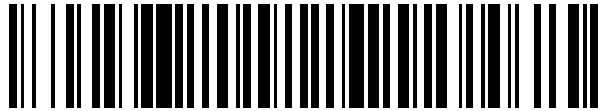


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 006**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 16/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2000 E 07119791 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 1889631**

54 Título: **Inhibición del crecimiento celular**

30 Prioridad:

**18.06.1999 AU PQ105799**

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

**03.12.2014**

73 Titular/es:

**ZENSUN (SHANGHAI) SCIENCE AND  
TECHNOLOGY LIMITED (100.0%)  
NO. 68 JU LI ROAD ZHANGJIANG HI-TECH PARK  
SHANGHAI 201203, CN**

72 Inventor/es:

**ZHOU, MINGDONG**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 524 006 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

Inhibición del crecimiento celular

**Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a métodos para detener el crecimiento celular aplicables al tratamiento y la terapia del cáncer.

**Antecedentes de la técnica**

El cáncer es una enfermedad letal importante para los seres humanos y es causado por la proliferación celular fisiológicamente incontrolada que afecta a las condiciones fisiológicas normales del cuerpo humano que dan como resultado graves reacciones patológicas que a menudo conducen a la muerte. Aunque se han hecho grandes esfuerzos en los estudios y tratamientos acerca del cáncer, actualmente el cáncer sigue todavía siendo la principal causa de muerte en los seres humanos. Hay múltiples enfoques para tratar a los pacientes con cáncer que incluyen la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Como los dos primeros métodos no son capaces de eliminar completamente las células cancerosas en los pacientes, la última estrategia se usa mayoritariamente para controlar el crecimiento de las células cancerosas con o sin otros tratamientos. Los compuestos anticancerosos usados en los pacientes con cáncer apuntan frecuentemente a la prevención de la proliferación de las células cancerosas o a la muerte de las células en división. Cuando los compuestos son tóxicos para las células cancerosas también pueden afectar gravemente a las células normales en división que son necesarias para la vida humana. Por lo tanto, una de las principales direcciones en los estudios del cáncer es encontrar métodos que bloqueen o maten específicamente las células cancerosas sin afectar a la proliferación celular normal. Hoy en día hay una demanda de dicho tratamiento en los pacientes con cáncer.

Los ErbBs son receptores proteína tirosina quinasas de clase uno. La señalización celular mediada por ErbB juega un papel crítico en el desarrollo embrionario y la función de los órganos adultos. A nivel celular se ha demostrado que los receptores ErbB median en señales de proliferación, diferenciación, migración celulares y de reorganización de la estructura celular. Existen cuatro miembros ErbB similares estructuralmente, ErbB-1, ErbB-2, ErbB-3 y ErbB-4. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es uno de los varios ligandos que se unen a ErbB-1. ErbB-3 y ErbB-4 también se unen a varios ligandos, que incluyen neuregulina-1 (NRG-1). Hasta la fecha no se ha identificado ligando para ErbB-2. Sin embargo, ErbB-2 sirve como pareja para el heterodímero con ErbB-3, ErbB-4 o ErbB-1 y se encuentra esencialmente implicado en la señalización celular activada por NRG-1. Klapper et al. Oncogene, 1997, 14, página 2099-2109 da a conocer una subclase de anticuerpos monoclonales anti-ErbB-2 inhibidores de tumor, frente al receptor ErbB-2, que bloquean la interacción con otros receptores de factores de crecimiento.

Estudios *in vivo* que usan experimentos de modificación genética dirigida indican que los defectos en el desarrollo que resultan de la inactivación de ErbB-2 son similares a aquellos observados en animales con inactivación del NRG-1. Ambos animales presentan defectos en los ganglios linfáticos neurales craneales y en el desarrollo de las trabéculas del corazón. Es más, ratones con el gen ErbB-3 o ErbB-4 inactivado presentan fenotipos similares o solapantes al de los ratones deficientes en el gen NRG-1 o ErbB-2.

Además de su papel en el desarrollo, el gen ErbB-2 humano se amplifica con frecuencia y su proteína codificada está sobre-expresada en una variedad de carcinomas humanos. Las primeras investigaciones en ErbB-2 descubrieron que una mutación puntual oncogénica daba lugar a la formación de homodímeros de ErbB-2 que a su vez causaban una fosforilación significativa de los restos de tirosina en el dominio intracelular. Aunque no se ha encontrado la mutación puntual correspondiente en carcinomas humanos que sobre-expresan ErbB-2, la sobre-regulación de ErbB-2 conlleva a la formación de homodímeros que a su vez aumentan la fosforilación de tirosina en su dominio intracelular. Este proceso se plantea como hipótesis de que sea el inicio de la cascada de señales que desencadena la transformación y/o el crecimiento celulares y, por lo tanto, que inicia la tumorigénesis. Sin embargo hay evidencia que contradice la hipótesis de que los homodímeros de ErbB-2 son responsables de la iniciación de la tumorigénesis: i) algunos mutantes de ErbB-2 que están diseñados para aumentar la dimerización y la autofosforilación no tienen efecto en la transformación celular; ii) anticuerpos que se unen al dominio extracelular de ErbB-2 y que presumiblemente promueven la homodimerización conllevan la promoción del crecimiento de las células cancerosas que expresan ErbB-2. Estos datos indican que la homodimerización de ErbB-2 es insuficiente para la promoción del crecimiento celular o de la transformación celular, y que se necesitan otras condiciones, posiblemente que involucren la orientación o conformación específica del dímero.

ErbB-2 actúa como un componente del heterodímero para la unión al ligando de los receptores ErbB-3 o ErbB-4. El ligando, NRG-1, se ha identificado que tiene dos sitios de unión al receptor independientes: uno que tiene una alta afinidad por ErbB-3 o ErbB-4, y el otro que tiene una baja afinidad aunque no específica por todos los miembros ErbB. Por tanto, la exposición del NRG-1 a células que expresan ErbB-3/4 y ErbB-2 conllevaría a heterodímeros de ErbB-2 y ErbB-3/4. Sin embargo, en ausencia del ligando, no está claro si ErbB-2 tiene una afinidad con otros receptores ErbB y es posible que dicha interacción pudiera estar involucrada en la iniciación del cáncer. Entre todos los receptores ErbB, ErbB-3 es único porque: i) ErbB-2 forma preferencialmente heterodímeros con ErbB-3; ii) la co-transfección de las células NIH3T3 con ErbB-2 y ErbB-3 da como resultado niveles mucho más altos de

transformación celular que el de la transfección con ErbB-2 solo; iii) en células de cáncer de mama asociadas con la sobre-expresión de ErbB-2, también está ErbB-3 altamente expresado; iv) ErbB-3 está también sobre-expresado en células tumorales que sobre-expresan ErbB-2 de ratones transgénicos ErbB-2.

5 Los autores de la presente invención estudiaron el papel de los ErbBs y sus interacciones en el crecimiento y en la inhibición celulares. De manera importante, se encontró que la formación de los homo- y heterodímeros de ErbBs puede jugar un papel en la proliferación celular, sobre todo en las células cancerosas.

**Descripción de la invención**

10 Los autores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que la expresión de ErbB-2 conduce a la inhibición de la transformación celular oncogénica mediada por Ras. Es más, los autores de la presente invención han encontrado que la formación del heterodímero ErbB-2/ErbB-3 conduce a la estimulación del crecimiento celular, particularmente en las células cancerosas.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de detener o inhibir el crecimiento celular, cuyo método comprende la prevención o la reducción de la formación del heterodímero ErbB-2/ErbB-3 en una célula de modo que detenga o inhiba el crecimiento de la célula.

15 Preferiblemente la célula es una célula cancerosa, más preferiblemente un célula de cáncer de mama humano.

Un forma de llevar a cabo el método de acuerdo con la presente invención, es tratar la célula con un agente adecuado. De acuerdo con la invención, el agente es un anticuerpo anti-ErbB-3, donde el anticuerpo anti-ErbB-3 previene o reduce la formación del heterodímero ErbB-2/ErbB-3.

20 La dimerización de ErbB-2 puede estar causada por múltiples mediadores, por ejemplo, un alto nivel de expresión de ErbB-2, anticuerpos que se unen al dominio extracelular de ErbB-2. La detención del crecimiento activado por ErbB-2 puede superar la transformación celular activada por el gen oncogénico Ras sugiriendo un uso terapéutico de la dimerización de ErbB-2. Los autores de la presente invención han encontrado que ErbB-2 interacciona realmente con otros miembros ErbB como ErbB-3. Es más, se encontró que la formación del complejo ErbB-2/ErbB-3 es independiente de la estimulación por el ligando (neuregulina 1). La presencia ErbB-3 en células que expresan ErbB-2 era capaz de bloquear de forma suficiente la detención del crecimiento celular activada por el homodímero ErbB-2. De hecho, ErbB-3 se expresa habitualmente en células cancerosas que expresan ErbB-2 lo que permite el crecimiento de las células cancerosas. Este hallazgo indica que moléculas que son capaces de bloquear la interacción entre ErbB-2 y otras proteínas de membrana ayudará o mejorará la homodimerización de ErbB-2. Ya que ErbB-2 nativo es la principal forma sobre-expresada en las células cancerosas, este descubrimiento permite que se desarrollen nuevos métodos para tratar a los pacientes con cáncer que poseen células cancerosas que expresan ErbB-2.

25  
30

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método de terapia del cáncer, cuyo método comprende la prevención o la reducción de la formación del heterodímero ErbB-2/ErbB-3 en una célula cancerosa del paciente deteniendo o inhibiendo de ese modo el crecimiento de la célula cancerosa.

35 Preferiblemente la célula es una célula cancerosa, más preferiblemente un célula de cáncer de mama humano. De acuerdo con la invención, el agente es un anticuerpo anti-ErbB-3 capaz de prevenir o reducir la formación del heterodímero ErbB-2/ErbB-3 en la célula cancerosa sin afectar substancialmente de manera adversa a las células del paciente. Uno o más agentes pueden actuar mediante la prevención o la reducción de la interacción de ErbB-2 con ErbB-3 en las células cancerosas.

40 Para su uso clínico en seres humanos serían más adecuados los anticuerpos humanizados de manera que se minimicen las complicaciones de la terapia. Se conocen muy bien las técnicas para el desarrollo de dichos anticuerpos y se pueden usar para desarrollar agentes adecuados que bloqueen, interrumpen o interfieran en la formación o las conformaciones del heterodímero ErbB-2/ErbB-3 en las células para detener o inhibir el crecimiento celular.

45 También están aquí descritos los compuestos que causan un alto nivel de expresión de ErbB-2 en la célula cancerosa, compuestos que se unen al dominio extracelular de ErbB-2 como anticuerpos y otros ligandos, y compuestos que previenen o reducen la expresión de ErbB-3 en una célula o que previenen la interacción de ErbB-3 con ErbB-2 en una célula. Otros agentes descritos incluyen constructos de expresión de DNA que contienen cDNAs que codifican proteínas/péptidos que pueden mediar o aumentar la homodimerización de ErbB-2 o prevenir o reducir la interacción entre ErbB-2 y otros miembros de ErbB, como ErbB-3. De acuerdo con la invención, estos compuestos son anticuerpos anti-ErbB-3. Los constructos de DNA se pueden suministrar mediante métodos de terapia génica, incluyendo transfección de DNA, infección con virus que portan los cDNAs, u otros métodos o sistemas de producción.

50

55 En un tercer aspecto, la presente invención consiste en el uso de un agente que previene o reduce la formación del heterodímero ErbB-2/ErbB-3 en una célula mediante detención o inhibición del crecimiento de la célula en la fabricación de un medicamento para la terapia del cáncer, donde el agente es un anticuerpo anti-ErbB-3.

Para su uso clínico en seres humanos serían más adecuados los anticuerpos humanizados de manera que se minimicen las complicaciones por la terapia. Se conocen muy bien las técnicas para el desarrollo de dichos anticuerpos y se pueden usar para desarrollar agentes adecuados que bloqueen, interrumpan o interfieran en la formación o las conformaciones del heterodímero ErbB-2/ErbB-3 en las células para detener o inhibir el crecimiento celular.

También está aquí descrito un método de prueba o de cribado de agentes de su idoneidad como agentes anticancerosos, el método comprende la exposición de una célula que expresa ErbB-2 y ErbB-3 al agente y la determinación del grado de heterodímero ErbB-2/ErbB-3 en la célula, donde una disminución del heterodímero ErbB-2/ErbB-3 y/o una inhibición de la transformación es indicativa del potencial anticanceroso del agente.

A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto indique lo contrario, la palabra "comprender" o variaciones como "comprende" o "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de un elemento declarado, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa, o grupos de elementos, enteros o etapas.

Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más claramente, las formas preferidas se describirán con referencia a los dibujos adjuntos.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. ErbB-2 interactúa con ErbB-3 en células NIH3T3 co-transfectadas con ErbB-2/ErbB-3 en ausencia de NRG-1. Las células NIH3T3 se transfectaron transitoriamente con ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2 con ErbB-3. Después de 48 horas, se trató una muestra co-transfectada con neuregulina 1 (NRG-1) (50 mM) durante 10 minutos. Se lisaron las células y los receptores se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-ErbB-2 o anti-ErbB-3. Los precipitados se separaron mediante PAGE al 8% y se analizaron mediante inmunotransferencia.

a) (panel superior) Análisis mediante inmunotransferencia con anticuerpo anti-fosfotirosina. Adviértase que los receptores ErbB-2 se fosforilaron en las células transfectadas con ErbB-2 y que el NRG-1 aumentó el nivel de fosforilación de los receptores en células co-transfectadas con ErbB-2/3.

a) (panel central) Análisis mediante inmunotransferencia con anticuerpo anti-ErbB-2. Los receptores ErbB-2 se detectaron en células transfectadas solamente con ErbB-2 y en células ErbB-2 co-transfectadas con ErbB-3. El NRG-1 también incrementó la interacción de ErbB-2 con ErbB-3.

a) (panel inferior) Análisis mediante inmunotransferencia con anticuerpo anti-ErbB-3. Todas las muestras exhibieron una banda principal de ErbB-3 (165 kDa) excepto las muestras con células transfectadas con ErbB-2.

b) Las células co-transfectadas con ErbB-2/3 se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-ErbB-2 y fosfotirosina. ErbB-3 y ErbB-2 se detectaron mediante inmunotransferencia (paneles de arriba a abajo, respectivamente). Adviértase que NRG-1 aumentó el nivel de fosforilación en tirosina y la interacción de ErbB-2 y ErbB-3. Por lo tanto, las interacciones ErbB-2/3 se manifiestan mediante este experimento de co-inmunoprecipitación.

Figura 2. ErbB-2 y ErbB-3 forman heterodímeros en células NIH3T3 co-transfectadas con ErbB-2 y ErbB-3, y los heterodímeros se identificaron mediante experimentos de entrecruzamiento.

a) Las células co-transfectadas con ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-2/3 se privaron de suero durante 12 horas. Las células control se estimularon con HRG b1 durante 10 minutos. El entrecruzamiento se llevó a cabo con el reactivo BS3 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lisaron e inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-ErbB-2 o anti-ErbB-3 y los agentes precipitantes se sometieron a PAGE al 4% y análisis mediante inmunotransferencia con un anticuerpo anti-ErbB-2 (panel superior), anticuerpo anti-fosfotirosina (panel central), y anticuerpo anti-ErbB-3 (panel inferior). Se muestra la posición de los dímeros y monómeros. Adviértase que NRG-1 provocó un desplazamiento de bandas en el heterodímero, pero no afectó al patrón de bandas del homodímero.

b) Un ensayo de entrecruzamiento similar de las células co-transfectadas con ErbB-2 y ErbB-3 sin privación de suero. Igual que arriba, se indican los dímeros y monómeros. Adviértase que se observa un desplazamiento de bandas similar en el dímero en respuesta a la estimulación con NRG-1.

Figura 3. Los heterodímeros ErbB-2 y ErbB-3 se identificaron en células de cáncer de mama humano en ausencia del ligando, neuregulina-1. Las células MDA-MB-453, BT-474 y SK-BR-3 se privaron de nutrientes en medio libre de suero durante 24 horas, y después se estimularon con NRG-1. Las células se lisaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-ErbB-3. Los agentes precipitantes se separaron entonces en SDS-PAGE al 8% y se sometieron a análisis por inmunotransferencia con anticuerpo anti-ErbB-2 (panel superior), anticuerpo anti-fosfotirosina (panel central) y anticuerpo anti-ErbB-3 (panel inferior). En todas las líneas celulares los receptores ErbB-2 co-inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-ErbB-3. El NRG-1 aumentó significativamente la interacción de los receptores ErbB-2 y ErbB-3 en estas líneas celulares de cáncer de mama (panel superior). NRG-1 también se ha demostrado que eleva el nivel de fosforilación de tirosina (panel central).

Figura 4. ErbB-3 se une a la proteína de señalización Shc en células NIH3T3 co-transfectadas con ErbB-2 y ErbB-3 y en células de cáncer de mama en ausencia de ligando.

- 5 a) Las células NIH3T3 co-transfectadas con ErbB-2, ErbB-3 o ErbB2/3 se privaron de nutrientes de suero durante 12 horas y se trataron con NRG-1. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-ErbB-3 y se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia. La co-inmunoprecipitación de Shc con anticuerpos anti-ErbB-2 y -ErbB-3 se detectó mediante un anticuerpo específico anti-Shc. La figura 4a muestra que las isoformas de 46 kDa y 52 kDa de Shc se co-precipitaron con anticuerpo anti-ErbB-2 en células co-transfectadas con ErbB-2 solo y con ErbB-2/3, y NRG-1 parece aumentar la unión de Shc a los receptores (panel inferior). El panel superior muestra los receptores ErbB-2 detectados mediante el anticuerpo anti-ErbB-2 en estas células transfectadas.
- 10 b) Las dos isoformas de Shc se co-inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-ErbB-3 en células de cáncer de mama. Advértase que Shc no se puede unir a los receptores de ErbB-3 en células transfectadas solo con ErbB-3. Las cuatro líneas celulares de cáncer de mama humano se privaron de nutrientes en medio libre de suero durante 12 horas y después se estimularon con el ligando, HRG b1, durante 10 minutos como se señala. Después se recogieron las células y se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpo anti-ErbB-3.
- 15 c) El ErbB-3 precipitado se detectó mediante el anticuerpo anti-ErbB-3 para la normalización de la cantidad de proteína ErbB-3.

Figura 5. Inhibición del crecimiento de las células de cáncer de mama humanas mediado por los anticuerpos anti-ErbB-2 y anti-ErbB-3 en ausencia de ligando, neuregulina-1. Las líneas celulares de cáncer de mama humano (A) BT-474, (B) SK-BR-3 y (C) MDA-MB-453 se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 2.000 células por pocillo. Después de la adherencia a las placas (16 h.), los cultivos se trataron con anticuerpos como se indica. La concentración de cada anticuerpo era como sigue: IgG 5 mg/ml; Ab5 (anticuerpo anti-ErbB-3) 2,5 mg/ml; N12 (anticuerpo anti-ErbB-2) 2,5 mg/ml. Los cultivos se dejaron crecer durante 14 días, el medio y los anticuerpos se repusieron en el día 7. Después de 14 días se determinaron los números de células usando el CellTiter 96® Aqueous kit de proliferación de células no radioactivas (Promega).

25 Figura 6. Formación de foco de constructos ErbB transfectados en células NIH3T3. Se cultivaron para la formación de foco células transfectadas con ErbB-2 o ErbB-3 nativo (WT) (fila superior), o co-transfectadas con ErbB-2/H-ras, ErbB-3/H-ras como se indican en el panel A. ErbB-2 nativo (WT), el mutante ErbB-2 V/E659659 (V659E) o H-ras solo se transfectaron en células para la formación de foco como se muestra en el panel B. Los focos se revelaron mediante tinción con Xileno.

### 30 Modos de llevar a cabo la invención

#### Procedimientos Experimentales

#### Materiales

La línea celular NIH3T3 y las líneas celulares de cáncer de mama, SK-BR-3, MDA-MB-453 y BT-474 se compraron en American Type Culture Collection. El reactivo de transfección LipofectAMINETM se obtuvo de Life Technologies, Inc. NRG-1 y los anticuerpos N12 y H3.105.5 se obtuvieron de Neo Markers. El reactivo de entrecruzamiento BS3 se obtuvo de PIERCE Chemical Company. El plásmido de expresión de ErbB-2 pRC/CMV-ErbB-2 que codifica el cDNA completo de ErbB-2 humano y el plásmido de expresión de ErbB-3 pCMVneo-HER3 que codifica el cDNA completo de ErbB-3 humano fueron amablemente proporcionados por los Drs. Rodney Fiddes y Roger Daly (The Garvan Institute of Medical Research, Darlinghurst, NSW 2010, Australia). Los anticuerpos que reconocen ErbB-2 (NCL-CB11 y NCL-PC11) se obtuvieron de Novocastra Laboratories Ltd. El anti-ErbB-3 se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology. El anti-Shc, anti-fosfotirosina (RC20:HRPO recombinante) se obtuvieron de Transduction Laboratories. Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano y los reactivos de quimioluminiscencia aumentada (ECL) se obtuvieron de NEN Life Science Products

#### Cultivos celulares y transfecciones transitorias

45 Las células NIH3T3 y de cáncer de mama se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dubelcco (DMEM) enriquecido con suero de ternera fetal al 10% (FBS) y el antibiótico selectivo a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Las NIH3T3 se transfectaron con el plásmido de DNA de ErbB-2 y de ErbB-3 individualmente o en combinación usando el reactivo LipofectAMINETM según las instrucciones del fabricante. Los experimentos se iniciaron 48 horas después de la transfección. Las células se privaron durante 18 horas en medio DMEM antes de la estimulación con factor de crecimiento.

#### Inmunoprecipitación y análisis mediante Inmunotransferencia

55 Para el análisis de los receptores ErbB y las proteínas asociadas se lavaron las células transfectadas ( $1-2 \times 10^8$ ) con PBS frío y se solubilizaron con 1 ml de tampón de lisis (Tris 50 mM [pH 7,4], EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, ortovanadato sódico 2 mM, fluoruro sódico 50 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM, cóctel de inhibidores de proteasas en hielo (Boehringer). Los lisados se incubaron con proteína A (Sigma) o proteína G

(Amersham Pharmacia Biotech) Sepharosa a 4°C durante 60 minutos en un rotor orbital antes de ser aclarados por centrifugación a 13.000 g durante 15 minutos. Para las inmunoprecipitaciones, se incubaron los lisados celulares con anticuerpos específicos durante 60 minutos a 4°C. Los inmunocomplejos se recogieron con proteína A o proteína G Sepharosa y se lavaron 4 veces con tampón de lisis. Los lisados celulares o las proteínas inmunoprecipitadas se solubilizaron por ebullición en tampón de muestra y se sometieron a SDS-PAGE. Las proteínas se electrotransferieron a membranas de PVDF. Después del bloqueo con leche descremada al 5% en PBS con Tween 20 al 0,02% a 4°C durante toda la noche, las membranas se sondearon con anticuerpos primarios seguido de anticuerpos secundarios, cada uno durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las proteínas se visualizaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano mediante el uso del reactivo de quimioluminiscencia aumentada (NEN Life Science Products). Para volver a sondear, las membranas sondeadas se limpian con Tris 0,2 M pH 8,0, SDS al 1% mediante agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, después se sondean con los respectivos anticuerpos.

#### Ensayo de entrecruzamiento químico

Antes de los ensayos de entrecruzamiento e inmunoprecipitación, las células transfectadas se privaron de nutrientes durante toda la noche en medio libre de suero (DMEM). Al día siguiente se trataron las células con NRG-1 50 nM (Neo Markers) en medio libre de suero durante 10 minutos. Los cultivos se lavaron tres veces en PBS antes de ser tratados con el reactivo de entrecruzamiento celular impermeable BS<sup>3</sup> (PIERCE) (2 mM en PBS) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se paró la reacción de entrecruzamiento con Tris 10 mM, pH 7,5 NaCl 0,9% y glicina 0,1 M durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se prepararon todos los lisados celulares con tampón de lisis e inmediatamente se sometieron a ensayo de inmunoprecipitación como se describió anteriormente.

#### Inhibición del crecimiento celular mediada por anticuerpo

Las células SK-BR-3, MDA-MB-453, BT-474, MCF-7 y T47D se trataron con anticuerpos específicos para ErbB-2 y/o ErbB-3. El anticuerpo anti-ErbB-2 usado fue el N12 el cual se sabe que inhibe el crecimiento de diferentes líneas celulares cancerosas que sobre-expresan ErbB-2. El anticuerpo anti-ErbB-3 usado fue el H3.105.5 el cual se ha documentado que no afecta al crecimiento de líneas celulares cancerosas que sobre-expresan ErbB-3 (catálogo de Neomarkers). Ambos anticuerpos son del mismo isotipo (IgG1) y reconocen la región extracelular del receptor. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5.000 células/pocillo y se dejaron adherir durante 16 horas. Se añadieron después los anticuerpos a los pocillos (N12- 1 mg/ml; H3.105.5 2,5 mg/ml, IgG de ratón cruda- 5 mg/ml) y se incubaron los cultivos durante otros 5 días. Se determinó el número de células en cada pocillo usando el ensayo de proliferación Cell Titre Aqueous (Promega), siguiendo el protocolo de los fabricantes.

#### Introducción

Los ErbBs son receptores proteína tirosina quinasas de clase uno. La señalización celular mediada por ErbB juega un papel crítico en el desarrollo embrionario y en la función de los órganos adultos. A nivel celular, se ha demostrado que los receptores ErbB median en señales de proliferación, diferenciación, migración y reorganización estructural celulares. Hay cuatro miembros ErbB estructuralmente similares, ErbB-1, 2, 3 y 4. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es uno de los varios ligandos que se unen a ErbB-1. ErbB-3 o ErbB-4 también se unen a varios ligandos, que incluyen neuregulina-1 (NRG-1). Hasta la fecha no se ha identificado el ligando de ErbB-2. Sin embargo, ErbB-2 sirve como copartícipe en el heterodímero para el ErbB-3, ErbB-4 o ErbB-1, y está críticamente involucrado en la señalización celular activada por NRG-1.

Estudios *in vivo* que usan experimentos de modificación genética dirigida indican que los defectos en el desarrollo resultantes de la inactivación de ErbB-2 son similares a aquellos observados en animales inactivados en NRG-1. Ambos animales presentaron defectos en los ganglios neurales craneales y en el desarrollo de las trabéculas cardíacas. Es más, ratones con genes ErbB-3 o ErbB-4 inactivados presentaban fenotipos similares o solapantes al de los ratones deficientes en el gen NRG-1 o ErbB-2. Esto sugiere poderosamente que ErbB-2 participa *in vivo* en las vías de señalización por ErbB-3 o ErbB-4 activadas por NRG-1.

Además de su papel en el desarrollo, el gen ErbB-2 humano se amplifica frecuentemente y su proteína codificada está sobre-expresada en una variedad de carcinomas humanos. Las primeras investigaciones sobre ErbB-2 hallaron que una mutación puntual oncogénica daba lugar a la formación de homodímeros de ErbB-2 que a su vez causaban una fosforilación significativa de los restos de tirosina del dominio intracelular. Aunque no se ha encontrado ninguna mutación puntual correspondiente en carcinomas humanos que sobre-expresan ErbB-2, la sobreexpresión de ErbB-2 conduce a la formación de homodímeros que a su vez incrementan la fosforilación de tirosina en su dominio intracelular. Este proceso se plantea como hipótesis de ser la señal de inicio de la cascada de señal que desencadena la transformación y/o el crecimiento celulares y por lo tanto iniciando la tumorigénesis. Sin embargo, hay evidencia que contradice la hipótesis de que los homodímeros de ErbB-2 son responsables de la iniciación de la tumorigénesis: i) algunos mutantes que se han diseñado con el fin de aumentar la dimerización y la autofosforilación no presentan ningún efecto sobre la transformación celular; ii) anticuerpos que se unen al dominio extracelular de ErbB-2 y que presumiblemente promueven la homodimerización dan como resultado la promoción del crecimiento celular del cáncer que expresa ErbB-2, mientras que otros inhiben el crecimiento celular del cáncer. Estos datos indican que la homodimerización de ErbB-2 es insuficiente para la promoción del crecimiento celular

para la transformación celular y que se requieren otras condiciones que posiblemente involucren la orientación o la conformación específica del dímero.

ErbB-2 actúa como un copartícipe en el heterodímero por la unión al ligando de los receptores ErbB-3 o ErbB-4. El ligando, NRG-1, se ha identificado que posee dos sitios de unión al receptor: uno que tiene una alta afinidad por ErbB-3 o ErbB-4 y el otro que tiene una baja afinidad, pero no específica, por todos los miembros ErbB. Por lo que la exposición de NRG-1 a las células que expresan ErbB-3/4 y ErbB-2 daría como resultado heterodímeros de ErbB-2 y ErbB-3/4. Sin embargo, en ausencia del ligando, no está claro si ErbB-2 tiene una alta afinidad por los otros receptores ErbB, y es posible que dicha interacción pueda estar involucrada en la iniciación del cáncer. Entre todos los receptores ErbB, ErbB-3 es único porque: i) ErbB-2 forma preferencialmente heterodímeros con ErbB-3; ii) la co-transfección de las células NIH3T3 con ErbB-2 y ErbB-3 da como resultado niveles mucho más altos de transformación celular que el de la transfección con ErbB-2 solo; iii) en células de cáncer de mama asociadas con la sobre-expresión de ErbB-2, también está ErbB-3 altamente expresado; iv) ErbB-3 está también sobre-expresado en células tumorales que sobre-expresan ErbB-2 de ratones transgénicos ErbB-2.

Los autores de la presente invención examinaron si ErbB-2 y ErbB-3 interactuaban de una forma independiente del ligando en células NIH3T3 co-transfectadas con los dos receptores. Mediante co-inmunoprecipitación se detectó ErbB-2 en los precipitantes ErbB-3 de células cultivadas en ausencia de NRG-1, y por el contrario se detectó ErbB-3 en los precipitantes de ErbB-2. Los complejos ErbB-2/3 también se identificaron en los experimentos de entrecruzamiento. Los heterodímeros ErbB-2/3 dependientes o independientes del ligando se distinguieron por las distintas movibilidades de los dímeros entrecruzados en SDS-PAGE. Sin embargo, tanto ErbB-2 como ErbB-3 están fosforilados en el heterodímero independiente del ligando y se unen a Shc, una proteína de señalización celular intracelular. Estos heterodímeros ErbB-2/ErbB-3 independientes del ligando también se detectaron en células de líneas de cáncer de mama humano que sobre-expresan ErbB-2, SK-BR-3, TB-474 y MDA-MB-453. Para comprobar si el heterodímero independiente del ligando es capaz de activar el crecimiento celular en los cánceres de mama, se trataron las tres líneas celulares de cáncer de mama humano descritas anteriormente con anticuerpos anti-dominio extracelular de ErbB-2 y anti-dominio extracelular de ErbB-3 en un ensayo de crecimiento celular. El anticuerpo anti-ErbB-2, N12, suprimió el crecimiento en las tres líneas celulares cancerosas, mientras que el anticuerpo anti-ErbB-3 redujo el crecimiento en las líneas cancerosas BT-474 y MDA-MB-453. De modo interesante, cuando el anticuerpo anti-ErbB-2 se combinaba con el anticuerpo anti-ErbB-3 en los cultivos de células cancerosas SK-BR-3, los dos anticuerpos tenían un efecto inhibitor sinérgico sobre el crecimiento celular del cáncer. Estos resultados indican que el ErbB-3 está involucrado en el crecimiento celular del cáncer de mama humano mediante una heterodimerización independiente del ligando con ErbB-2.

## Resultados

Con el fin de investigar las interacciones de ErbB-2 y ErbB-3 en ausencia de NRG-1, los autores de la presente invención usaron las células NIH3T3, las cuales expresan bajos niveles de ErbB-2 y niveles indetectables de los otros receptores ErbB, y que expresaban transitoriamente ya sea ErbB-2, ErbB-3 o ambos, ErbB-2 y ErbB-3. Para evitar el posible NRG-1 en el suero del medio de cultivo, se cultivaron las células en medio libre de suero durante 24 horas antes de su recolección. ErbB-2 o ErbB-3 se precipitaron entonces usando anticuerpos específicos para cada receptor y los precipitantes se analizaron mediante inmunotransferencia. Las transferencias que usaban anticuerpos anti-ErbB-2 detectaban ErbB-2 en los precipitantes de ErbB-3 (Figura 1a, panel central, calle 3). Esto no es una reacción cruzada de los anticuerpos ya que el anticuerpo anti-ErbB-3 no es capaz de precipitar ErbB-2 (Figura 1a, panel central, calle 5) o unir ErbB-2 en la inmunotransferencia (Figura 1a, panel inferior, calle 1). De forma similar, el anticuerpo anti-ErbB-2 no es capaz de precipitar ErbB-3 (Figura 1a, panel inferior, calle 1) o unir ErbB-3 en la inmunotransferencia (Figura 1a, panel central, calle 2). La formación del complejo requiere la asociación en la membrana de ErbB-2 y ErbB-3, ya que los receptores solubles no son capaces de formar el complejo en extractos celulares mixtos de células transfectadas con ErbB-2 y ErbB-3 por separado (Figura 1a, panel central, calle 5). Los receptores ErbB-3 también se detectaron mediante inmunotransferencia de los precipitados anti-ErbB-2 de células NIH3T3 co-transfectadas con ErbB-2/3 (Figura 1b). La presencia de NRG-1 aumentó la heterodimerización de ErbB-2 y ErbB-3 como se esperaba (Figura 1a, calle 4; Figura 1b, calle 2).

La inmunotransferencia detectó la presencia de tirosinas fosforiladas de una proteína de 180 kDa a partir de células ErbB-2/3 tratadas con o sin NRG-1 (Figura 1a, panel superior, calles 4 y 5, respectivamente). Se espera que esta fosforilación esté presente en ErbB-2 y/o ErbB-3 intracelulares que habían formado un heterodímero independiente del ligando. A diferencia de ErbB-2, ErbB-3 tiene un dominio quinasa deficitario y no sería capaz de fosforilar otras proteínas. Por lo tanto, esto indica que la proteína fosforilada es lo más probablemente ErbB-3.

Para probar si el complejo ErbB-2 y ErbB-3 detectado mediante co-inmunoprecipitación es un heterodímero se realizaron experimentos de entrecruzamiento con células transfectadas con ErbB-2 solo, o ErbB-3 solo, o co-transfectadas con ErbB-2 y ErbB-3. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-ErbB-2 o anti-ErbB-3. La sobreexpresión de ErbB-2 da lugar a una homodimerización ya que se detectaron bandas doblete de proteína a aproximadamente 300 kDa mientras que el receptor monomérico se detectó a aproximadamente 180 kDa (Figura 2a, panel superior, calle 1). La formación del homodímero ErbB-2 era independiente de la estimulación por el ligando (Figura 2a, panel superior, calle 1 vs 2).

Se detectó también un dímero de 360 kDa en las células co-transfectadas con ErbB-2/ErbB-3 (Figura 2a, calle 5). Este era un heterodímero ya que la proteína se precipitaba con anticuerpo anti-ErbB-3 y se detectaba en la inmunotransferencia con anticuerpo anti-ErbB-2. Sin embargo, a diferencia del homodímero de ErbB-2, el heterodímero ErbB-2/ErbB-3 consiste en una única banda. En respuesta a la estimulación con NRG-1 de las células co-transfectadas con ErbB-2/ErbB-3 había un complejo heterodimérico con una menor movilidad similar a la observada en células transfectadas con ErbB-2 (Figura 2a, panel superior, calle 1 vs 6). La disminución en la movilidad del heterodímero activado por el ligando no era debida a un incremento en la fosforilación de tirosina ya que: i) los dímeros doblete están ambos fosforilados en restos de tirosina; y ii) tanto los heterodímeros dependientes como los independientes del ligando tenían niveles similares de fosforilación en tirosina (Figura 2a, panel central, calles 5 y 6). Una vez más la presencia de los heterodímeros ErbB-2/3 no eran el resultado de una reacción cruzada de los anticuerpos ya que los homodímeros de ErbB-2 no se detectaron mediante el anticuerpo anti-ErbB-3 (Figura 2a, panel inferior, calles 1 y 2). ErbB-3 solamente era capaz de formar una cantidad limitada de homodímeros incluso en presencia de NRG-1 (Figura 2a, panel inferior, calles 3 y 4).

Con el fin de probar si la heterodimerización de ErbB-2 y ErbB-3 podría estar estimulada por un ligando desconocido del suero, se cultivaron células co-transfectadas con ErbB-2/ErbB-3 ya sea en medio libre de suero o en medio que contenía suero. Como se muestra en la Figura 2b, paneles derecho e izquierdo, se detectaron patrones de bandas similares a partir de cultivos con y sin suero.

Con el fin de probar si la formación del heterodímero mediada por la sobre-expresión de ErbB-2 y ErbB-3 tenía alguna relevancia para las células cancerosas que sobre-expresan ErbB-2 se estudiaron las líneas celulares de cáncer de mama humano SK-BR-3, MDA-MB-453 y BT-474, las cuales sobre-expresan ErbB-2 y ErbB-3. Como en las células NIH3T3 co-transfectadas, ErbB-2 co-precipitaba con ErbB-3 usando el anticuerpo anti-ErbB-3 (Figura 3a). También, en consonancia con los datos de las células co-transfectadas NIH3T3, NRG-1 aumentaba significativamente la formación de los heterodímeros ErbB-2/3 en estas células (Figura 3a).

Ya que se sabe que los heterodímeros ErbB-2/ErbB-3 estimulados por el ligando se unen a la molécula de señalización Shc, los autores de la presente invención examinaron si los heterodímeros ErbB-2/ErbB-3 independientes del ligando también se unen a Shc. Cantidades similares de Shc co-inmunoprecipitaron con ErbB-2 a partir de células transfectadas con ErbB-2 y células co-transfectadas con ErbB-2/3 en ausencia de NRG-1 (Figura 4a, calles 1 y 2). Ya que la sobre-expresión de ErbB-2 en células NIH3T3 daba como resultado homodímeros de ErbB-2 (Figura 2a), estos datos muestran que Shc se puede unir a dímeros de ErbB-2. Sin embargo, Shc también co-inmunoprecipita con ErbB-3 de células transfectadas con ErbB-2/3 en ausencia y en presencia de NRG-1 (Figura 4b, calles 2 y 3). Ya que Shc no co-inmunoprecipita con ErbB-3 de células que expresan solamente ErbB-3, estos datos indican que Shc se asociaba con los heterodímeros ErbB-2/3 en presencia y en ausencia de NRG-1.

Después se examinó si Shc también se asociaba con los heterodímeros ErbB-2/3 en células de cáncer de mama humano. Una vez más se vio que Shc co-inmunoprecipitaba con ErbB-3 de cada una de las líneas celulares cancerosas (Figura 4c). En cada línea celular probada, NRG-1 aumentaba la co-inmunoprecipitación de Shc con ErbB-3 indicando que Shc interacciona con los heterodímeros ErbB-2/3.

Para comprobar si los heterodímeros ErbB-2/ErbB-3 independientes del ligando son activos en la señalización celular y en la estimulación del crecimiento celular se usaron anticuerpos comerciales anti-dominio extracelular de ErbB-2 (N12) y de ErbB-3 (Ab5) para tratar los cultivos de células de cáncer de mama humano que sobre-expresan ErbB-2 y ErbB-3. Se predijo que la combinación de estos anticuerpos interrumpiría los heterodímeros ErbB-2/3 preformados y por lo tanto interrumpiría sus propiedades de señalización y de posible estimulación del crecimiento celular. Se ha documentado previamente que N12 inhibe el crecimiento de diferentes líneas de células cancerosas, y aquí se confirma que el anticuerpo inhibe el crecimiento de las líneas celulares cancerosas dependiente del anclaje, que incluyen las células MDA-MB-453, BT-474 y SK-BR-3 (Figura 5). Las células BT-474 eran más sensibles a N12 en comparación con otras líneas celulares.

Sin embargo, se encontró que Ab5 también inhibía el crecimiento en ambas células BT-474 y MDA-MB-453 (Figura 5a y b, respectivamente). Como con N12, las células BT-474 eran más sensibles a Ab5 en comparación con otras líneas de células cancerosas probadas. Cuando se combinaban N12 y Ab5 para tratar estas células de cáncer de mama, presentaban un efecto aditivo sobre las células MDA-MB-453 y las BT-474, y un efecto sinérgico sobre las células SK-BR-3. Las células T47D y MCF-7 también se probaron con este ensayo de crecimiento celular. En las células T47D el ErbB-3 está sobre-expresado y en las células MCF-7 están altamente sobre-expresados ErbB-1, 3 y 4. Aun así, ninguna de las células responde a N12 y Ab5, indicando que la actividad de crecimiento de ErbB-3 es dependiente de la presencia de ErbB-2 activo [el cual es capaz de responder frente al anticuerpo anti-ErbB-2 (datos no mostrados)]. De este modo, se concluyó que los heterodímeros ErbB-2/3 son activos en muchas células de cáncer de mama humano incluso en ausencia de un ligando, y este heterodímero es responsable de la estimulación del crecimiento celular.

## Discusión

En general, los autores de la presente invención han demostrado un efecto estimulador del crecimiento celular desencadenado por ErbB-2/ErbB-3 en ausencia del ligando, NRG-1. Esto está asociado con la sobre-expresión de



ErbB-2 y ErbB-3 en células de cáncer de mama humano. Esta conclusión se apoya en las siguientes observaciones: i) ErbB-2 y ErbB-3 sobre-expresados forman heterodímeros en células NIH3T3 co-transfectadas con ErbB-2/ErbB-3, y en células de cáncer de mama humano que sobre-expresan ErbB-2, las cuales responden al efecto inhibitor del anticuerpo anti-ErbB-2; ii) en los heterodímeros ErbB-2/ErbB-3 independientes del ligando, ErbB-3 se fosforila en los restos de tirosina; iii) el heterodímero independiente del ligando se une a la molécula de señalización celular Shc; iv) un anticuerpo comercial anti-ErbB-3, que según se ha documentado con anterioridad no tiene efecto inhibitor sobre las células cancerosas, inhibe el crecimiento celular del cáncer de mama humano, y cuando se combina con un anticuerpo anti-ErbB-2, muestran ya sea efecto aditivo o sinérgico sobre la inhibición del crecimiento celular. De este modo, se concluye que ErbB-3 está involucrado en el crecimiento celular del cáncer de mama humano a través de una interacción independiente del ligando con ErbB-2 sobre-expresado.

Estudios preliminares postularon que la sola sobre-expresión de ErbB-2 era suficiente para inducir la tumorigénesis. Dichas conclusiones se hicieron a partir de las siguientes observaciones: i) ErbB-2 está sobre-expresado en una variedad de células cancerosas humanas ya que está amplificado el gen de ErbB-2; ii) la sobre-expresión de ErbB-2 produce la fosforilación de su dominio intracelular y la unión a la proteína de señalización celular, Shc y Grb2; iii) la transfección de células de fibroblastos en cultivo con el gen ErbB-2 nativo da como resultado la transformación celular; y iv) el mutante ErbB-2, en el cual está aumentada la dimerización, presenta un alto nivel de actividad de transformación. Sin embargo, aunque el mutante ErbB-2 es capaz de transformar células, no está claro si el ErbB-2 nativo también puede transformar células, ya que otros estudios no pueden identificar dicha actividad en el ErbB-2 solo. No está claro si dentro de éstas está también expresado ErbB-3 en unas pocas células transformadas, tal como aparece una expresión de ErbB-3 en células tumorales de una línea transgénica de ErbB-2. Así, incluso aunque ErbB-2 esté involucrado en el crecimiento celular canceroso o en la transformación celular, no está claro si el ErbB-2 solo es suficiente en la mediación de la señales celulares para el crecimiento o la transformación celular. Es posible que solamente el heterodímero ErbB-2/ErbB-3 pero no el homodímero ErbB-2 esté directamente involucrado en la tumorigénesis.

Este estudio indica que sin la unión del ligando, los complejos heterodiméricos de ErbB-2 y ErbB-3 existen en la superficie celular de células que sobre-expresan ErbB-2 y células que expresan altamente ErbB-3. Esto se apoya en la co-inmunoprecipitación de ErbB-2 y ErbB-3 de células NIH3T3 co-transfectadas. La co-inmunoprecipitación también se obtiene con células de las líneas celulares de cáncer de mama humano, SK-BR-3, MDA-MB-453 y BT-474, que sobre-expresan ErbB-2 y expresan altos niveles de ErbB-3, pero no NRG-1. Se cree que el heterodímero independiente del ligando podría presentar una mayor afinidad por NRG-1 que por el homodímero de ErbB-3. Los heterodímeros artificiales de ErbB-2 y ErbB-3 tienen una mayor afinidad de unión al ligando que los homodímeros o monómeros artificiales de ErbB-3. Sin embargo, estudios previos sugerían que el ligando iniciaba la dimerización de ErbB-2 y ErbB-3. Esta aparente contradicción no se ha explicado adecuadamente. Por lo tanto no está claro a partir de esos estudios si el dímero se forma antes o después de la unión del ligando a ErbB-3. Es más, los presentes resultados sugieren que la formación, independiente del ligando, del complejo heterodimérico con ErbB-2/ErbB-3 podría ser dominante sobre la formación de los homodímeros de ErbB-2, ya que la presencia de ErbB-3 puede prevenir la formación de las bandas doblete del homodímero de ErbB-2 en el SDS-PAGE.

Es inesperado que los heterodímeros ErbB-2/ErbB-3 dependientes del ligando tengan una menor movilidad en SDS-PAGE que los heterodímeros independientes del ligando. Esta diferencia puede ser debida a la masa molecular del ligando NRG-1 el cual se podría entrecruzar con los receptores. De todos modos, el ligando usado en este experimento contiene solo un dominio EGF de alrededor de 7 kDa, lo que hace poco probable que la masa molecular del ligando sea capaz de cambiar significativamente la movilidad del heterodímero. Esta diferencia de movilidad podría ser debida en cambio a las diferentes conformaciones entre los dos heterodímeros, los cuales están unidos mediante el reactivo de entrecruzamiento, o a distintos niveles de fosforilación, aunque ambos heterodímeros están fosforilados en niveles equiparables según detecta el anticuerpo anti-fosfotirosina.

Otro aspecto crítico de este estudio es la inhibición del crecimiento celular canceroso mediada por el anticuerpo anti-ErbB-3. El anticuerpo anti-ErbB-3 que se usa en este estudio (H3.105.5) se ha investigado previamente y se ha encontrado que no tiene efecto sobre el crecimiento de las células cancerosas que expresan ErbB-3 (NeoMarks Catalogue, 1999). Las diferentes observaciones podrían ser debidas a las diferentes líneas celulares usadas. A diferencia del estudio anterior, los autores de la presente invención han probado cinco líneas celulares de cáncer de mama humano: MCF-7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-453 y BT-474. Las células de las dos últimas líneas solo responden al anticuerpo ErbB-3. De modo interesante, las células SK-BR-3 no responden significativamente al anticuerpo ErbB-3 solo pero presentan una respuesta 2,5 veces mayor a la combinación de anticuerpos ErbB-2 y ErbB-3 que al anticuerpo ErbB-2 a solas. Críticamente, las tres líneas celulares que responden al anticuerpo ErbB-3 también responden al anticuerpo ErbB-2. MCF-7 y T47D no respondían ni al anticuerpo ErbB-2 ni al anticuerpo ErbB-3, aunque las células MCF-7 expresan ErbB-1, 3 y 4, y las T47D sobre-expresan ErbB-3. Dado que el anticuerpo anti-ErbB-2, herceptina, el cual se ha usado en pacientes con cáncer de mama para la supresión del crecimiento celular del cáncer, es efectivo solamente en el 50% de los pacientes, la coincidencia de las tres células que responden a ambos anticuerpos, sugiere que el heterodímero ErbB-2/ErbB-3 puede ser la única forma activa en la estimulación del crecimiento de las células cancerosas.

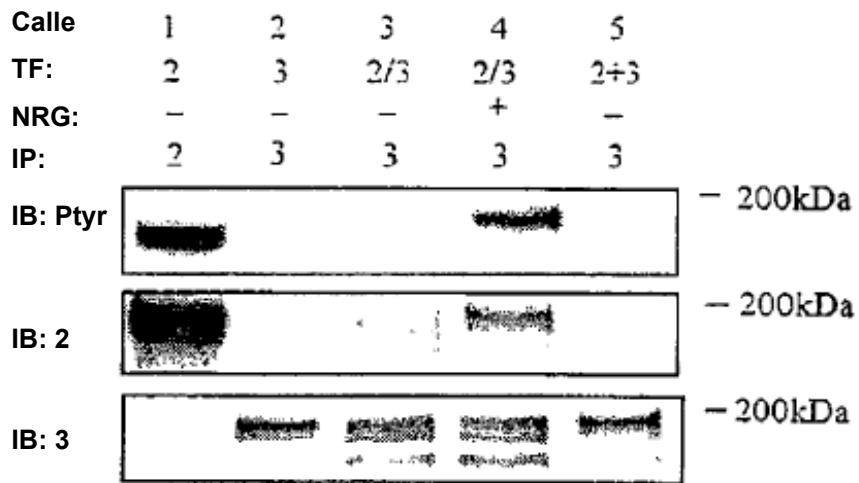
Un aspecto de la presente invención es un nuevo acercamiento a la terapia del cáncer mediante bloqueo u obstrucción en la formación del heterodímero ErbB-2/ErbB-3.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un anticuerpo anti-ErbB-3 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer con sobreexpresión de ErbB-2, donde el anticuerpo anti-ErbB-3 previene o reduce la formación del heterodímero ErbB-2/ErbB-3.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo anti-ErbB-3 es un anticuerpo humanizado.
3. El uso según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo anti-ErbB-3 es un anticuerpo H3.105.5.
4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones de 1-3, donde dicho cáncer con sobreexpresión de ErbB-2 es un cáncer de mama humano.
- 10 5. Un método *in vitro* para detener o inhibir el crecimiento de las células cancerosas que sobre-expresan ErbB-2, que comprende poner en contacto una célula cancerosa con un anticuerpo anti-ErbB-3, donde el anticuerpo anti-ErbB-3 previene o reduce la formación del heterodímero ErbB-2/ErbB-3.
6. El método de la reivindicación 5, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
7. El método de la reivindicación 5, donde dicho anticuerpo anti-ErbB-3 es el anticuerpo H3.105.5.
- 15 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones de 5 a 7, donde dicha célula cancerosa es una célula de cáncer de mama humano.
9. El método de la reivindicación 8, donde dicha célula de cáncer de mama humano es SK-BR-3, MDA-MB-453, o BT-474.
10. Un anticuerpo anti-ErbB-3 para el uso en un método de tratamiento de un cáncer con sobre-expresión de ErbB-2, donde el anticuerpo anti-ErbB-3 previene o reduce la formación del heterodímero ErbB-2/ErbB-3.
- 20 11. El anticuerpo anti-ErbB-3 para el uso de la reivindicación 10, donde dicho anticuerpo anti-ErbB-3 es un anticuerpo humanizado.
12. El anticuerpo anti-ErbB-3 para el uso de la reivindicación 10, donde dicho anticuerpo anti-ErbB-3 es el anticuerpo H3.105.5.
- 25 13. El anticuerpo anti-ErbB-3 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones de 10 a 12, donde dicho cáncer con sobre-expresión de ErbB-2 es un cáncer de mama humano.

Figura 1

a



b

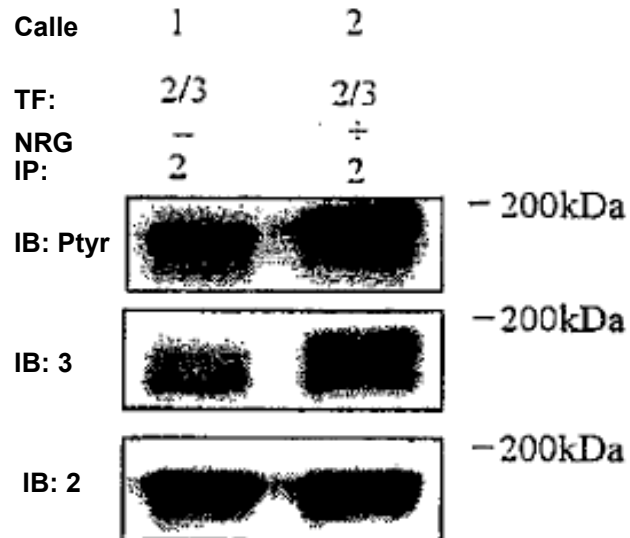
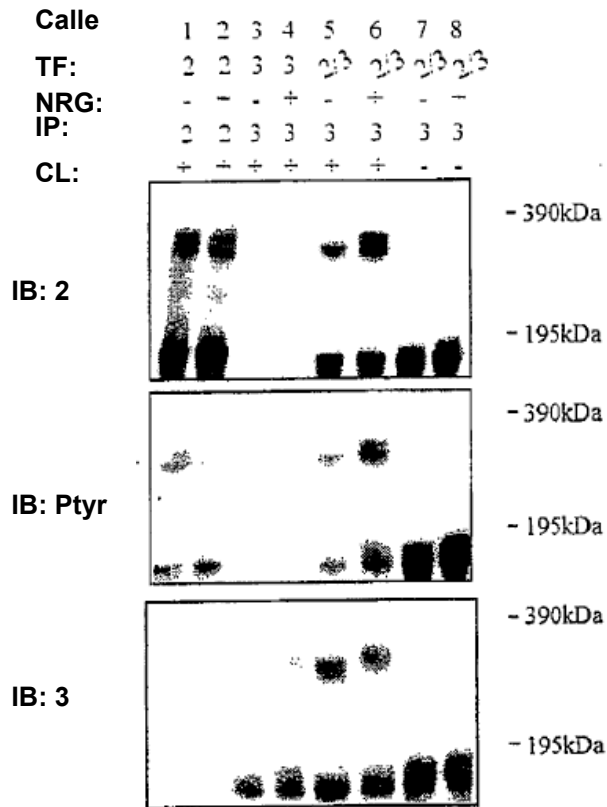


Figura 2

a



b

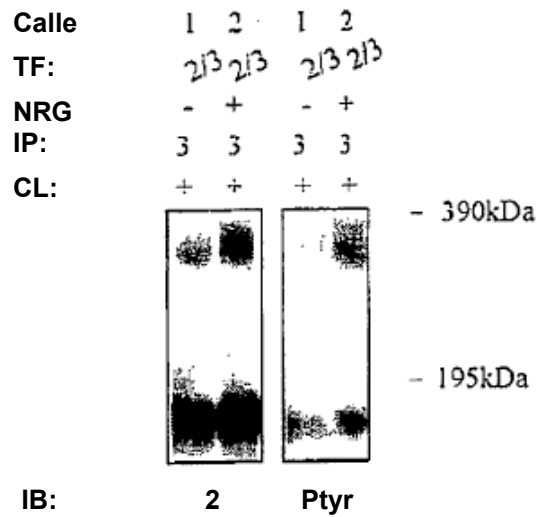


Figura 3

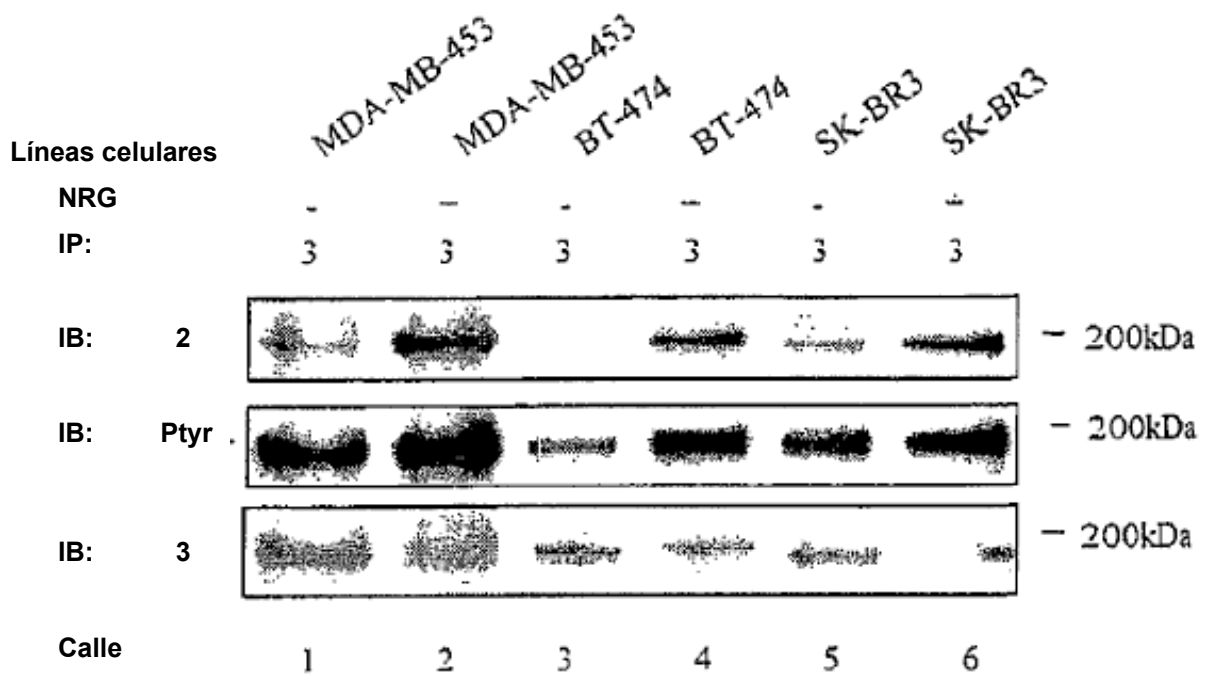
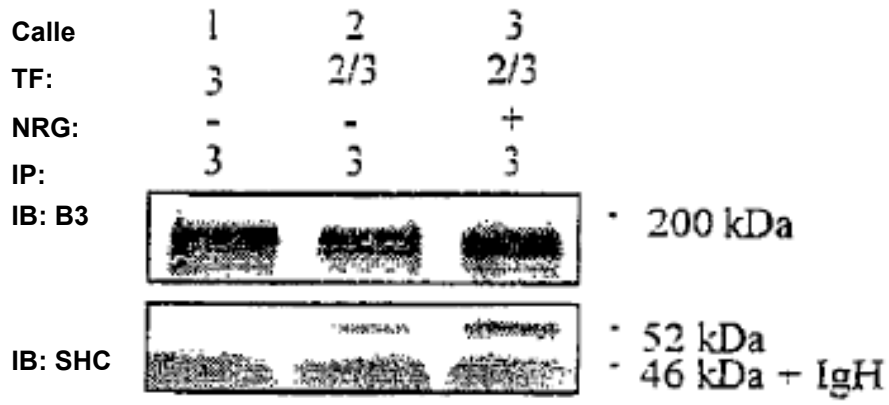


Figura 4

a



b

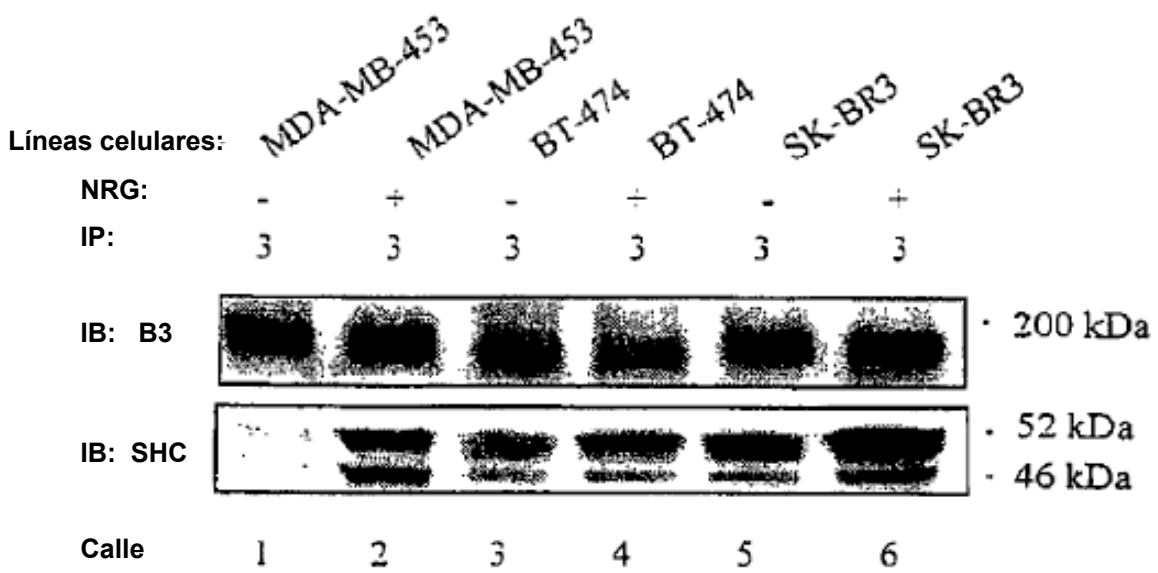
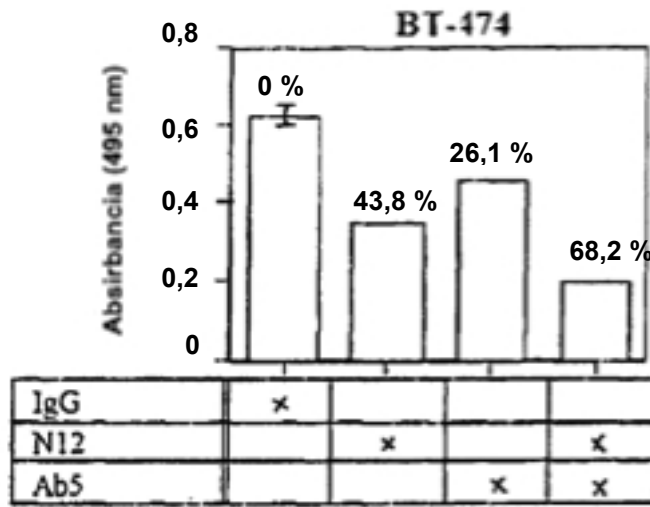
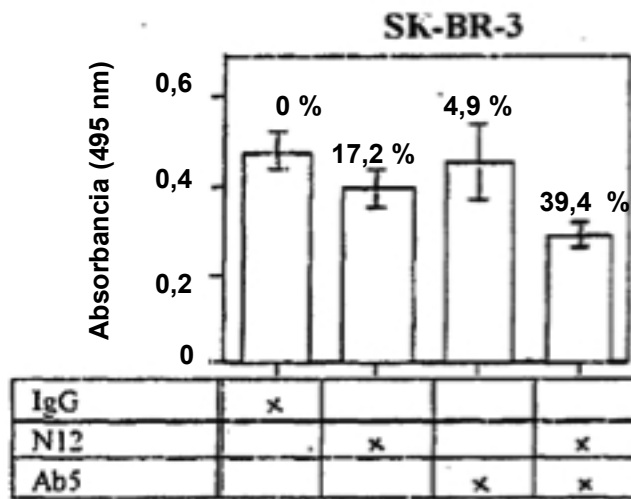


Figura 5

A



B



C

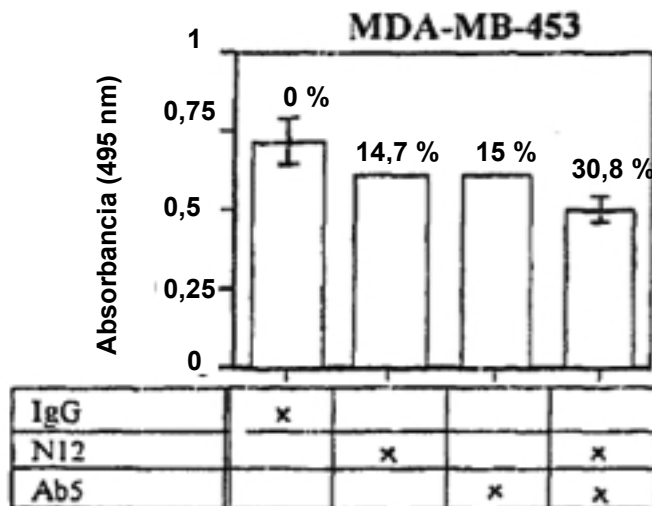


Figura 6

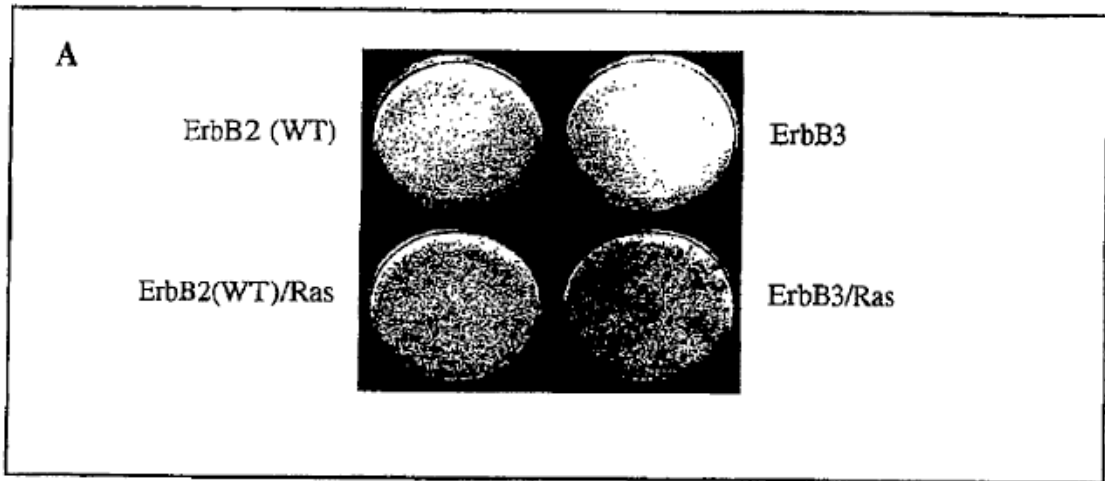


Figura 6A

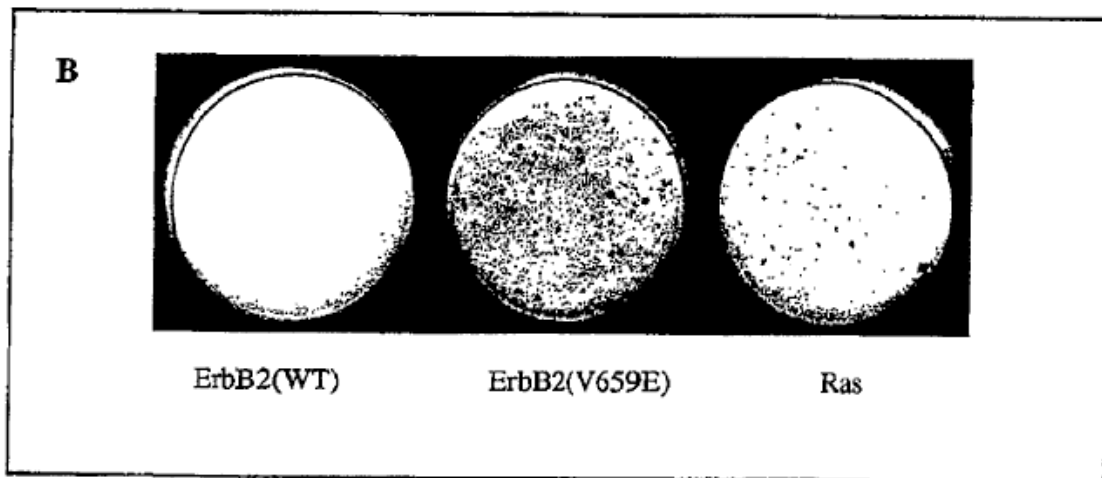


Figura 6B