C<sub>L</sub> o región V<sub>L</sub>, o ambas, del fragmento de anticuerpo.

5 En una realización más preferida, el epítipo de unión a receptor de rescate comprende la secuencia (5' a 3'):  
 5 PKNSSMISNTP (SEC ID N° 3), y opcionalmente comprende adicionalmente una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en HQSLGTQ (SEC ID N° 4), HQNLSDGK (SEC ID N° 5), HQNISDGK (SEC ID N° 6), o VISSLGQ (SEC ID N° 7), particularmente cuando el fragmento de anticuerpo es un Fab o F(ab')<sub>2</sub>. En otra realización más preferida, el epítipo de unión a receptor de rescate es un polipéptido que contiene la secuencia o secuencias (5' a 3'): HQNLSDGK (SEC ID N° 5), HQNISDGK (SEC ID N° 6), o VISSLGQ (SEC ID N° 7) y la  
 10 secuencia: PKNSSMISNTP (SEC ID N° 3).

#### (xii) Purificación del anticuerpo anti-ErbB2

15 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como primera etapa, se retiran los desechos particulados, ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se descongela la pasta celular en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente  
 20 30 min. Los desechos celulares pueden retirarse por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión primero se concentran preferiblemente usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

25 La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas humanas  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2, o  $\gamma$ 4 (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 [1983]). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para  $\gamma$ 3 humana (Guss et al., *EMBO J.* 5:15671575 [1986]). La matriz a la que se adhiere el ligando de afinidad se muy frecuentemente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que  
 30 pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C<sub>H</sub>3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. También están disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poliácido aspártico), cromatografía en SDS-PAGE, y precipitación en sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo a recuperar.

35 Tras cualquier etapa o etapas preliminares de purificación, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferiblemente realizada a bajas concentraciones salinas (por ejemplo, sal aproximadamente 0-0,25 M).

### III. Formulaciones farmacéuticas

40 Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos usadas de acuerdo con la presente invención se preparan para su almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes, o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbenzilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propil parabenos; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

65 La formulación en este documento también puede contener más de un compuesto activo, según sea necesario, para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente aquellas con actividades complementarias que no se

afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar adicionalmente anticuerpos que se unen a EGFR, ErbB2 (por ejemplo, un anticuerpo que se une a un epítipo diferente en ErbB2), ErbB3, ErbB4, o factor endotelial vascular (VEGF) en la formulación. Como alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente citotóxico, citoquina o agente inhibidor del crecimiento, con la condición de que el agente

5 citotóxico sea diferente de un derivado de antraciclina, por ejemplo, doxorrubicina, o epirubicina. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden introducirse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y

10 microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

15 Las formulaciones a usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas estériles de filtración.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando

20 dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de Estados Unidos Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$  etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato

25 de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como acetato de etilvinilo y ácido láctico-ácido glicólico posibilitan la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan las proteínas durante periodos más cortos de tiempo. Cuando los anticuerpos encapsulados en el organismo durante un largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, provocando una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales

30 para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los restos sulfhidrido, liofilizando en soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones específicas de matrices poliméricas.

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

Los anticuerpos son para administrarse a un paciente humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa en forma de bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía

40 intramuscular, intraperitoneal, intracerebromedular, subcutánea, intra-articular, intrasinoval, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Se prefiere la administración intravenosa del anticuerpo.

El tratamiento implica la administración combinada de un anticuerpo anti-ErbB2 y un agente quimioterapéutico que es un taxoide, en ausencia de un derivado de antraciclina. La administración combinada incluye coadministración,

45 usando formulaciones diferentes o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, donde existe preferiblemente un periodo de tiempo en que ambos (o todos) los agentes activos ejercen de forma simultánea sus actividades biológicas. La preparación y programas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según determine empíricamente el especialista en la técnica. La preparación y programas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service Ed.*, M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente

50 quimioterapéutico puede preceder, o seguir a la administración del anticuerpo o puede darse simultáneamente con el mismo. El anticuerpo puede combinarse con un compuesto anti-estrógenos tal como tamoxifeno o un agente anti-progesterona tal como onapristona (véase, el documento EP 616 812) en dosificaciones conocidas para dichas moléculas.

También puede ser deseable administrar anticuerpos contra antígenos asociados a otros tumores, tales como anticuerpos que se unen a EGFR, ErbB3, ErbB4, o el factor endotelial vascular (VEGF). Como alternativa, o

55 adicionalmente, pueden co-administrarse dos o más anticuerpos anti-ErbB2 al paciente. A veces, puede ser beneficioso administrar también una o más citoquinas al paciente. En una realización preferida, el anticuerpo contra ErbB2 se co-administra con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento puede administrarse primero, seguido del anticuerpo contra ErbB2. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración del anticuerpo contra ErbB2 primero. Las dosificaciones adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son aquellas usadas actualmente y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el anticuerpo anti-ErbB2.

60

65 Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosificación apropiada del anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo se

administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico asistente. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

- 5 Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones diferentes, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, se mantiene el tratamiento hasta que sucede una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

15 Se proporciona información adicional respecto a dosificaciones adecuadas en el siguiente Ejemplo.

#### V. Artículos de fabricación

Puede proporcionarse un artículo de fabricación que contenga materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente, una etiqueta y un prospecto. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente alberga una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener una vía de acceso (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-ErbB2. La etiqueta en, o asociada con, el recipiente indica que la composición se usa para tratar una afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas. Además, el artículo de fabricación comprende un prospecto con instrucciones para su uso, incluyendo advertencias de que la composición no debe usarse en combinación con agentes quimioterapéuticos de tipo antraciclina, por ejemplo, doxorubicina, o epirubicina.

#### Depósito de materiales

35 Las siguientes líneas celulares de hibridoma se han depositado en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, EEUU (ATCC):

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

Se ilustran detalles adicionales de la invención mediante el siguiente Ejemplo no limitante.

#### 45 Ejemplo

##### Materiales y métodos

50 *Anticuerpo monoclonal anti-ErbB2.* El anticuerpo monoclonal murino IgG<sub>1κ</sub> anti-ErbB2 4D5, específico para el dominio extracelular de ErbB2, se produjo como se describe en Fendly et al., Cancer Research 50:1550-1558 (1990) y el documento WO89/06692. En resumen, se recogieron células NIH 3T3/HER2-3<sub>400</sub> (que expresan aproximadamente 1 x 10<sup>5</sup> moléculas ErbB2/célula) producidas como se describe en Hudziak et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84:7159 (1987) con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía EDTA 25 mM y se usaron para inmunizar ratones BALB/c. Se dio a los ratones inyecciones i.p. de 10<sup>7</sup> células en 0,5 ml de PBS en las semanas 0, 2, 5 y 7. Se dio a los ratones con antisueros que inmunoprecipitaban ErbB2 marcado con <sup>32</sup>P inyecciones i.p. de un extracto de membrana de ErbB2 purificado con aglutinina de germen de trigo-Sefarose (WGA) en las semanas 9 y 13. Esto vino seguido por una inyección i.v. de 0,1 ml de la preparación de ErbB2 y se fusionaron los esplenocitos con la línea de mieloma de ratón X63-Ag8.653. Los sobrenadantes de hibridoma se exploraron para la unión de ErbB2 por ELISA y radioinmunoprecipitación. Se usó MOPC-21 (IgG<sub>1</sub>), (Cappell, Durham, NC), como control coincidente de isotipo.

65 El tratamiento se realizó con una versión humanizada del anticuerpo 4D5 murino (HERCEPTIN®). El anticuerpo humanizado se diseñó por ingeniería insertando las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo 4D5 murino en la región flanqueante de una inmunoglobulina IgG<sub>1</sub> (IgG<sub>1</sub>) humana consenso (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-4289 [1992]). El anticuerpo monoclonal humanizado anti-ErbB2 resultante tiene alta afinidad por p185<sup>HER2</sup> (constante de disociación [K<sub>d</sub>]=0,1 nmol/l), inhibe de forma marcada *in vitro* y en xenoinjertos

humanos el crecimiento de células de cáncer de mama que contienen altos niveles de p185<sup>HER2</sup>, induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), y se ha hallado clínicamente activo, como único agente, en pacientes con cánceres de mama metastásicos que sobreexpresan ErbB2 que habían recibido terapia previa extensiva. HERCEPTIN® se produce por una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) diseñada por ingeniería genética, cultivada a gran escala, que secreta el anticuerpo en el medio de cultivo. El anticuerpo se purifica del medio de cultivo CHO usando métodos convencionales de cromatografía y filtración. Cada lote de anticuerpo usado en este estudio se ensayó para verificar la identidad, pureza y potencia, así como para cumplir los requisitos de la Food and Drug Administration para esterilidad y seguridad.

10 *Criterios de elegibilidad.* Los pacientes tenían que cumplir todos los siguientes criterios para ser elegibles para su admisión en el estudio:

- Cáncer de mama metastásico
- Sobreexpresión del oncogén ErbB2 (HER2) (2+ a 3+ determinado por inmunohistoquímica o hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH). [La expresión tumoral de ErbB2 puede determinarse por análisis inmunohistoquímico, como se ha descrito previamente (Slamon *et al.*, [1987] y [1989], *supra*), de una serie de secciones delgadas preparadas a partir de bloques de tumor archivados en parafina del paciente. El anticuerpo de detección primario usado es el MAb murino 4D5, que tiene las mismas CDR que el anticuerpo humanizado usado para el tratamiento. Se considera que los tumores sobreexpresan ErbB2 si al menos el 25 % de las células tumorales muestran tinción característica en membrana para p185<sup>HER2</sup>].
- Enfermedad bidimensionalmente medible (incluyendo lesiones óseas líticas) por medios radiográficos, exploración física o fotografías.

25 Enfermedad medible se definió como cualquier masa medible de forma reproducible en dos diámetros perpendiculares por exploración física, rayos X (películas simples), tomografía computarizada (TC), imágenes de resonancia magnética (RM), ultrasonidos o fotografías.

30 Las metástasis osteoblásticas, efusiones pleurales, o ascitis no se consideraron medibles. Las lesiones medibles deben de ser de al menos 1 cm en su dimensión mayor. La enumeración de los sitios evaluables de enfermedad metastásica y número de lesiones en un sitio evaluable (por ejemplo, pulmón) tuvieron que registrarse en el formulario de informe de casos (CRF) apropiado. Si estaba presente una gran cantidad de lesiones pulmonares o hepáticas, se siguieron las seis lesiones mayores por sitio.

- La capacidad de entender y desear firmar un formulario de consentimiento informado por escrito.
- Mujeres  $\geq$  de 18 años.
- Candidatos adecuados para recibir quimioterapia citotóxica concomitante evidenciado por evaluaciones de laboratorio de exploración de funciones hematológica, renal, hepática, y metabólica.

40 *Criterios de exclusión.* Se excluyeron de entrar en el estudio los pacientes con cualquiera de los siguientes:

- Quimioterapia citotóxica previa para cáncer de mama metastásico. Los pacientes pueden haber recibido terapia hormonal previa (por ejemplo, tamoxifeno) para enfermedad metastásica o terapia citotóxica en el ámbito adyuvante.
- Neoplasia concomitante que no se ha tratado de forma curativa.
- Un estado de funcionamiento de  $< 60$  % en la escala de Kamofsky.
- Mujeres embarazadas o lactantes; mujeres con potencial de tener niños, salvo que usen anticonceptivos eficaces determinados por el investigador.
- Cáncer de mama bilateral (los tumores primarios deben tener una sobreexpresión 2+ a 3+ de HER2, o el sitio metastásico debe de tener una sobreexpresión 2+ a 3+ de HER2).
- Uso de agentes en investigación o sin licencia en los 30 días previos a la entrada en el estudio.
- Metástasis clínicamente inestable o no tratada al cerebro (por ejemplo, que requiere radioterapia).

55 Basándose en los criterios anteriores, se eligieron 469 pacientes, y se incluyeron en el estudio. La mitad de los pacientes (estratificados por quimioterapia) se asignaron aleatoriamente a recibir adicionalmente el anticuerpo HERCEPTIN® (véase a continuación).

#### *Administración y dosificación*

##### Anticuerpo anti-ErbB2

60 En el día 0, se administró por vía intravenosa una dosis de 4 mg/kg de anticuerpo humanizado anti-ErbB2 (HERCEPTIN®, H), durante un periodo de 90 minutos. Comenzando en el día 7, los pacientes recibieron semanalmente administración de 2 mg/kg de anticuerpo (i.v.) durante un periodo de 90 minutos.

65

Quimioterapia

Los pacientes recibieron uno de dos regímenes de quimioterapia durante un mínimo de seis ciclos, con la condición de que su enfermedad no estuviera progresando: a) ciclofosfamida y doxorubicina o epirubicina (AC), si los pacientes no han recibido terapia con antraciclina en el ámbito adyuvante, o b) paclitaxel (T, TAXOL®), si los pacientes han recibido alguna terapia con antraciclina en el ámbito adyuvante. La dosis inicial del anticuerpo HERCEPTIN® precedió el primer ciclo de cualquier régimen quimioterapéutico en 24 horas. Las dosis posteriores del anticuerpo se dieron inmediatamente antes de la administración de quimioterapia, si la dosis inicial del anticuerpo se toleró bien. Si la primera dosis del anticuerpo no se toleró bien, las posteriores infusiones continuaron precediendo la administración de quimioterapia en 24 horas. Se permitió que los pacientes continuaran recibiendo quimioterapia más allá de seis ciclos si, en opinión del médico que estuviera tratando, seguían recibiendo beneficio del tratamiento.

Se dio ciclofosfamida (600 mg/m<sup>2</sup>) por impulso iv durante un periodo mínimo de 3 minutos o por infusión durante un periodo máximo de 2 horas.

Se dio doxorubicina (60 mg/m<sup>2</sup>) o epirubicina (75 mg/m<sup>2</sup>) por lento impulso iv durante un periodo mínimo de 3-5 minutos o por infusión durante un periodo máximo de 2 horas, de acuerdo con el protocolo de la institución.

Se dio paclitaxel (TAXOL®) a una dosis de 175 mg/m<sup>2</sup> durante 3 horas por administración intravenosa. Todos los pacientes que recibieron paclitaxel se pre-medicaron con dexametasona (o su equivalente) 20 mg x 2, administrado por vía oral 12 y 6 horas antes de paclitaxel; difenidramina (o su equivalente) 50 mg, iv, administrado 30 minutos antes de paclitaxel, y dimetidina (u otro bloqueante H<sub>2</sub>) 300 mg, iv administrado 30 minutos antes de paclitaxel.

*Criterios de respuesta*

Enfermedad progresiva. Evidencias objetivas de un aumento del 25 % o más de cualquier lesión medible. La enfermedad progresiva también incluye aquellos casos en que han aparecido nuevas lesiones. Para lesiones óseas, la progresión se define como un aumento del 25 % en la medición objetiva por película sencilla, TC, RM; nuevas lesiones sintomáticas no debidas a fractura; o necesidad de radioterapia paliativa.

Respuesta completa. Desaparición de todo tumor radiográfica y/o visualmente evidente durante un mínimo de 4 semanas. Las respuestas completas de la piel y la pared torácica tuvieron que confirmarse por biopsia.

Respuesta parcial. Una reducción de al menos el 50 % en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones medibles durante un periodo mínimo de 4 semanas. No pueden haber aparecido nuevas lesiones, ni puede haber progresado ninguna lesión en tamaño.

Respuesta minoritaria. Una reducción del 25 % al 49 % en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones medibles. No pueden haber aparecido nuevas lesiones, ni puede haber progresado ninguna lesión en tamaño.

Enfermedad estable. Ningún cambio de más del 25 % en el tamaño de las lesiones medibles. No puede haber aparecido ninguna lesión.

El tiempo hasta la progresión del tumor (TTP) se calculó desde el inicio de la terapia hasta la progresión. Los límites de confianza para las tasas de respuesta se calcularon usando el método exacto para una única proporción. (Fleiss, JL, Statistical Methods for Rates and Proportions (2<sup>a</sup> ed.), Nueva York, NY, Wiley, 1981, pág. 13-17).

**Resultados**

En un seguimiento medio de 10,5 meses, las evaluaciones de tiempo hasta progresión de la enfermedad (TTP en meses) y tasas de respuesta (RR) mostraron un aumento significativo del efecto quimioterapéutico por HERCEPTIN®, sin aumento en los acontecimientos adversos (AA) graves globales:

	Incluidos	TTP(meses)	RR(%)	AA(%)
CRx	234	5,5	36,2	66
CRx +H	235	8,6*	62,00**	69
AC	145	6,5	42,1	71
AC+H	146	9,0	64,9	68
T	89	4,2	25,0	59
T+H	89	7,1	57,3	70

\* p<0,001 por ensayo de rango log

\*\* p<0,01 por ensayo X<sup>2</sup>

CRx: quimioterapia

AC: tratamiento con antraciclina/ciclofosfamida  
H: HERCEPTIN®  
T: TAXOL®

---

5 Se informó de un síndrome de disfunción de miocardio similar al observado con antraciclinas de forma más habitual con un tratamiento combinado de AC+H (18 % de grado 3/4) que con AC solo (3 %), T (0 %), o T+H (2 %).

Estos datos indican que la combinación de tratamiento con anticuerpo anti-ErbB2 con quimioterapia aumenta de forma marcada el beneficio clínico, evaluado por tasas de respuesta y la evaluación de progresión de la enfermedad.

10 Sin embargo, debido a los efectos secundarios cardiacos aumentados de doxorubicina o epirrubicina, el uso combinado de antraciclinas con terapia de anticuerpo anti-ErbB2 está contraindicado. Los resultados, tomando en cuenta los riesgos y beneficios, favorecen el tratamiento combinado con HERCEPTIN® y paclitaxel (TAXOL®).

Listado de Secuencias

15 <110> Genentech, Inc.

<120> TRATAMIENTO CON ANTICUERPOS ANTI-ErbB2

20 <130> P1256R2PCT

<150> US 60/069.346

<151> 12-12-1997

25 <160> 9

<210> 1

<211> 166

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 450 922 T3

Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu  
 1 5 10 15  
 Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val  
 20 25 30  
 Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser  
 35 40 45  
 Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu  
 50 55 60  
 Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg  
 65 70 75  
 Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala  
 80 85 90  
 Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr  
 95 100 105  
 Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu  
 110 115 120  
 Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln  
 125 130 135  
 Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys  
 140 145 150  
 Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg  
 155 160 165  
 Ala  
 166

5 <210> 2  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln  
 20 25 30

10 Gly Cys  
 32

15 <210> 3  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

ES 2 450 922 T3

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

5 <210> 4  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 4

10 His Gln Ser Leu Gly Thr Gln  
 1 5 7

15 <210> 5  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 5

20 His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys  
 1 5 8

25 <210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 6

30 His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys  
 1 5 8

35 <210> 7  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 7

40 Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln  
 1 5 8

45 <210> 8  
 <211> 59  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 8

Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val  
 1 5 10 15  
 Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln  
 20 25 30  
 Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val  
 35 40 45  
 Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg  
 50 55 59



ES 2 450 922 T3

<210> 9  
<211> 65  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 9

```
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr
  1                5                10                15
Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr
                20                25                30
Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys
                35                40                45
Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu
                50                55                60
Gly Ala Cys Gln Pro
                65
```

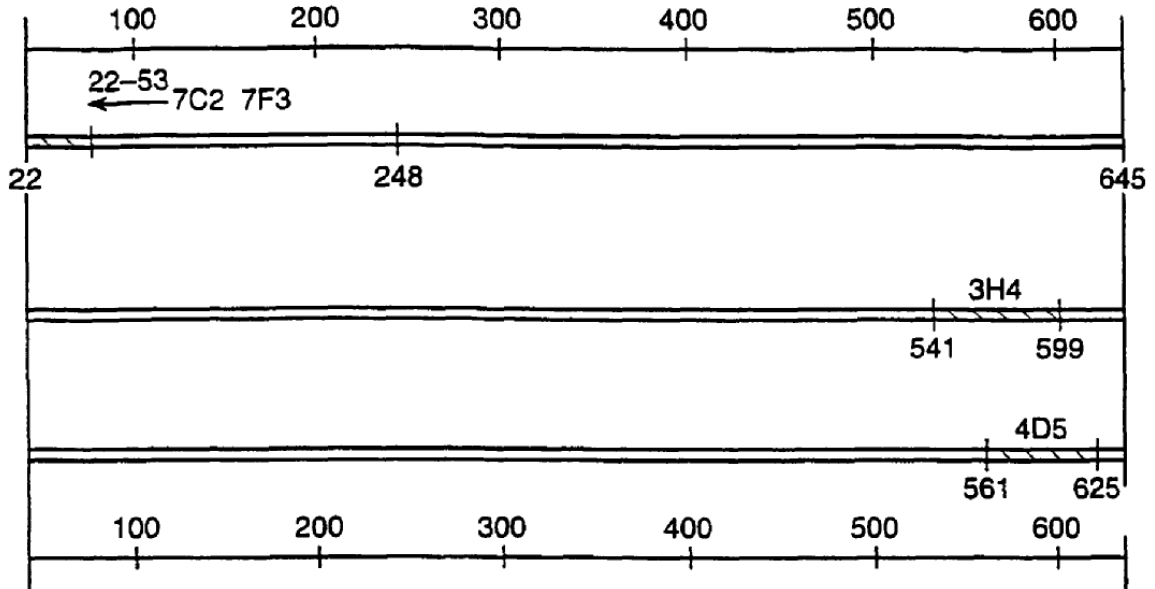
10

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un anticuerpo anti-ErbB2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento para proporcionar beneficio clínico medido por el aumento del tiempo hasta la progresión de la enfermedad de cáncer de mama maligno **caracterizado por** la sobreexpresión de ErbB2 en un paciente humano, en el que dicho anticuerpo se une al epítipo 4D5 dentro de la secuencia del dominio extracelular de ErbB2 determinado por ensayo de bloqueo cruzado usando dicho anticuerpo y anticuerpo 4D5 obtenible del depósito ATCC CRL 10463, y en el que el medicamento es para administración combinada del anticuerpo con un agente quimioterapéutico que es un taxoide y no en combinación con un derivado de antraciclina, en el que la administración combinada tiene eficacia clínica medida por la determinación del tiempo hasta la progresión de la enfermedad y disfunción de miocardio reducida en comparación con administración combinada del anticuerpo y derivados de antraciclina.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cáncer de mama es carcinoma de mama metastásico.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal intacto.
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo humanizado comprende un Fc de inmunoglobulina humana.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo se une a uno cualquiera o más restos en la SEC ID N° 9.
7. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado anti-ErbB2 4D5, en el que el anticuerpo anti-ErbB2 4D5 se puede obtener del depósito ATCC CRL 10463.
8. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho taxoide es paclitaxel.
9. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho taxoide es docetaxel.
10. Un anticuerpo anti-ErbB2 para su uso en un método de tratamiento para proporcionar beneficio clínico medido por el aumento del tiempo hasta la progresión de la enfermedad de cáncer de mama maligno **caracterizado por** la sobreexpresión de ErbB2 en un paciente humano, en el que dicho anticuerpo se une al epítipo 4D5 dentro de la secuencia del dominio extracelular de ErbB2 determinado por un ensayo de bloqueo cruzado usando dicho anticuerpo y anticuerpo 4D5 obtenible del depósito ATCC CRL 10463, y en el que el método comprende administración combinada del anticuerpo con un agente quimioterapéutico que es un taxoide y no en combinación con un derivado de antraciclina, en el que la administración combinada tiene eficacia clínica medida por la determinación del tiempo hasta la progresión de la enfermedad y disfunción de miocardio reducida en comparación con administración combinada del anticuerpo y derivados de antraciclina.
11. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho cáncer de mama es carcinoma de mama metastásico.
12. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal intacto.
13. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
14. El anticuerpo para uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el anticuerpo humanizado comprende un Fc de inmunoglobulina humana.
15. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho anticuerpo se une a uno cualquiera o más restos en la SEC ID N° 9.
16. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado anti-ErbB2 4D5, en donde el anticuerpo anti-ErbB2 4D5 se puede obtener del depósito ATCC CRL 10463.
17. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en donde dicho taxoide es paclitaxel.

18. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en donde dicho taxoide es docetaxel.

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



epítopo 3H4 (SEC ID N° 8)

VEECRVLQGLPREYVNRHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFFCVAR  
 | |  
 541 599

epítopo 4D5 (SEC ID N° 9)

LPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFFCVARCP SGVKPDL SYMPIWKFPDEEGACQP  
 | |  
 561 625

**FIG.\_1**

1 MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTMKLRLLPA  
 38 SPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFL  
 75 QDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDN  
 112 YALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEI  
 149 LKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLID  
 186 TNRSRA

**FIG.\_2**