

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 694**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2012 PCT/EP2012/059402**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12156532**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2012 E 12723857 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2710040**

54 Título: **Anticuerpos anti-HER3 humanos y sus usos**

30 Prioridad:

19.05.2011 EP 11305607

22.06.2011 US 201161499948 P

30.06.2011 US 201161502932 P

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

23.11.2017

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) (33.3%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR;

CENTRE VAL D'AURELLE - PAUL LAMARQUE (33.3%) y

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%)

72 Inventor/es:

CHARDES, THIERRY;

PELEGRIN, ANDRÉ;

LARBOURET, CHRISTEL;

GABORIT, NADEGE y

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 643 694 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-HER3 humanos y sus usos

CAMPO DE LA INVENCION:

5 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-HER3 humanos y a sus usos en métodos diagnósticos y terapéuticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION:

10 La familia Erb/HER del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano de tirosina quinasas receptoras (RTK) incluye cuatro miembros: EGFR (ErbB1/HER1), HER2 (c-Neu, HER2), HER3 (HER3) y HER4 (HER4). Los receptores HER comprenden un dominio glicosilado extracelular que consiste en cuatro dominios estructurales, marcados 1 a 4, seguidos de un dominio de transmembrana y una parte C-terminal intracelular que contiene un dominio quinasa para acoplamiento a vías de señalización. Excepto para HER3, la región intracelular contiene una actividad de tirosina quinasa. La señalización es mediada a través de la dimerización del receptor inducida por el ligando y la posterior fosforilación que conduce a la activación de las vías de señalización citoplasmáticas. HER2 no tiene un ligando específico, porque está naturalmente bajo una conformación "activa". Los otros receptores HER existen como monómeros inactivos con las moléculas plegadas de manera que prevengan la dimerización. La unión de ligandos a los dominios 1 y 3 induce cambios conformacionales principales que finalmente exponen el bucle de dimerización en el dominio 2 del receptor. Esta exposición del bucle de dimerización permite la dimerización del receptor.

20 El receptor HER3, que se ha descrito por primera vez en 1990, es el único receptor de miembros de la familia HER que carece de la actividad quinasa intrínseca y la señalización aguas abajo se logra mediante la heterodimerización. Así, el receptor HER3, en calidad de un monómero, se denomina "no-auto" y no puede formar homodímeros. La unión del ligando Heregulina (HRG) al receptor HER3 desencadena la heterodimerización de HER3 con los otros receptores de la familia HER (preferentemente HER2). Dentro del heterodímero, el dominio de la quinasa HER3 actúa como un activador alostérico de su compañero de la familia HER.

25 HER3 está implicado en la tumorigénesis de diversos cánceres, incluyendo cáncer de mama y ovario (Lee-Hoeflich ST, Cancer Res. 2008, McIntyre E, Breast Cancer Res Treat, 2010, Tanner B, J Clin Oncol, 2006). La expresión de HER3 se correlaciona con la progresión del tumor y reduce la supervivencia del paciente en melanoma maligno y metástasis, y se asocia con una disminución de la supervivencia en el cáncer de ovario. Es importante destacar que en el cáncer de mama, los tumores con baja expresión de HER2, que no son elegibles para el tratamiento con Herceptina, a menudo se "programan" para expresar fuertemente los tumores HER3 (Smith et al., Br. J. Cancer 2004) y HER2+++ , que se vuelven resistentes a Herceptina después de un tratamiento prolongado, son "re-programados" para expresar fuertemente HER3 (Narayan, Cancer Res. 2009). La resistencia al cetuximab también se asoció con la sobre-expresión de HER3 en cáncer de pulmón (Wheeler, Oncogene 2008) y carcinomas colorrectales (Lu Cancer Res 2007), junto con la desregulación de la internalización/degradación de EGFR. Recientemente, la sobre-expresión de HER3 se asoció significativamente con una peor supervivencia libre de metástasis en el carcinoma colorrectal (Ho-Pun-Cheung, Int J Cancer 2010). Por lo tanto, la sobre-expresión de HER3 y la señalización compensatoria a través de la activación de la vía PI3K/AKT están implicadas en el desarrollo de resistencia al tratamiento con terapias dirigidas a HER (anticuerpos y TKI) (Wheeler 2008, Lu 2007, Narayan, 2009, Sergina, 2007), sino también al tratamiento con terapias dirigidas a IGFR (Desbois-Mouthon, Clin Cancer Res 2009) y con agentes quimioterapéuticos (Kruser, Exp Cell Res 2010).

40 Todos estos hallazgos sugieren que los agentes dirigidos a HER3 y, en particular, los anticuerpos, podrían ayudar a comprender mejor el papel de la señalización de HER3 en cánceres y especialmente ser utilizados como agentes inmunoterapéuticos eficaces.

45 En la actualidad, no se comercializa ningún anticuerpo terapéutico anti-HER3, aunque la bibliografía científica enfatiza fuertemente el interés de fijar como objetivo HER3 en la oncología terapéutica. Dos anticuerpos humanos están actualmente en desarrollo por Merrimack Pharmaceuticals/Sanofi Aventis (anticuerpo MM-121; documento PCT WO2008/100624) y U3 PharmaAG/Daiichi Sankyo/Amgen (U3-1287 o AMG-888; documento PCT WO2007/077028). El anticuerpo MM-121 está implicado en un ensayo clínico de fase I en NSCLC y en un ensayo de fase I/II en ER + PR + HER2-cáncer de mama. El anticuerpo U3-1287 está en fase I en NSCLC en asociación con Erlotinib. Un anticuerpo biespecífico de EGFR/HER3 DL11f (Genentech; documento PCT WO2010/108127) sigue en desarrollo de la investigación. Un anticuerpo biespecífico para HER2/HER3 MM-111 (Merrimack Pharmaceuticals; documentos PCT WO2005/117973, WO2006/091209) está implicado en ensayos clínicos de fase I/II, solos o en combinación con trastuzumab o lapatinib, en cáncer de mama amplificado con HER2.

55 En particular, el documento WO2007/077028 describe una pluralidad de anticuerpos dirigidos contra HER3, y más particularmente dirigidos contra diversos dominios de HER3, que incluyen L1 (D1) que abarca los aminoácidos 19-

184, S1 (D2) que abarca los aminoácidos 185-327, L2 (D3) que abarca los aminoácidos 500-632 y S2 (D4) que abarca los aminoácidos 328-499. Sin embargo, el documento WO2007/077028 no describe anticuerpo alguno que reconozca la región 111-129 del dominio extracelular de HER3 humano.

5 Además de ello, el documento WO2008/100624 describe anticuerpos dirigidos contra el receptor ErbB3, entre los cuales el anticuerpo denominado Ab#6 se une a la región 20-202 del receptor HER3. Sin embargo, el documento WO2008/100624 no describe anticuerpo alguno que reconozca la región 111-129 del dominio extracelular de HER3 humano.

10 El documento WO2010/127181 describe anticuerpos que se unen al dominio extracelular de HER3 y/o al complejo HER3:heregulina, entre los cuales se encuentra el anticuerpo 1G4 que se une al subdominio L2 del dominio extracelular de HER3.

15 Todos los anticuerpos arriba mencionados bloquean el sitio de unión a heregulina del receptor HER3, reduciendo de este modo estas terapias de anticuerpos a tumores dependientes de ligandos. La fijación como objetivo de HER3 con anticuerpos que no están dirigidos al sitio de unión a heregulina de HER3 debería permitir eludir la resistencia a terapias fijadas como objetivo o quimioterapia en cáncer de mama HER2-amplificado resistente, para ampliar el campo de aplicación de terapias dirigidas al cáncer de mama HER2low, que no son actualmente elegibles para dicho tratamiento, o para tratar cánceres de mama triple-negativos, que expresan HER3 y para los cuales no hay terapia dirigida disponible todavía.

SUMARIO DE LA INVENCION:

La presente invención proporciona anticuerpos anti-HER3 humanos aislados o fragmentos de los mismos.

20 Un aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a la región 111-129 del dominio extracelular de HER-3 y compite por la unión al dominio extracelular de HER-3 humano con el anticuerpo producido obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486.

25 El presente texto describe un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena ligera variable (VL) que comprende las CDRs de la cadena VL del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486 y una cadena pesada variable (VH) que comprende las CDRs de la cadena VH del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486.

El presente texto describe también un anticuerpo monoclonal que comprende la cadena VL del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486 y la cadena VH del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486.

30 El presente texto describe, además, un anticuerpo monoclonal quimérico, que comprende los dominios variables del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486.

El presente texto describe, además, un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende las CDRs del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486.

35 Un aspecto adicional de la invención se refiere así a un anticuerpo monoclonal murino (16D3-C1) obtenible a partir del hibridoma disponible bajo el número de depósito CNCM I-4486.

La invención proporciona, además, fragmentos de anticuerpos de dichos anticuerpos que incluyen pero no se limitan a Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION:

40 Los autores de la invención han caracterizado un anticuerpo murino anti-HER3 humano. En particular, los autores de la invención han depositado un anticuerpo murino anti-HER3 humano (16D3-C1) productor de hibridoma en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia), de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest, el 17 de mayo de 2011. El hibridoma depositado tiene el número de depósito CNCM I-4486. Los autores de la invención han demostrado, en particular, que este anticuerpo es un potente inhibidor de la formación del complejo heterodímero HER2-HER3, y que la inhibición es independiente del ligando heregulina.

45

Definiciones:

El término "HER3" se refiere al receptor HER3 humano tal como se describe en Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4905-4909 (1990); véase también Kani et al., Biochemistry 44:15842-857 (2005), Cho y Leahy, Science 297:1330-1333 (2002)). HER3 también se conoce como "HER3".

La expresión "anticuerpo anti-HER3 humano" se refiere a un anticuerpo dirigido contra HER3 humano.

De acuerdo con la presente invención, "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tienen el mismo significado, y se utilizarán igualmente en la presente invención. El término anticuerpo, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígenos que unen de forma inmunoespecífica un antígeno. Como tal, el término anticuerpo abarca no sólo moléculas de anticuerpo enteras, sino también fragmentos de anticuerpos así como variantes (incluyendo derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro y cada una de las cadenas pesadas está enlazada a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (l) y kappa (k). Existen cinco clases principales (o isotipos) de cadenas pesadas que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada una de las cadenas contiene dominios de secuencia distintos. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, a los que se alude colectivamente CH). Las regiones variables de las cadenas tanto ligera (VL) como pesada (VH) determinan el reconocimiento de unión y la especificidad para el antígeno. Los dominios de regiones constantes de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren importantes propiedades biológicas tales como asociación de cadenas de anticuerpos, secreción, movilidad trans-placentaria, unión a complemento y unión a receptores Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación de anticuerpos están constituidos por residuos que provienen principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDRs). Ocasionalmente, residuos de regiones no hipervariables o marco (FR) influyen en la estructura global del dominio y, por lo tanto, en el sitio de combinación. Las Regiones Determinantes de Complementariedad o CDRs se refieren a secuencias de aminoácidos que definen conjuntamente la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa. Las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDRs, designadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Un sitio de unión al antígeno, por lo tanto, incluye seis CDRs, que comprenden el conjunto CDR de cada una de las regiones V de cadena pesada y ligera. Las Regiones de Marco (FRs) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre CDRs.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo derivado del anticuerpo 16D3-C1 y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano.

De acuerdo con la invención, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que tiene un marco de región variable y regiones constantes a partir de un anticuerpo humano, pero conserva las CDRs del anticuerpo 16D3-C1.

El término "Fab" designa un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión al antígeno, en que aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y toda la cadena L entre los fragmentos obtenidos por tratamiento de IgG con una proteasa, papaina, se unen a través de un enlace disulfuro.

El término "F(ab')₂" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 y la actividad de unión al antígeno, que es ligeramente mayor que el Fab unido a través de un enlace disulfuro de la región bisagra, entre fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, pepsina.

El término "Fab" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión al antígeno, que se obtiene cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')₂.

Un polipéptido Fv de cadena sencilla ("scFv") es un heterodímero VH::VL enlazado covalentemente, que habitualmente se expresa a partir de una fusión génica que incluye genes que codifican VH y VL enlazados por un enlazador que codifica un péptido. "dsFv" es un heterodímero VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. Fragmentos de anticuerpos divalentes y multivalentes se pueden formar espontáneamente por asociación de scFvs monovalentes, o pueden ser generados por acoplamiento de scFv monovalentes por un enlazador peptídico, tal como sc(Fv)₂ divalente.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno.

Por "purificado" y "aislado" se entiende, cuando se hace referencia a un anticuerpo de acuerdo con la invención o a una secuencia de nucleótidos, que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras

5 macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término "purificado", tal como se utiliza en esta memoria, significa que está presente preferiblemente al menos 75% en peso, más preferiblemente al menos 85% en peso, más preferiblemente todavía al menos 95% en peso y lo más preferiblemente al menos 98% en peso de macromoléculas biológicas del mismo tipo. Una molécula de ácido nucleico "aislada" que codifica un polipéptido particular se refiere a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o estos adicionales que no afectan de manera perjudicial a las características básicas de la composición.

Anticuerpos de la invención:

10 La presente invención proporciona anticuerpos anti-HER3 humanos aislados o fragmentos de los mismos. En particular, los autores de la invención han depositado un hibridoma productor de anticuerpo murino anti-HER3 humano (16D3-C1) en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia) de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest, el 17 de mayo de 2011. El hibridoma depositado tiene el número de depósito CNCM I-4486.

15 Un aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a la región 111-129 del dominio extracelular de HER-3 y compite por la unión al dominio extracelular de HER-3 humano con el anticuerpo producido obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486.

En una realización particular, dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano.

20 El presente texto describe un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena ligera variable (VL) que comprende las CDRs de la cadena VL del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486 y una cadena pesada variable (VH) que comprende las CDRs de la cadena VH del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486.

25 El presente texto describe también un anticuerpo monoclonal que comprende la cadena VL del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486 y la cadena VH del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486.

El presente texto describe, además, un anticuerpo monoclonal quimérico, que comprende los dominios variables del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486.

El presente texto describe, además de ello, un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende las CDRs del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486.

30 Un aspecto adicional de la invención se refiere, por lo tanto, a un anticuerpo monoclonal murino (16D3-C1) obtenible a partir del hibridoma disponible bajo el número de depósito CNCM I-4486.

La invención proporciona, además, fragmentos de anticuerpos de dichos anticuerpos que incluyen, pero no se limitan a Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos.

Ensayos de unión competitiva:

35 La presente invención se refiere, por lo tanto, a un anticuerpo monoclonal aislado en pan que se une específicamente a la región 111-129 del dominio extracelular de HER-3 y compite por la unión al dominio extracelular de HER-3 humano con el anticuerpo producido obtenible a partir de hibridoma depositado como CNCM-I-448.

40 La separación de epítomos puede utilizarse para identificar anticuerpos que caen dentro del alcance de la invención reivindicada. La separación de epítomos se refiere al uso de ensayos de unión competitiva para identificar pares de anticuerpos que son o no capaces de unirse a HER3 simultáneamente, identificando así pares de anticuerpos que se unen a los mismos o que se solapan en HER3. Los experimentos de separación de epítomos proporcionan evidencia de que están presentes epítomos antigénicamente distintos. La competencia para la unión se puede evaluar para cualquier par de anticuerpos o fragmentos. Por ejemplo, utilizando los reactivos de detección apropiados, la especificidad de unión de anticuerpos o fragmentos de unión de cualquier fuente puede compararse con la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales descritos en esta memoria. La separación de epítomos se puede realizar con "anticuerpos aislados" o con sobrenadantes de cultivos celulares. Frecuentemente, la separación se realiza con sobrenadantes clonales de primera ronda para guiar la elección de clones que se desarrollarán adicionalmente. Los anticuerpos a comparar deberían ser dominios de unión a antígenos sustancialmente homogéneos. En el caso de anticuerpos "biespecíficos" o "bifuncionales", la especificidad de unión de los dos sitios de unión diferentes debe evaluarse o separarse independientemente.

50

Los anticuerpos de la presente invención se pueden ensayar para la unión específica mediante cualquier método conocido en la técnica. Pueden utilizarse muchos formatos diferentes de ensayo de unión competitiva para la separación de epítomos. Los inmunoensayos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a sistemas de ensayo competitivos utilizando técnicas tales como transferencias western, radioinmunoensayos, ELISA, 5 inmunoensayos de "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de precipitina, ensayos de precipitina por difusión en gel, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A y ensayos de fijación del complemento. Este tipo de ensayos es rutinario y bien conocido en la técnica (véase, p. ej., Ausubel et al., comps., 1994 Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & sons, Inc., Nueva York). Por ejemplo, el BIACORE® (GE Healthcare, Piscaataway, NJ) es uno de una diversidad de formatos de ensayo de resonancia de plasmón superficial que se utilizan rutinariamente para paneles de separación por epítomos de anticuerpos monoclonales. Además, se pueden realizar ensayos de bloqueo cruzado rutinarios tales como los descritos en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane, 1988.

Métodos para producir anticuerpos de la invención:

Anticuerpos anti-HER3 humanos de la invención pueden producirse mediante cualquier técnica conocida en la técnica tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, ya sea sola o en combinación.

Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la técnica puede producir fácilmente dichos anticuerpos, mediante técnicas estándares para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, se pueden sintetizar utilizando un método en fase sólida bien conocido, preferiblemente utilizando un aparato de síntesis de péptidos disponible comercialmente (tal como el hecho por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, los anticuerpos de la invención se pueden sintetizar mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener anticuerpos como productos de expresión de ADN tras la incorporación de secuencias de ADN que codifican los anticuerpos en vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en huéspedes eucariotas o procariotas adecuados que expresarán los anticuerpos deseados, de los cuales se pueden aislar más tarde utilizando técnicas bien conocidas.

Por consiguiente, el presente texto describe una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención.

En una realización particular, el presente texto describe una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio VH del anticuerpo de la invención (p. ej., el anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486 (16D3-C1)) o el dominio VL del anticuerpo de la invención (p. ej., el anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4486 (16D3-C1)).

Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN que puede estar incluida en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector viral.

El término "vector" y las expresiones "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (p. ej., un gen extraño) en una célula huésped, para transformar el huésped y fomentar la expresión (p. ej., transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

Por lo tanto, el presente texto también describe un vector que comprende un ácido nucleico de la invención.

Vectores de este tipo pueden comprender elementos reguladores tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para provocar o dirigir la expresión de dicho anticuerpo tras la administración a un sujeto. Ejemplos de promotores y potenciadores utilizados en el vector de expresión para células animales incluyen promotor temprano y potenciador de SV40 (Mizukami T. et al., 1987), promotor LTR y potenciador del virus de la leucemia de ratón Moloney (Kuwana Y et al., 1987), promotor (Mason JO et al., 1985) y potenciador (Gillies SD et al., 1983) de la cadena H de inmunoglobulina y similares.

Puede utilizarse cualquier vector de expresión para células animales, siempre que se pueda insertar y expresar un gen que codifique la región C del anticuerpo humano. Ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji H et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T et al. 1987), pHSG274 (Brady G et al. 1984), pKCR (O'Hare K et al. 1981), pSG1 beta d2 -4-(Miyaji H et al. 1990), y similares.

Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR, y similares.

Otros ejemplos de vectores virales incluyen vectores adenovirales, retrovirales, del virus herpes y AAV. Estos virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como transfectando células de empaquetado o transfección transitoria con plásmidos auxiliares o virus. Ejemplos típicos de células de empaquetado en virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Pueden

encontrarse protocolos detallados para producir tales virus recombinantes defectuosos en la replicación, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.

5 El presente texto también describe una célula huésped que ha sido transfectada, infectada o transformada por un ácido nucleico y/o un vector previamente mencionado.

El término "transformación" significa la introducción de un gen "extraño" (es decir, extrínseco o extracelular), secuencia de ADN o de ARN a una célula huésped, de manera que la célula huésped expresará el gen o la secuencia introducido para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o la secuencia introducido. Una célula huésped que recibe y expresa ADN o ARN introducido ha sido "transformada".

10 Los ácidos nucleicos previamente mencionados pueden utilizarse para producir un anticuerpo de la invención en un sistema de expresión adecuado. La expresión "sistema de expresión" significa una célula huésped y un vector compatible en condiciones adecuadas, p. ej., para la expresión de una proteína codificada por ADN extraño transportado por el vector e introducido en la célula huésped.

15 Sistemas de expresión comunes incluyen células huéspedes de *E. coli* y vectores plasmídicos, células huéspedes de insectos y vectores de Baculovirus, y células huéspedes y vectores de mamíferos. Otros ejemplos de células huéspedes incluyen, sin limitación, células procariontas (tales como bacterias) y células eucariotas (tales como células de levadura, células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, etc.). Ejemplos específicos incluyen *E. coli*, levaduras de *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamíferos (p. ej., células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.) así como cultivos celulares primarios o establecidos de mamíferos (p. ej., producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Ejemplos también incluyen células de ratón SP2/0-Ag14 (ATCC CRL1581), células de ratón P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL1580), células CHO, en las que un gen dihidrofolato reductasa (al que se alude en esta memoria como "gen DHFR") es defectuoso (Urlaub G et al; 1980), células de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (ATCC CRL1662, a las que se alude en esta memoria como "célula YB2/0"), y similares.

25 El presente texto describe también un método para producir una célula huésped recombinante que expresa un anticuerpo de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método las etapas de: (i) introducir in vitro o ex vivo un ácido nucleico recombinante o un vector tal como se ha descrito arriba en una célula huésped competente, (ii) cultivar in vitro o ex vivo la célula huésped recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o segregan dicho anticuerpo. Tales células huéspedes recombinantes se pueden utilizar para la producción de anticuerpos de la invención.

En otra realización particular, el método comprende las etapas de:

(i) cultivar el hibridoma depositado como CNCM-I-4486 en condiciones adecuadas para permitir la expresión del anticuerpo 16D3-C1; y

(ii) recuperar el anticuerpo expresado.

35 Los anticuerpos de la invención se separan adecuadamente del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

40 En una realización particular, el anticuerpo quimérico humano de la presente invención puede producirse obteniendo secuencias nucleicas que codifican los dominios VL y VH como se describió previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano insertándolos en un vector de expresión para células animales que tienen genes que codifican anticuerpo humano CH y anticuerpo humano CL, y expresando la secuencia codificante introduciendo el vector de expresión en una célula animal.

45 Como dominio CH de un anticuerpo quimérico humano puede ser cualquier región que pertenezca a inmunoglobulina humana, pero las de clase IgG son adecuadas y también se pueden utilizar cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Además, como la CL de un anticuerpo quimérico humano puede ser cualquier región que pertenezca a Ig, y pueden usarse las de clase kappa o clase lambda.

50 Métodos para producir anticuerpos quiméricos que implican técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección de genes son bien conocidos en la técnica (véase Morrison SL et al. (1984) y documentos de patente US 5.202.238; y US 5.204.244).

El anticuerpo humanizado de la presente invención puede producirse obteniendo secuencias de ácidos nucleicos que codifican los dominios de la CDR, como se ha descrito previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo humanizado, insertándolas en un vector de expresión para células animales que tienen genes que

codifican (i) una región constante de cadena pesada idéntica a la de un anticuerpo humano y (ii) una región constante de cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano, y expresando los genes introduciendo el vector de expresión en una célula animal.

5 El vector de expresión de anticuerpo humanizado puede ser de un tipo en el que existe un gen que codifica una cadena pesada de anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera de anticuerpo en vectores separados o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado, la facilidad de introducción en células animales y el equilibrio entre los niveles de expresión de las cadenas de anticuerpo H y L en células animales, se prefiere el vector de expresión de anticuerpo humanizado del tipo tándem (Shitara K et al., 1994). Ejemplos de vectores de expresión de anticuerpos humanizados de tipo tándem incluyen pKANTEX93 (documento WO 97/10354), pEE18 y similares.

15 Métodos para producir anticuerpos humanizados basados en técnicas convencionales de ADN recombinante y transfección génica son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Riechmann L. et al. 1988, Neuberger MS et al. 1985). Los anticuerpos pueden humanizarse utilizando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO91/09967; patentes de EE.UU. N°s 5.225.539; 5.530.101 y 5.585.089), recubrimiento o revestimiento (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan EA (1991); Studnicka GM et al. (1994); Roguska MA. et al. (1994)), y el barajeo de la cadena (patente de EE.UU. N° 5.565.332). También se conoce la tecnología general del ADN recombinante para la preparación de tales anticuerpos (véase la Solicitud de Patente Europea EP 125023 y la Solicitud de Patente Internacional WO 96/02576).

20 El Fab de la presente invención se puede obtener tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con HER3 humano con una proteasa, papaína. También se puede producir el Fab insertando ADN que codifica Fab del anticuerpo en un vector para un sistema de expresión procariota, o para un sistema de expresión eucariota, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según sea apropiado) para expresar el Fab.

25 El F(ab')₂ de la presente invención puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con HER3 humano con una proteasa, pepsina. Además, el F(ab')₂ puede producirse uniendo Fab' descrito a continuación a través de un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

30 El Fab' de la presente invención se puede obtener tratando F(ab')₂ que reacciona específicamente con HER3 humano con un agente reductor, ditioneitol. También, el Fab' se puede producir insertando ADN que codifica el fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para procariotas, o un vector de expresión para eucariotas e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según sea apropiado) para llevar a cabo su expresión.

35 El scFv de la presente invención puede producirse obteniendo ADNc que codifica los dominios VH y VL tal como se describió anteriormente, construyendo ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas, o un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo a continuación el vector de expresión en un procariota o eucariota (según sea apropiado) para expresar el scFv. Para generar un fragmento de scFv humanizado, se puede utilizar una tecnología bien conocida denominada injerto de CDR, que implica seleccionar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un fragmento scFv donante e injertarlas en un marco de fragmento de scFv humano de estructura tridimensional conocida (véanse, p. ej., los documentos WO98/45322; WO 87/02671; US 5.859.205; US 5.585.089; US 4.816.567; EP0173494).

40 Se contemplan la modificación o modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en esta memoria. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se sabe que cuando se produce un anticuerpo humanizado mediante el simple injerto de CDRs en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en FRs de VH y VL de un anticuerpo humano, se reduce la actividad de unión a antígeno en comparación con la del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Se considera que varios residuos aminoácidos de la VH y la VL del anticuerpo no humano, no sólo en las CDRs, sino también en las FRs, están asociados directa o indirectamente con la actividad de unión al antígeno. Por lo tanto, la sustitución de estos residuos aminoácidos con diferentes residuos aminoácidos derivados de FRs de la VH y la VL del anticuerpo humano reduciría la actividad de unión. Con el fin de resolver el problema, en anticuerpos injertados con CDR humana, hay que intentar identificar, entre las secuencias de aminoácidos de la FR de la VH y la VL de anticuerpos humanos, un residuo aminoácido que está directamente asociado con la unión al o que interactúa con un residuo aminoácido de la CDR, o que mantiene la estructura tridimensional del anticuerpo y que está directamente asociado con la unión al antígeno. La actividad reducida de unión al antígeno podría aumentarse reemplazando los aminoácidos identificados con los residuos aminoácidos del anticuerpo original derivado de un animal no humano.

Pueden hacerse modificaciones y cambios en la estructura de los anticuerpos de la presente invención, y en las secuencias de ADN que los codifican, y todavía se obtiene una molécula funcional que codifica un anticuerpo con características deseables.

Al hacer los cambios en las secuencias de aminoácidos, se puede considerar el índice hidropático de aminoácidos. La importancia del índice de aminoácidos hidropático en conferir función biológica interactiva a una proteína se entiende generalmente en la técnica. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. A cada uno de los aminoácidos se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de sus características de hidrofobicidad y carga: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); isina (-3,9); y arginina (-4,5).

El presente texto también describe variantes conservadoras de la función de los anticuerpos de la presente invención.

"Variantes conservadoras de la función" son aquéllas en las que se ha cambiado un residuo aminoácido dado en una proteína o enzima sin alterar la conformación y la función globales del polipéptido, incluyendo, pero no limitándose al reemplazo de un aminoácido por uno que tenga un propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace hidrógeno, carácter ácido, carácter básico, hidrofóbico, aromático y similares). Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína, de modo que el porcentaje de similitud de la secuencia de proteínas o aminoácidos entre cualesquiera dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, del 70% al 99% según se determina de acuerdo con un esquema de alineamiento, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante de función conservadora" también incluye un polipéptido que tiene una identidad de aminoácidos de al menos 60%, según se determina por el algoritmo BLAST o FASTA, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 85%, todavía preferiblemente al menos 90% e incluso más preferiblemente al menos 95%, y que tiene las mismas propiedades o funciones sustancialmente similares que la proteína nativa o parental con la que se compara.

Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más del 80%, preferiblemente más del 85%, preferiblemente más del 90% de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente 90%, preferiblemente más de 95% son similares (funcionalmente idénticos) a lo largo de toda la longitud de la secuencia más corta. Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas se identifican mediante alineamiento utilizando, por ejemplo, el programa de acumulación GCG (Genetics Computer Group, Manual de programa para el paquete GCG, Versión 7, Madison, Wisconsin), o cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencias tales como BLAST, FASTA, etc.

Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden estar sustituidos por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de actividad. Dado que la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína definen la actividad funcional biológica de la proteína, pueden realizarse determinadas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteínas y, por supuesto, en su secuencia que codifica el ADN, a la vez que, no obstante, se obtiene una proteína con propiedades similares. Se contempla, por lo tanto, que se pueden hacer diversos cambios en las secuencias de anticuerpos de la invención, o secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos anticuerpos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica.

Se sabe en la técnica que determinados aminoácidos pueden estar sustituidos con otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y que todavía resultan en una proteína con actividad biológica similar, es decir, todavía se obtiene una proteína funcional biológicamente equivalente.

Como se ha indicado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de las cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Sustituciones a modo de ejemplo que tienen en consideración varias de las características anteriores son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Otro tipo de modificación de aminoácidos del anticuerpo de la invención puede ser útil para alterar el patrón de glicosilación original del anticuerpo.

Por "alterar" se entiende suprimir uno o más restos hidrato de carbono encontrados en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de anticuerpos está típicamente enlazada a N. "Enlazada a N" se refiere a la unión del resto hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación enlazados a N).

Otro tipo de modificación covalente implica acoplar glicósidos de forma química o enzimática al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos debido a que no requieren la producción del anticuerpo en una célula huésped que tenga capacidades de glicosilación para la glicosilación enlazada a N u O. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar o azúcares pueden estar unidos a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Por ejemplo, métodos de este tipo se describen en el documento WO87/05330.

La separación de cualesquiera restos hidrato de carbono presentes en el anticuerpo se puede llevar a cabo química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la escisión de la mayoría o todos los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando el anticuerpo intacto. La desglicosilación química se describe por Sojahr H. et al. (1987) y por Edge, AS. et al. (1981). La escisión enzimática de restos hidrato de carbono sobre anticuerpos se puede conseguir mediante el uso de una diversidad de endo- y exo-glicosidasas tal como se describe por Thotakura, NR. et al. (1987).

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende el enlace del anticuerpo a uno de una diversidad de polímeros no proteicos, p. ej., polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera establecida en las patentes de EE.UU. N°s 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

También puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, p. ej., para aumentar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, se puede(n) introducir residuo(s) cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y de muerte de células mediada por el complemento (ADCC) (Caron PC et al. 1992; y Shopes B. 1992)

Inmunoconjugados:

Un anticuerpo de la invención puede conjugarse con un marcador detectable para formar un inmunoconjugado anti-HER3. Marcadores detectables adecuados incluyen, por ejemplo, un radioisótopo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, un marcador bioluminiscente u oro coloidal. Los métodos de fabricación y detección de tales inmunoconjugados marcados de forma detectable son bien conocidos por los expertos ordinarios en la técnica, y se describen con mayor detalle a continuación.

El marcador detectable puede ser un radioisótopo que se detecta por autorradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles para el propósito de la presente invención son ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^{14}C .

Los inmunoconjugados anti-HER3 pueden marcarse también con un compuesto fluorescente. La presencia de un anticuerpo marcado de forma fluorescente se determina exponiendo el inmunoconjugado a la vista de la longitud de onda apropiada y detectando la fluorescencia resultante. Los compuestos de marcaje fluorescentes incluyen isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

Alternativamente, los inmunoconjugados anti-HER3 pueden marcarse de forma detectable acoplando un anticuerpo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del inmunoconjugado marcado con quimioluminiscencia se determina detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscente incluyen luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de acridinio y un éster de oxalato.

De forma similar, se puede utilizar un compuesto bioluminiscente para marcar inmunoconjugados anti-HER3 de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una

proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Compuestos bioluminiscentes que son útiles para el marcaje incluyen luciferina, luciferasa y aequorina.

5 Alternativamente, los inmunoconjugados anti-HER3 pueden marcarse de forma detectable enlazando un anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano a una enzima. Cuando el conjugado enzimático anti-HER3 se incuba en presencia del sustrato apropiado, el resto enzimático reacciona con el sustrato para producir un resto químico que puede ser detectado, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Ejemplos de enzimas que pueden utilizarse para marcar de forma detectable inmunoconjugados poliespecíficos incluyen β -galactosidasa, glucosa oxidasa, peroxidasa y fosfatasa alcalina.

10 Los expertos en la técnica sabrán de otros marcadores adecuados que se pueden emplear de acuerdo con la presente invención. La unión de restos marcadores a anticuerpos monoclonales anti-HER3 humanos se puede llevar a cabo utilizando técnicas estándares conocidas en la técnica. La metodología típica a este respecto se describe por Kennedy *et al.*, *Clin. Chim. Acta* 70: 1, 1976; Schurs *et al.*, *Clin. Chim. Acta* 81:1, 1977; Shih *et al.*, *Int'l J. Cancer* 46: 1101, 1990; Stein *et al.*, *Cancer Res.* 50:1330, 1990; y Coligan, *supra*.

15 Además de ello, la conveniencia y versatilidad de la detección inmunoquímica puede ser potenciada utilizando anticuerpos monoclonales anti-HER3 humanos que han sido conjugados con avidina, estreptavidina y biotina. (Véase, *p. ej.*, Wilchek *et al.* (comps.), "Avidin-Biotin Technology", *Methods in Enzymology* (Vol. 184) (Academic Press 1990), Bayer *et al.*, "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology" en *Methods In Molecular Biology* (Vol. 10) 149-162 (Manson, comp., The Humana Press, Inc., 1992).)

20 Métodos para realizar inmunoensayos están bien establecidos. (Véase, *p. ej.*, Cook y Self, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays", en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application* 180-208 (Ritter y Ladyman, comps., Cambridge University Press 1995), Perry, The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology", en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications* 107-120 (Birch y Lennox, comps., Wiley-Liss, Inc. 1995), Diamandis, *Immunoassay* (Academic Press, Inc. 1996).)

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano. Un "conjugado de anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano de acuerdo con la invención conjugado con un agente terapéutico. Tales conjugados de anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano producen efectos clínicamente beneficiosos sobre células que expresan HER3 cuando se administran a un sujeto tal como, por ejemplo, un sujeto con un cáncer que expresa HER3, típicamente cuando se administra solo, pero también en combinación con otros agentes terapéuticos.

30 En realizaciones típicas, un anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano se conjuga con un agente citotóxico, de modo que el conjugado anticuerpo-fármaco resultante ejerce un efecto citotóxico o citostático en una célula que expresa HER3 (*p. ej.*, una célula cancerosa que expresa HER3) cuando es absorbida o internalizada por la célula. Restos particularmente adecuados para la conjugación con anticuerpos son agentes quimioterapéuticos, enzimas de conversión de profármacos, isótopos o compuestos radiactivos o toxinas. Por ejemplo, se puede conjugar un anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico o una toxina (*p. ej.*, un agente citostático o citocida tal como, por ejemplo, abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o difteria toxina).

40 Clases útiles de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, ligantes de surco menor de ADN, inhibidores de la replicación de ADN, agentes alquilantes (*p. ej.*, complejos de platino tales como cisplatino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino tri-nucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores de quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos de pre-conformación, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores de radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa, alcaloides de la vinca o similares.

45 Agentes citotóxicos individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramicina (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfán, butionina sulfoximina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065 (Li *et al.*, *Cancer Res.* 42: 999-1004, 1982), clorambucil, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, citidina arabinósido, citocalasina B, dacarbazina, dactinomomicina (anteriormente actinomomicina), daunorubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluorodeoxiuridina, fosfato de etopósido (VP-16), 5-fluorouracilo, grammidina D, hidroxiaurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecan, lomustina (CCNU), mecloroetamina, melfalan, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbina, estreptozotocina, tenopósido (VM-26), 6-tioguanina, tioTEPA, topotecán, vinblastina, vincristina y vinorelbina.

Agentes citotóxicos particularmente adecuados incluyen, por ejemplo, dolastatinas (*p. ej.*, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE), aglutinantes de ranuras menores de ADN (*p. ej.*, enediinas y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (*p. ej.* paclitaxel y docetaxel), puromicinas, alcaloides de la vinca, CC-1065, SN-38 (7-etil-10-hidroxi-camptotecina), topotecan, morfolino-doxorubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterobina y mitoxantrona.

En determinadas realizaciones, un agente citotóxico es un agente quimioterapéutico convencional tal como, por ejemplo, doxorubicina, paclitaxel, melfalán, alcaloides de la vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. Además, pueden enlazarse a un anticuerpo que expresa anti-HER3 agentes potentes tales como análogos de CC-1065, caliqueamicina, maitansina, análogos de dolastatina 10, rizoxina y palitoxina.

En variaciones específicas, el agente citotóxico o citostático es auristatina E (también conocida en la técnica como dolastatina-10) o un derivado de la misma. Típicamente, el derivado de auristatina E es, *p. ej.*, un éster formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, la auristatina E puede hacerse reaccionar con ácido para-acetilbenzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados típicos de la auristatina incluyen AFP (dimetilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina-p-fenilendiamina), MMAF (dovalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina) y MAE (monometil auristatina E). La síntesis y estructura de auristatina E y sus derivados se describen en la Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20030083263; las Publicaciones de Patente Internacional N°s WO 2002/088172 y WO 2004/010957; y las Patentes de EE.UU. N°s 6.884.869; 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

En otras variaciones, el agente citotóxico es un agente de unión al surco menor del ADN. (Véase, *p. ej.*, la Patente de EE.UU. N° 6.130.237.). Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el agente de unión al surco menor es un compuesto CBI. En otras realizaciones, el agente de unión al surco menor es una enediina (*p. ej.*, calicheamicina).

En determinadas realizaciones, un conjugado de anticuerpo-fármaco comprende un agente anti-tubulina. Ejemplos de agentes anti-tubulina incluyen, por ejemplo, taxanos (*p. ej.*, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), alquiloides de la vinca (*p. ej.*, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina) y dolastatinas (*p. ej.*, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de bacatina, análogos de taxano (*p. ej.*, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida y eleuterobina. En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes anti-tubulina. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el maitansinoide es maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc., véase también Chari *et al.*, *Cancer Res.* 52:127-131, 1992).

En otras realizaciones, el agente citotóxico es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de purina (*p. ej.*, azotioprina o mifofenolato mofetil), un inhibidor de dihidrofolato reductasa (*p. ej.*, metotrexato), aciclovir, gangciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavarina, azidotimidina, citidina arabinósido, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, poscarnet o trifluridina.

En otras realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano se conjuga a una enzima convertidora de pro-fármacos. La enzima convertidora de pro-fármacos puede fusionarse de forma recombinante con el anticuerpo o conjugarse químicamente con el mismo utilizando métodos conocidos. Enzimas convertidoras de pro-fármacos a modo de ejemplo son carboxipeptidasa G2, β -glucuronidasa, penicilina-V-amidasa, penicilina-G-amidasa, β -lactamasa, β -glucosidasa, nitrorreductasa y carboxipeptidasa A.

Técnicas para la conjugación de agentes terapéuticos a proteínas y, en particular, a anticuerpos, son bien conocidas. (Véase, *p. e.*, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld *et al.* comps., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery," en *Controlled Drug Delivery* (Robinson *et al.* comps., Marcel Dekker, Inc., 2ª ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera *et al.* comps., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin *et al.* comps., Academic Press, 1985); y Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58. Véase también, *p. ej.*, la publicación PCT WO 89/12624.).

Usos diagnósticos:

El presente texto describe también un anticuerpo anti-HER3 humano de la invención para diagnosticar y/o monitorizar una enfermedad cancerosa asociada con la expresión de HER3. Las enfermedades cancerosas asociadas con la expresión de HER3 típicamente incluyen, pero no se limitan a cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico, cáncer de

5 páncreas, tumores de células gliales tales como glioblastoma y neurofibromatosis, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, melanoma, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. En una realización particular, un cáncer diagnosticado utilizando los métodos descritos previamente es cáncer de mama o cáncer de ovario. En una realización preferida, los anticuerpos de la invención son útiles para diagnosticar cáncer de mama y de ovario.

10 En una realización preferida, anticuerpos de la invención pueden marcarse con una molécula o sustancia detectable tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualesquiera otros marcadores conocidos en la técnica como los arriba descritos. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede marcarse con una molécula radiactiva por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, moléculas radiactivas incluyen, pero no están limitadas al átomo radiactivo para estudios de centellografía tales como I123, I124, In111, Re186, Re188. Los anticuerpos de la invención pueden marcarse también con un marcador de spin para la formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono -13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro. Después de la administración del anticuerpo, se detecta la distribución del anticuerpo dentro del paciente. Métodos para detectar la distribución de cualquier marcador específico son conocidos por los expertos en la técnica y puede utilizarse cualquier método apropiado. Algunos ejemplos no limitativos incluyen, tomografía computarizada (TC), tomografía por emisión de positrones (PET), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), fluorescencia, quimioluminiscencia y ecografía.

Anticuerpos de la invención pueden ser útiles para la estadificación de enfermedades cancerosas asociadas con la expresión de HER3 (p. ej., en formación de radioimágenes). Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden ser útiles para estadificar un cáncer de mama o de ovario. Pueden utilizarse solos o en combinación con otros marcadores de cáncer de mama o de ovario, incluyendo, pero no limitados a HER2, CA125, HE4 y mesotelina.

25 Típicamente, dichos métodos de diagnóstico implican el uso de una muestra biológica obtenida del paciente. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "muestra biológica" abarca una diversidad de tipos de muestras obtenidos de un sujeto y se puede utilizar en un ensayo de diagnóstico o monitorización. Muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido tales como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de la misma y la progenie de la misma. Por ejemplo, las muestras biológicas incluyen células obtenidas de una muestra de tejido recogida de un individuo sospechoso de tener una enfermedad cancerosa asociada con la expresión de HER3, y en una realización preferida de mama u ovario. Por lo tanto, muestras biológicas abarcan muestras clínicas, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluido biológico, y muestras de tejidos.

35 En una realización particular, el presente texto describe un método para diagnosticar una enfermedad cancerosa asociada con la expresión de HER3 en un sujeto, detectando HER3 en células del sujeto utilizando el anticuerpo de la invención. En particular, dicho método de diagnóstico puede comprender las etapas que consisten en:

(a) poner en contacto una muestra biológica de un sujeto susceptible de padecer una enfermedad cancerosa asociada con la expresión de HER3 con un anticuerpo de acuerdo con la invención en condiciones suficientes para que el anticuerpo forme complejos con células de la muestra biológica que expresan HER3;

40 (b) detectar y/o cuantificar dichos complejos, con lo que la detección de dichos complejos es indicativa de una enfermedad cancerosa asociada con la expresión de HER3.

Con el fin de monitorizar la enfermedad cancerosa, el método de diagnóstico previamente descrito puede repetirse a diferentes intervalos de tiempo, con el fin de determinar si la unión del anticuerpo a las muestras aumenta o disminuye, con lo que se determina si la enfermedad cancerosa progresa o retrocede.

45 **Usos terapéuticos:**

Anticuerpos, fragmentos o inmunocombinados de la invención pueden ser útiles para tratar cualquier cáncer que exprese HER3. Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse solos o en combinación con cualquier agente adecuado.

50 Ejemplos de cáncer que expresa HER3 incluyen, pero no se limitan a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, tumores de células gliales tales como glioblastoma y neurofibromatosis, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, melanoma, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar,

cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. En una realización particular, un cáncer tratado utilizando los métodos previamente descritos es cáncer de mama o cáncer de ovario.

5 Por lo tanto, en el presente texto se describe un método para tratar un cáncer asociado con la expresión de HER3, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, fragmento o inmunocombinado de la invención.

En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", tal como se utiliza en esta memoria, significa invertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir el trastorno o la afección a la que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de un trastorno o afección de este tipo.

10 De acuerdo con la invención, el término "paciente" o la expresión "paciente que lo necesita" está destinado a un mamífero humano o no humano afectado o susceptible de ser afectado con cáncer asociado con la expresión de cáncer HER3 humano asociado con la expresión de HER3 humano.

15 Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo de la invención se entiende una cantidad suficiente del anticuerpo para tratar dicho cáncer, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los anticuerpos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico que atienda dentro del alcance de un juicio médico acertado. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específica para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores, incluyendo el trastorno que se esté tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del anticuerpo específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del anticuerpo específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el anticuerpo específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, es bien sabido por el experto en la materia iniciar dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado.

25 En determinadas realizaciones, se utiliza un anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano o un conjugado de anticuerpo-fármaco en combinación con un segundo agente para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Cuando se utiliza para tratar el cáncer, se puede utilizar un anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano o un conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención en combinación con terapias convencionales contra el cáncer tales como, p. ej., cirugía, radioterapia, quimioterapia o combinaciones de las mismas. En determinados aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia combinada del cáncer con un anticuerpo anti-HER3 o un conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la presente invención incluyen agentes anti-angiogénicos. En algunos aspectos, se co-administra un anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la presente invención con una citoquina (p. ej., una citoquina que estimula una respuesta inmune contra un tumor).

35 En algunos otros aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia de combinación incluyen un antagonista de determinados factores que están implicados en el crecimiento de tumores tales como, por ejemplo, EGFR, HER2 o HER4.

En una realización preferida, se utiliza un anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano o un conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente invención en combinación con un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humano tal como Trastuzumab o Pertuzumab.

40 En algunas realizaciones, se utiliza un anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano o un conjugado de anticuerpo-fármaco tal como se describe en esta memoria en combinación con un inhibidor de tirosina quinasa (TKI). BAY 43-9006 (sorafenib, Nexavar®) y SU11248 (sunitinib, Sutent®) son dos TKIs de este tipo que han sido aprobadas. Otras TKIs incluyen, pero no se limitan a: mesilato de imatinib (Gleevec®, Novartis); Gefitinib (Iressa®, AstraZeneca); hidrocloreto de erlotinib (Tarceva®, Genentech); Vandetanib (Zactima®, AstraZeneca), Tipifarnib (Zarnestra®, Janssen-Cilag); Dasatinib (Sprycel®, Bristol Myers Squibb); Lonafarnib (Sarasar®, Schering Plough); succinato de vatalanib (Novartis, Schering AG); Lapatinib (Tykerb®, GlaxoSmithKline); Nilotinib (Novartis); Lestaurtinib (Cephalon); hidrocloreto de pazopanib (GlaxoSmithKline); Axitinib (Pfizer); dihidrocloreto de canertinib (Pfizer); Pelitinib (National Cancer Institute, Wyeth); Tandutinib (Millenium); Bosutinib (Wyeth); Semaxanib (Sugen, Taiho); AZD-2171 (AstraZeneca); VX-680 (Merck, Vertex); EXEL-0999 (Exelixis); ARRY-142886 (Array BioPharma, AstraZeneca); PD-0325901 (Pfizer); AMG-706 (Amgen); BIBF-1120 (Boehringer Ingelheim); SU-6668 (Taiho); CP-547632 (OSI); (AEE-788 (Novartis), BMS-582664 (Bristol-Myers Squibb), JNK-401 (Celgene), R-788 (Rigel), AZD-1152 HQPA (AstraZeneca), NM-3 (Genzyme Oncology) CP-868596 (Pfizer), BMS-599626 (Bristol-Myers Squibb), PTC-299 (PTC Therapeutics), ABT-869 (Abbott), EXEL-2880 (Exelixis), AG-024322 (Pfizer), XL-820 (Exelixis); OSI-930 (OSI), XL-184 (Exelixis); KRN-951 (Kirin Brewery); CP-724714 (OSI); E-7080 (Eisai); HKI-272 (Wyeth); CHIR-258 (Chiron); ZK-304709 (Schering AG); EXEL-7647 (Exelixis); BAY-57-9352 (Bayer); BIBW-2992 (Boehringer Ingelheim); AV-412 (AVEO); YN-968D1 (Advenchen Laboratories); Midostaurin (Novartis); Perifosine (AEterna

Zentaris, Keryx, National Cancer Institute); AG-024322 (Pfizer); AZD-1152 (AstraZeneca); ON-01910Na (Onconova); y AZD-0530 (AstraZeneca).

Composiciones farmacéuticas:

5 Para la administración, el anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano o el conjugado de anticuerpo-fármaco se formula como una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-HER3 humano o un conjugado de anticuerpo-fármaco puede formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, en donde la molécula terapéutica se combina en una mezcla con un soporte farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "soporte farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor. Solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un soporte farmacéuticamente aceptable. Otros soportes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. (Véase, p. ej., Gennaro (comp.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19ª edición, 1995).). Las formulaciones pueden incluir, además, uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tampón, albúmina para evitar la pérdida de proteínas en las superficies de los viales, etc.

15 La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente de la afección a tratar, de la gravedad de la enfermedad, de la edad, peso y sexo del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para una administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y similares.

20 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Éstas pueden ser, en particular, soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente composiciones liofilizadas que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

25 Las dosis utilizadas para la administración pueden ser adaptadas en función de diversos parámetros y, en particular, en función del modo de administración utilizado, de la patología relevante, o alternativamente de la duración deseada del tratamiento.

Para preparar composiciones farmacéuticas, una cantidad eficaz del anticuerpo puede disolverse o dispersarse en un soporte o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

30 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una facilidad de jeringa. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

35 Disoluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

40 Un anticuerpo de la invención puede formularse en una composición en forma neutra o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales por adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como los ácidos acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

50 El soporte puede ser también un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En

muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes arriba enumerados, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los arriba enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado en vacío y liofilización que proporcionan un polvo del
10 ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución filtrada previamente en condiciones estériles del mismo.

También se contempla la preparación de disoluciones más o altamente concentradas para la inyección directa, en las que se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar lugar a una penetración extremadamente rápida, proporcionando concentraciones elevadas de los agentes activos a una zona tumoral pequeña.

15 Tras la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas de dosificación tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

20 Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe ser adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido se hace primero isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos por los expertos en la técnica a la vista de la presente descripción. Por ejemplo, se puede disolver una dosis en 1 ml de solución isotónica de NaCl y se añade a 1000 ml de fluido de hipodermocisis o se inyecta en el
25 sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente se producirá alguna variación en la dosificación dependiendo del estado del sujeto que se esté tratando. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para cada sujeto.

30 Los anticuerpos de la invención se pueden formular dentro de una mezcla terapéutica para que comprenda aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis o algo así. También se pueden administrar dosis múltiples.

Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tales como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, p. ej., comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación en el tiempo; y cualquier otra forma actualmente utilizada.

35 En determinadas realizaciones, se contempla el uso de liposomas y/o nanopartículas para la introducción de anticuerpos en células huéspedes. La formación y el uso de liposomas y/o nanopartículas son conocidos por los expertos en la técnica.

40 Generalmente, las nanocápsulas pueden atrapar compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (de un tamaño de alrededor de 0,1 μm) se diseñan generalmente utilizando polímeros que pueden degradarse in vivo. Se contemplan nanopartículas de cianoacrilato de polialquilo biodegradables que cumplen estos requisitos para uso en la presente invención, y tales partículas pueden ser fácilmente fabricadas.

45 Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares (a las que también se denomina vesículas multilamelares (MLV)). Las MLVs tienen generalmente diámetros de 25 nm a 4 μm . La sonicación de MLVs da lugar a la formación de pequeñas vesículas unilamelares (SUVs) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una disolución acuosa en el núcleo. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

Kits:

50 Finalmente, el presente texto también describe kits que comprenden al menos un anticuerpo de la invención. Los kits que contienen anticuerpos de la invención encuentran uso en la detección de la expresión de HER3, o en ensayos terapéuticos o diagnósticos. Los kits pueden contener un anticuerpo acoplado a un soporte sólido, p. ej., una placa

de cultivo de tejidos o perlas (p. ej., perlas de sefarosa). Pueden proporcionarse kits que contengan anticuerpos para la detección y cuantificación de HER3 in vitro, p. ej., en un ELISA o una transferencia Western. Un anticuerpo de este tipo útil para la detección puede proporcionarse con un marcador tal como un fluorescente o radiomarcador.

5 La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse en modo alguno como limitativos del alcance de la presente invención.

FIGURAS:

La Figura 1A muestra la unión de HER3 frente a HER2 y Fc de los anticuerpos monoclonales seleccionados.

La Figura 1B muestra la reactividad de los anticuerpos IgG de ratón purificados de la invención frente a HER3 de ratón, con respecto al anticuerpo Ab6.

10 La Figura 2 muestra curvas de unión (A) y producción (B) ELISA de mAbs purificados a antígeno HER3.

Las Figuras 3 muestran el perfil de unión específico de citometría de flujo (media geométrica) de IgG de ratón purificado 4H9-B11, 9B4-D6, 9F7-F11, 11G10-D2, 12H8-B11, 14H1-H8, 15D4-F2 y 16D3-C1 a células NIH 3T3 transfectadas con wt, EGFR, HER2, HER3, HER2/HER3 y EGFR/HER4. El anticuerpo Px es un control negativo. Están indicados los anticuerpos competidores Ab6 y U1-59.

15 La Figura 4 muestra la cinética de unión de BIACORE de los mAbs 16D3-C1, 9F7-F11 y 12H8-B11. La Tabla 6 muestra la afinidad de los anticuerpos purificados de ratón 9F7-F11, 11G10-D2, 12H8-B11, 14H1-H8, 15D4-F2 y 16D3-C1 de la invención con respecto al anticuerpo Ab6.

20 La Figura 5 muestra el experimento de competición FACS entre anticuerpos 16D3-C1, 9F7-F11 y 12H8-B11 específicos para HER3 y heregulina sobre células SKBR3. Están indicados los anticuerpos A, B y C de control positivo específicos para HER3.

La Figura 6 muestra la fosforilación total con HER2 de células NIH 3T3 transfectadas con HER2/HER3 tratadas con mAbs murinos anti-HER3 según se determinó mediante ELISA.

La Figura 7 muestra la fosforilación total con HER3 de células NIH 3T3 transfectadas con HER2/HER3 tratadas con mAbs murinos anti-HER3 según se determinó mediante ELISA.

25 La Figura 8 muestra la inhibición de la fosforilación de Y1289 HER3/Y1196 HER2 (A) e Y1262 HER3/Y1112 HER2 (B) por parte de mAbs anti-HER3 en células NIH 3T3 transfectadas con HER2/HER3. Se utilizó GAPDH como control en las transferencias western.

La Figura 9 muestra la inhibición de la fosforilación de receptores HER2/HER3 y la señalización PI3K/Akt aguas abajo utilizando mAbs murinos anti-HER3 16D3-C1 y 9F7-F11 en células de carcinoma pancreático BxPC3.

30 La Figura 10 muestra la inhibición inducida por anticuerpos de la internalización de HER3 en el carcinoma pancreático BxPC3 por transferencia western (A) y cuantificación de la internalización de HER3 (software Image J) (B).

35 La Figura 11 muestra la inhibición de la proliferación de células NIH 3T3 transfectadas con HER2/HER3 y diversas líneas de células tumorales por anticuerpos específicos para HER3 murinos, según se mide mediante el ensayo MTS.

La Figura 12 muestra la inhibición de la heterodimerización de HER2/HER3 por mAbs anti-HER3 en células NIH 3T3 transfectadas con HER2/HER3, según se midió mediante análisis TR-FRET.

40 La Figura 13 identifica el epítipo reconocido por el mAb 16D3-C1. (A) Análisis puntual de la región reconocida por el anticuerpo 16D3-C1 anti-HER3. (B) Análisis Alaskan de la región reconocida por el mAb 16D3-C1, y (C) cuantificación de píxeles de la unión 16D3-C1 a péptidos HER3 (software Image J).

La Figura 14 identifica el epítipo reconocido por el mAb 9F7-F11. (A) Análisis puntual de la región reconocida por el anticuerpo 9F7-F11 anti-HER3. (B) Análisis Alaskan de la región reconocida por el mAb 9F7-F11, y (C) cuantificación de píxeles de la unión de 9F7-F11 a péptidos HER3 (software Image J).

La Figura 15 muestra el posicionamiento de los Residuos Contribuyentes de la Puntualización reconocidos por los mAbs 16D3-C1 y 9F7-F11 sobre la estructura cristalográfica del receptor HER3 no ligado (pdb 1M6B) (lado izquierdo) y la superposición sobre este epítipo sobre la estructura cristalográfica del receptor HER2 unido a pertuzumab (pdb 1S78) (lado derecho).

- 5 La Figura 16 muestra la inhibición de la progresión del tumor por los mAbs 16D3-C1 y 9F7-F11 en ratones inmunodeficientes xenoinjertados con células de cáncer epidermoide A431 adictas a HRG, no amplificadas con *HER2/PIK3CAwt/p53-mut* (A), y la correspondiente curva de supervivencia de Kaplan-Meier (B).

- 10 La Figura 17 muestra la inhibición de la progresión del tumor por parte de los mAbs 9F7-F11 y 16D3-C1 en ratones desnudos xenoinjertados con células pancreáticas cancerosas BxPC3, no amplificadas con *HER2/PIK3CA-wt/p53-wt* (A) y la correspondiente curva de supervivencia de Kaplan-Meier (B).

La Fig.18 muestra el nivel de fosforilación de Y1289-HER3 y la expresión total de HER3 en xenoinjertos BxPC3 extraídos de ratones tratados con vehículo o 16D3-C1.

- 15 La Figura 19 muestra la inhibición de la progresión del tumor por parte del mAb 16D3-C1 específico para HER3, utilizado solo o en combinación con trastuzumab, en células cancerosas adictas a HRG, A431 HER2^{bajo} epidermoides (A) y A549 (B) de pulmón.

EJEMPLO1: GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DE RATÓN POR INMUNIZACIÓN

Inmunización de Balb/c y Generación de Hibridomas.

- 20 Anticuerpos monoclonales contra HER3 se desarrollaron por inmunización secuencial de ratones Balb/c. La proteína HER3-Fc (R&D system) se utilizó como antígeno. Se inyectaron por vía subcutánea a un primer grupo de 5 ratones Balb/c 10 µg de HER3-Fc soluble el día 0, el día 14 y el día 28 en presencia de adyuvante, completo o incompleto de Freund. A un segundo grupo de 5 ratones Balb/c se inyectó por vía intraperitoneal una línea de células NIH 3T3 transfectada con HER2/HER3 (alrededor de 2×10^6 células), previamente estimulada con heregulina (HRG) para fomentar la formación de heterodímeros HER2/HER3. Para monitorizar la respuesta de anticuerpos, se midieron los títulos de anticuerpos mediante ELISA o citometría de flujo. Células del bazo de ratones inmunizados se fusionaron de acuerdo con el protocolo ya descrito (Salhi et al., Biochem., J. 2004) utilizando el mieloma PX63Ag8.653. 10^5 células fusionadas por pocillo se cultivaron en placas con medio HAT para la selección de hibridomas. Después de 25 12 días post-fusión, se realizó el rastreo del sobrenadante de hibridoma mediante ELISA utilizando la proteína HER3-Fc como antígeno. En control, los rastreos se harán simultáneamente con los antígenos discriminantes HER2-Fc y el fragmento Fc solo.

- 30 Tal como se muestra en la Figura 1A, se seleccionaron trece anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos para HER3. Son específicos para el HER3-Fc soluble y no reconocen el resto Fc. Se seleccionaron cuatro anti-HER3 de ratón Balb/c inmunizado con HER3-Fc y se seleccionaron 9 anti-HER3 de ratones Balb/c inmunizados con células 3T3 transfectadas con HER2/HER3 estimuladas con heregulina. No se observó unión con el antígeno HER2-Fc.

- 35 Los anticuerpos anti-HER3 seleccionados se compararon con otros dos anticuerpos Ab6 anti-HER3 (Merrimack Pharmaceuticals) y U1-59 (Amgen/U3 Pharma-Daiichi Sankyo). U1-59 y Ab6 fueron construidos en base a la descripción de las secuencias en las patentes US2008/0124345A1 y US2009/0291085A1, respectivamente.

- 40 La reactividad cruzada con el receptor HER3 de ratón se evaluó mediante un ensayo ELISA comparativo con HER3-Fc humano inmovilizado y HER3-Fc de ratón (quimera ErbB3/HER3 Fc de dominio extracelular recombinante de ratón, R & D Systems) revestidos a razón de 250 ng/ml. La mayoría de los clones de la invención, a una concentración de 1 µg/ml, no reaccionó de forma cruzada con HER3 de ratón (Fig. 1B), mientras que el anticuerpo Ab6 reconoció a HER3 de ratón y humano. Los clones 9F7-F11 y 16D3-C1 fueron los mejores aglutinantes. El anticuerpo de control Px irrelevante no se unió a receptores HER3 humanos ni de ratón.

Unión ELISA a HER3

- 45 Se revistieron placas de inmunoensayo enzimático de noventa y seis pocillos (Nunc, Paisley, Reino Unido) durante la noche a 4°C con antígeno HER3-Fc a una concentración de 250 ng/ml en PBS 160 mM pH 7,2. Después de cuatro lavados en PBS 160 mM pH 7,2, que contenían Tween 20 al 0,1% (PBS-T), las placas se saturaron con una disolución al 1% de albúmina de suero bovino (BSA) en tampón PBS-T durante 60 min a 37°C. Se añadieron diluciones en serie doble de mAbs purificados específicos para HER3 después de cuatro lavados en PBS-T y las placas se incubaron a 37°C durante 2 h. Después de cuatro lavados en PBS-T, se añadieron 100 µl de un anticuerpo 50 IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa (Sigma) a cada uno de los pocillos. El conjugado se utilizó a una dilución 1:2000 en PBS-T-BSA al 1%. Las placas se incubaron a 37°C durante 60 min y después se lavaron cuatro veces en

5 PBS-T. Finalmente se añadió una disolución de ortofenilendiamina (Sigma) durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad y se midió la absorbancia a 450 nm. Los mAbs anti-HER3 reaccionaron específicamente con el antígeno HER3 de una manera específica de la dosis; los anticuerpos 16D3-C1, 9F7-F11, 15D4-F2 y 23H2-B3 son los más reactivos (Figura 2A). En contraposición, Ab6 y los anticuerpos U1-59 eran menos reactivos para la unión al receptor HER3. La concentración de anticuerpo que daba 50% de absorbancia era menor que 1-10 ng/ml para los anticuerpos 16D3-C1, 9F7-F11, 15D4-F2 y 23H2-B3, mientras que Ab6 y U1-59 mostraban una señal del 50% en torno a 200 ng/ml. Todos los anticuerpos específicos para HER3 se produjeron en fluido ascítico y se purificaron mediante inmunoadfinidad de proteína A (Figura 2B).

Análisis de citometría de flujo a células HER3-positivas

10 Fibroblastos NIH 3T3 transfectados con EGFR, HER2, HER3, HER2/HER3 y EGFR/HER4 (10⁶ células) se incubaron con los mAbs anti-HER3 en PBS-BSA al 0,1% a 4°C durante 1 h. Después de tres lavados en PBS-BSA al 0,1%, las células se incubaron con el IgG anti-ratón conjugado con fluoresceína (1:50) (Sigma) a 4°C en la oscuridad durante 45 min. Las células se lavaron entonces tres veces y se suspendieron en PBS para el análisis utilizando un citómetro de flujo EPICS (Beckman-Coulter, Fullerton, CA). Tal como se muestra en la Figura 3, todos los mAbs específicos para HER3 se unieron a células NIH 3T3 transfectadas con HER3 y HER2/HER3, pero no a tipo salvaje, EGFR, HER2 y EGFR/HER4. La unión de las células NIH3T3 transfectadas con HER2/HER3 (media geométrica) era mayor para los anticuerpos 9B4-D6, 12H8-B11, 15D4-F2 y 16D3-C1 que para los anticuerpos Ab6 y U1-59.

Medición de la afinidad por BIACORE

20 La unión de HER3 de anticuerpos seleccionados se confirmó mediante análisis BIACORE (Figura 4). El análisis BIACORE se ha realizado utilizando las instalaciones de análisis de interacción localizadas en el Instituto de Investigación del Cáncer de Montpellier (plataforma PP2I, M. Pugnère). Los parámetros cinéticos de la unión del receptor HER3 a anticuerpos seleccionados se determinaron a 25°C por análisis de resonancia de plasmón superficial utilizando un instrumento BIACORE 3000 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Se inmovilizaron anticuerpos específicos para HER3 en la superficie del chip sensor CM5 utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-ratón capturado (Sigma-Aldrich). El anticuerpo capturado se inmovilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El receptor HER3 en tampón HBS-EP que contenía HEPES 10 mM (pH 7,4), EDTA 3 mM, NaCl 150 mM y tensioactivo no iónico P20 (GE Healthcare) al 0,005% se inyectó después a concentraciones de 50 µg/ml a lo largo de la celda de flujo y la fase de disociación fue seguida de una etapa de regeneración con disolución de HCl 10 mM (Fig.4). El caudal era de 50 µl/min. Todos los sensorgramas se corrigieron suprimiendo la señal de la celda de flujo control. Los datos se ajustaron globalmente a un modelo de analito bivalente utilizando el software BIAevaluation Versión 4.1.1 (Fig.4). La tasa de asociación (k_a) para los anticuerpos seleccionados osciló en torno a $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, bastante similar a la obtenida para el anticuerpo Ab6 (Tab. 6). En contraposición, la constante de disociación para cada uno de los anticuerpos era más variable, explicando por qué se observan diferencias notables en los valores de K_D . Los anticuerpos 16D3-C1, 12H8-B11 y 9F7-F11 mostraron las mejores afinidades, en un intervalo de 1-5 nM, similarmente al valor medido para el anticuerpo Ab6.

Anticuerpo	k_a $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	k_d s^{-1}	K_D nM
9F7-F11	$5,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^{-4}$	4,4
11G10-D2	$3,5 \times 10^5$	$7,9 \times 10^{-3}$	22,6
12H8 - B11	$6,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^{-4}$	2,4
14H1 - H8	$1,3 \times 10^5$	$4,0 \times 10^{-3}$	30,7
15D4-F2	$2,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-2}$	63,7
16D3-C1	$8,7 \times 10^4$	$8,9 \times 10^{-5}$	1,0
Ab6	$9,3 \times 10^4$	$3,1 \times 10^{-4}$	3,3

Tabla 6

Competencia con heregulina

40 Se realizaron experimentos de competición de citometría con el fin de cuantificar la capacidad de HRG para inhibir la unión de anticuerpo a HER3 en un ensayo basado en células SKBR3. Con este fin, 10⁵ células SKBR3 se preincubaron con diversas concentraciones del ligando HRG competidor durante 1,5 h en hielo. Después de un lavado

con PBS-BSA al 1%, se añadieron mAbs anti-HER3, a la concentración que daba la unión máxima al 50%, a cada uno de los pocillos durante 1 h sobre hielo. En algunos experimentos, ligando HRG y anticuerpos anti-HER3 fueron co-incubados durante 2 h en hielo. Después se lavaron las células y se incubaron adicionalmente con una dilución 1:60 de anticuerpo secundario conjugado con FITC (Sigma) durante 45 minutos en hielo, antes del análisis de citometría en un aparato Quanta (Beckman-Coulter). Los experimentos de competición por FACS demostraron que el anticuerpo 9F7-F11 no competía con heregulina, lo que sugiere que este anticuerpo no se unió al sitio de unión de HRG (Fig.5). La unión del anticuerpo 9F7-F11 se aumentó incluso cuando se añadió HRG, mientras que la unión del anticuerpo control A positivo no se modificó mediante la incubación de HRG. En contraposición, los anticuerpos 12H8-B11 y 16D3-C1, así como los anticuerpos B y C de control positivo, mostraron una disminución de la unión dependiente de HRG al receptor HER3, demostrando que los epítopos reconocidos por estos anticuerpos están cerrados o localizados en el sitio de unión de HRG, o podría estar impedido estéricamente para la unión del anticuerpo cuando HRG induce la transconformación del receptor HER3 activo para la dimerización (Fig. 5). La concentración inhibitoria que condujo al 50% de unión varió en torno a 2,5 nM de ligando HRG para los anticuerpos 12H8-B11 y 16D3-C1. Se obtuvieron resultados similares por secuenciación o co-incubación de HRG con anticuerpos.

EJEMPLO 2 INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE HER2 Y HER3 POR ANTICUERPOS ANTI-HER3 DE LA INVENCION

Estimulación con HRG de fibroblastos NIH 3T3 transfectados

Un total de 8×10^4 células NIH 3T3 transfectadas con ErbB2/HER3 se cultivaron en placas de 6 pocillos durante 72 h en RPMI-FCS al 5% y durante 24 h más en RPMI-FCS al 1%. Las células se incubaron luego con mAbs de ratón específicos para HER3 a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ en RPMI-FCS al 1% durante 1 h a 37°C. Después de retirar los anticuerpos, la estimulación del ligando se realizó incubando las células tratadas con anticuerpo con una disolución de HRG 100 ng/ml durante 10 min a 37°C. Después del lavado en Dulbecco-PBS (D-PBS) frío, las células se rasparon dos veces de platos de plástico utilizando un polímero de caucho en 0,5 ml de D-PBS frío. Después de centrifugación durante 1 min a 11.000 g, los sedimentos celulares se lisaron en 50 μl de tampón de lisis que contenía Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl_2 1,5 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1% (v/v), glicerol al 10% (v/v), fluoruro sódico 100 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM (Sigma) y una tableta de mezcla completa de inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics, Meylan, Francia). Después de incubación de 30 minutos, las muestras se eliminaron de la fracción insoluble por centrifugación y las concentraciones de proteína en lisados celulares se determinaron por reacción colorimétrica de Bradford.

Medición por ELISA de la fosforilación total de HER2 y HER3 en fibroblastos 3T3 transfectados con HER2/HER3

HER2 y HER3 fosforilados con tirosina en lisados celulares se cuantificaron utilizando ELISA en sándwich DuoSet^R (RD Systems, Minneapolis, MN), según lo descrito por el fabricante. Tal como se muestra en la Figura 6 y la Figura 7, los mAbs 16D3-C1 y 9B4-D6 inhibieron la fosforilación total de HER2 y HER3, al igual que trastuzumab control. Los mAbs 9F7-F11 y 24E3-C10 bloquearon la fosforilación de HER2.

PAGE-SDS y análisis de transferencia western de la fosforilación de HER2 en Y1112 e Y1196 frente a la fosforilación de HER3 en Y1262 e Y1289 en fibroblastos 3T3 transfectados con HER2/HER3

Después de la electroforesis en SDS-PAGE al 7% en condiciones reductoras, los lisados celulares se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (Millipore, Molsheim, Francia) que se saturaron en Tris 25 mM pH 7,4, tampón NaCl 150 mM que contenía Tween 20 (TNT) al 0,1% y 5% de leche desnatada en polvo durante 1 h a temperatura ambiente. Una disolución de 1 $\mu\text{g/ml}$ en TNT-BSA al 5% de anticuerpos dirigidos a Y1112 (Millipore) o Y1196 (RD Systems) fosforilados con HER2 y dirigidos a Y1262 (RD Systems) o Y1289 (Cell Signalling Technology) fosforilados con HER3 se incubaron durante 18 horas a 4°C. Después de cinco lavados en TNT, los borrones de transferencia se incubaron con anticuerpos específicos para ratón conjugados con peroxidasa (1/2000) o específicos para conejos (1/10000) (Sigma) según sea apropiado, durante 1 h en TNT-5% de leche en polvo desnatada a temperatura ambiente. Después de 5 lavados en TNT, las manchas se visualizaron utilizando un sustrato quimioluminiscente (Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer). Tal como se indica mediante transferencia western en las Figuras 8A y 8B, los mAbs 16D3-C1 y 9B4-D6 bloquearon la fosforilación de HER2 en Y1196 y Y1112, y la fosforilación de HER3 en Y1262 y Y1289, al igual que trastuzumab de control.

Inhibición de la fosforilación e internalización del receptor HER3 en células de carcinoma pancreático BxPC3

Se añadieron mil quinientas células tumorales BxPC3 a cada uno de los pocillos de una placa de cultivo de 6 pocillos durante 24 h a 37°C. Después de una inanición de suero durante 16 h en un medio RPMI completo con FCS al 1% y lavado adicional, las células se pre-incubaron con una concentración de anticuerpos 16D3-C1 y 9F7-F11 de 50

5 $\mu\text{g/ml}$ o anticuerpo de control negativo durante 15 min a 37°C, antes del lavado y la posterior estimulación o no con una dilución de 100 ng/ml de heregulina. Las células fueron después lavadas, raspadas y lisadas con tampón que contenía Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl_2 1,5 mM, EDTA 1 mM, Triton al 1%, glicerol al 10%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM, fluoruro de sodio 100 mM, ortovanadato sódico 1 mM (Sigma-Aldrich) y un comprimido completo de mezcla de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Después de un tiempo de incubación de 30 min, se eliminaron las muestras de la fracción insoluble por centrifugación y se determinaron las concentraciones de proteína en lisados celulares mediante el ensayo de Bradford. Estos lisados proteicos se mezclaron directamente con tampón Laemmli (1-20 μg de proteínas totales dependiendo de la diana y líneas celulares) y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Después de la electroforesis en SDS-PAGE al 7% en condiciones reductoras, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (Millipore) que luego se saturaron en tampón TNT (Tris 25 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween al 0,1%) que contenía 5% de leche en polvo desnatada durante 1 h a 25°C. Los anticuerpos primarios, dirigidos a receptores de quinasa o quinasas de señalización, y sus formas fosforiladas, se incubaron en tampón TNT-BSA al 5% durante 18 h a 4°C. Después de cinco lavados en tampón TNT, se añadieron anticuerpos policlonales de conejo, cabra o ratón conjugados con peroxidasa (Sigma-Aldrich) en tampón TNT que contenía 5% de leche en polvo desnatada durante 1 h a 25°C. Después de cinco lavados en tampón TNT, los borrones se visualizaron utilizando un sustrato quimioluminiscente (Western lightning Plus-ECL, Perkin Elmer).

20 Sorprendentemente, los anticuerpos 16D3-C1 y 9F7-F11 bloquearon la fosforilación inducida por ligando sobre los residuos HER3 en Y1289 e Y1262 (Fig. 9); siendo el anticuerpo 9F7-F11 el más eficaz. La inhibición de la fosforilación de Akt en Ser473 y Thr308 se demostró concomitantemente después de un tratamiento de corta duración de 15 minutos de los anticuerpos 16D3-C1 y 9F7-F11 en células BxPC3. La fosforilación de la señalización aguas abajo activada por AKT también se vio afectada por los anticuerpos seleccionados, *es decir*, la inhibición de la fosforilación de la proteína ribosómica fosfo-S6 que reduce la síntesis de proteínas, el bloqueo de la fosforilación de FoxO1a que favorece la transcripción nuclear del gen conduce a la apoptosis y a la detención del ciclo celular. La disminución de fosfo-MDM2 que impide la degradación de p53 y la inhibición de fosfo-GSK3 α/β que bloquea el ciclo celular y favorece la apoptosis (Fig.9).

30 Las células BxPC3 se analizaron para determinar la expresión de la superficie celular del receptor HER3 después de la exposición a anticuerpos 9F7-F11 y 16D3-C1 para diferentes tiempos y temperaturas. Tal como se muestra en la Figura 10A, una incubación de anticuerpo durante 2h de células BxPC3 a 37°C redujo fuertemente la expresión de la superficie celular HER3. Dicha regulación negativa de HER3 inducida por anticuerpos se anuló cuando las células se trataron a 4°C, demostrando así que los anticuerpos 9F7-F11 y 16D3-C1 específicos para HER3 inducían la internalización de HER3. En contraposición, la internalización de HER3 era menor cuando se trataron células BxPC3 con anticuerpo Ab6 (Fig.10A). La cuantificación de la internalización de HER3 confirmó que los anticuerpos 16D3-C1 y 9F7-F11 son más eficientes que Ab6 para inducir la internalización de HER3 (Fig.10B). Un tratamiento con anticuerpo durante 2 h indujo una internalización de HER3 del 73% y 78% con anticuerpos 16D3-C1 y 9F7-F11 respectivamente, y sólo un 42% de internalización para el anticuerpo Ab6 (Fig.10B).

EJEMPLO 3: INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

40 Se cultivó un total de 10^4 fibroblastos NIH 3T3 transfectados con HER2/HER3 en placas de 96 pocillos durante 24 h en medio DMEM completo. Las células se incubaron luego con anticuerpos anti-HER3 a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ durante 5 días a 37°C. La proliferación se midió añadiendo 40 μl /pocillo de una disolución que contenía el compuesto de tetrazolio MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] y el reactivo de acoplamiento de electrones PMS (metosulfato de fenazina). El MTS se reduce mediante células en un producto formazano que es soluble en medio de cultivo tisular. La absorbancia del formazano a 490 nm se puede medir utilizando un espectrofotómetro. Tal como se muestra en la Figura 11, los mAbs 16D3-C1 y 9F7-F11 inhibieron 23,7% y 32,0% de la proliferación de fibroblastos NIH 3T3 transfectados con HER2/HER3, respectivamente. No se observó inhibición significativa de NIH 3T3 transfectados con HER2/HER3 con los otros anticuerpos específicos para HER3. Además, 16D3-C1 y 9F7-F11 inhibieron la proliferación de carcinoma epidermoide A431, línea celular de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB361, tumores ováricos epiteliales de ascitis primaria 1 (clon A5) y 2 (clon C9), metástasis 2815 y OVCAR3 y SKOV3. La proliferación de la línea celular T47D de cáncer de mama, y carcinoma de pulmón A549 fue inhibida por el mAb 9F7-F11 únicamente.

EJEMPLO 4: MEDICIÓN DE LA INHIBICIÓN INDUCIDA POR ANTICUERPOS DE LA HETERODIMERIZACIÓN DE HER2/HER3 POR TRANSFERENCIA DE ENERGÍA POR ESONANCIA DE FLUORESCENCIA REUSLETA EN EL TIEMPO (TR-FRET)

55 El ensayo se realizó en células adherentes utilizando un anti-HER2 (FRP5) y un anti-HER3 (15D4-F2), marcados respectivamente con criptato de Lumi4-terbio y el colorante aceptor D2 (Cisbio Bioassays). Estos mAbs se eligieron debido a sus epítotos diana diferentes de los mAbs estudiados de interés. Células NIH 3T3 transfectadas con HER2/HER3 se sembraron en placas durante 24 h a razón de 3×10^5 por pocillo en microplacas negras estériles de 96 pocillos en medio DMEM (sin rojo fenol) complementado con suero de ternero fetal al 10%. Se trataron con

diversas concentraciones de mAbs murinos específicos para HER3 durante 30 min a 37°C. Después de lavar en tampón KREBS, las células se fijaron después durante 2 min en formalina al 10% (Sigma-Aldrich) y se lavaron una vez con KREBS. Después de la incubación con anticuerpos marcados (5 nM cada uno) diluidos en KREBS durante 6 horas a 37°C, las células se lavaron 4 veces con tampón KREBS. La fluorescencia de Lumi4-terbio y D2 se midieron respectivamente a 620 y 665 nm (60 μ s de demora, 400 μ s de integración) tras excitación a 337 nm en un instrumento Pherastar FS. Las diluciones en serie de los anticuerpos marcados con Lumi4-terbio en KREBS se midieron simultáneamente en la misma placa de microtitulación y la emisión a 665 nm se representó frente a la emisión a 620 nm. La curva resultante se utilizó para computar la contribución a 665 nm a partir del terbio ($E_{665_{Tb}}$) utilizando la emisión a 620 nm (E_{620}) de las muestras. La señal TR-FRET se expresó como $\Delta 665$ (%) = $\Delta 665 / 665_{Tb}$, con $\Delta 665 = E_{665c} - E_{665_{Tb}}$; las emisiones a 665 nm y 620 nm de las muestras se corrigieron desde el fondo como $E_{665c} = E_{665_{muestra}} - E_{665_{fondo}}$ y $E_{620c} = E_{620_{muestra}} - E_{620_{fondo}}$. La $E_{665_{fondo}}$ y la $E_{620_{fondo}}$ se miden en un blanco que contiene solamente el tampón de lectura. La señal de TR-FRET expresada como $\Delta 665$ (%) representa la cantidad de dímero HER2/HER3. La emisión de fluorescencia resuelta en el tiempo a 620 nm se correlaciona con la cantidad de HER2. Al mismo tiempo, se midió la fluorescencia inmediata de D2 a 670 nm con excitación a 620 nm para cuantificar los receptores HER3. Para cada una de las muestras, se obtuvieron controles realizando el mismo experimento con células no tratadas o con células tratadas con anticuerpo irrelevante, trastuzumab y pertuzumab. Tal como se muestra en la Figura 12, los mAbs 16D3-C1, 24E3-C10 y 9F7-F11 indujeron una inhibición dependiente de la dosis de la heterodimerización de HER2/HER3, mientras que los otros anticuerpos (y particularmente 12H8-B11) no. No se observó un bloqueo con anticuerpos irrelevantes. Pertuzumab, así como trastuzumab inducían fuertemente la inhibición del dímero.

EJEMPLO 5: MAPEADO EPITÓPICO DE ANTICUERPOS ANTI-HER3

Las membranas se obtuvieron de Abimed (Langenfeld, Alemania). Los aminoácidos Fmoc y N-hidroxibenzotriazol se obtuvieron de Novabiochem (Läufelfingen, Suiza). El robot ASP222 (Abimed) se utilizó para las etapas de acoplamiento. Se sintetizaron en membranas de celulosa doscientos trece fotogramas de dodecapéptidos solapantes por residuo, que representa el dominio extracelular del receptor HER3. Todos los péptidos se acetilaron en su extremo N. Después de ensamblar las secuencias peptídicas, los grupos protectores de la cadena lateral se eliminaron mediante tratamiento con ácido trifluoroacético. Después de tres lavados en tampón TBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Tris 50 mM), la membrana se saturó con tampón TBS que contenía Tween 20 al 0,1% (TBS-T) y leche semidesnatada al 2% durante 18 h a 4°C. Después de un lavado en TBS-T, se añadió a la membrana una disolución de 1 μ g/ml de los mAbs anti-HER3 16D3-C1 y 9F7-F11 durante 1h30 a 37°C. El anticuerpo unido se detectó por incubación de la membrana a 37°C durante 1 h en una dilución 1:2000 de una IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa (Sigma, St Louis, MO) y posterior revelado electroquimioluminiscente. El mAb 16D3-C1 reconocía la región 111-129 (Fig.13A), mientras que el mAb 9F7-F11 se unía a la región 35-53 (Fig.14A); situándose estas dos regiones en el dominio D1 del receptor HER3.

Para identificar con precisión los epítomos reconocidos por estos anticuerpos, se realizó análisis de escaneo de alanina Spot. Doce pentadecapéptidos que corresponden a secuencias de aminoácidos inmunorreactivos de anticuerpo previamente identificados en las Figuras 13A y 13B, y los quince análogos de alanina de cada uno de los péptidos se sintetizaron mediante el método Spot. La reactividad de los anticuerpos de péptidos unidos a celulosa se ensayó de forma similar a la arriba descrita. La reactividad de las manchas se evaluó escaneando la membrana y midiendo las intensidades de los puntos con el software Image J 1.44 (<http://rsbweb.nih.gov/ij>). Se identificaron restos contribuyentes de manchas (SCR), pertenecientes a los epítomos HER3 reconocidos por los mAbs 16D3-C1 y 9F7-F11, en base a una capacidad de unión a anticuerpos disminuida igual o superior al 20% de la secuencia peptídica no modificada. El estudio de los cinco pentadecapéptidos ¹¹¹ALRQLRLTQLTEILS¹²⁵ (SEQ ID NO: 1), ¹¹²LRQLRLTQLTEILSG¹²⁶ (SEQ ID NO: 2), ¹¹³RQLRLTQLTEILSGG¹²⁷ (SEQ ID NO: 3), ¹¹⁴QLRLTQLTEILSGGV¹²⁸ (SEQ ID NO: 4) y ¹¹⁵LRLTQLTEILSGGVY¹²⁹ (SEQ ID NO: 5) del dominio HER3/D1 (Fig.13B) identificó ¹¹²L-LT-LTEILS¹²² (SEQ ID NO: 6) como el motivo de unión para el mAb 16D3-C1, siendo Leu¹²⁰, Glu¹²², Ile¹²³ y Leu¹²⁴ los SCR principales (Fig. 13C). El anticuerpo anti-HER3 9F7-F11 reconoció el motivo ⁴⁴LEIVL⁴⁸ (SEQ ID NO: 7) en el dominio HER3/D1 (Fig.14B), en que los residuos Leu⁴⁴, Ile⁴⁶ y Leu⁴⁸ se identificaron como SCR (Fig. 14C).

Los autores de la invención realizaron la colocación de SCR de los motivos de unión de los anticuerpos 16D3-C1 y 9F7-F11 sobre la estructura cristalográfica del receptor HER3 sin ligando (pdb 1M6B) (Fig.15, izquierda). El epítomo 9F7-F11 ⁴⁴LEIVL⁴⁸ se superponía en una de las cadenas β prominentes al inicio del dominio 1, enfrentándose al dominio 3 a una distancia de 60 Å y sobresaliendo del dominio D2. El motivo de unión 16D3-C1 se encontraba más profundamente dentro de la estructura de la cadena β del dominio D1. En la actualidad, no se ha descrito ninguna estructura cristalina del receptor HER3 unida a un ligando. Por homología de secuencia, los epítomos reconocidos por los anticuerpos 16D3-C1 y 9F7-F11 específicos para HER3 se superpusieron a la estructura cristalográfica del receptor HER2 unido a pertuzumab (pdb 1S78) (Fig. 15, derecha).

EJEMPLO 6: ESTUDIOS DE TUMOR DE XENOINJERTO

Se adquirieron ratones inmunodeficientes BALB/c hembra atímicos de 6 a 8 semanas de edad de los laboratorios Janvier y Charles Rivers. *HER2*-no amplificado/*PIK3CA*-wt/*p53*-mut epidermoide A431 (1×10^6), *HER2*-no amplificado/*PIK3CA*-wt/*p53* BxPC3 pancreático (3.5×10^6) y *HER2*-no amplificado/*PIK3CA*-wt/*p53*- pulmón A549 (5×10^6) se inyectaron por vía s.c. en el flanco derecho de ratones inmunodeficientes BALB/c atímicos. Ambos expresaron el receptor HER3 a bajo nivel (entre 10000 y 20000 receptores/célula). Además, células cancerosas A431 y A549 secretaban el ligando HRG de HER3 y son adictas a HRG (Yonesaka, 2011, Zhou 2006).

Todos los experimentos *in vivo* se realizaron de acuerdo con las directrices francesas para estudios experimentales con animales (Acuerdo nº B34-172-27).

Ratones portadores de tumores se asignaron al azar a los diferentes grupos de tratamiento cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm^3 . Los ratones fueron tratados mediante inyección i.p. de anticuerpos 16D3-C1 o 9F7-F11 específicos para HER3 frente a vehículo (PBS). La cantidad de anticuerpo inyectado era de $300 \mu\text{g/inyección}$, tres veces por semana (Q2d, 15 mg/kg), durante 6 semanas consecutivas. Las dimensiones del tumor se midieron dos veces por semana con un calibre y los volúmenes se calcularon mediante la fórmula $D1 \times D2 \times D3 / 2$. La progresión del tumor se calculó utilizando la fórmula $[(\text{volumen final}) - (\text{volumen inicial})] / (\text{volumen inicial})$. Los resultados también se expresaron por una curva de supervivencia de Kaplan-Meier, utilizando el tiempo necesario para que el tumor alcanzara un volumen final determinado de 2.000 mm^3 . Se definió una demora mediana como el tiempo al que el 50% de los ratones tenía un tumor que alcanzaba el volumen determinado.

Células cancerosas A431 secretaban ligando HRG de HER3 (Yonesaka, 2011) y expresaban 17000 receptores HER3 por célula. El día 31 post-implante (correspondiente a 20 días después del inicio del tratamiento), los mAbs anti-HER3 inhibieron significativamente el crecimiento del tumor en aproximadamente $53 \pm 6\%$ en ratones xenoinjertados con células cancerosas A431, en comparación con el control de vehículo (Fig. 16A; $p < 0,001$). Los mAbs 16D3-C1 y 9F7-F11 retrasaron un tiempo medio de supervivencia del 50% durante 21 días, curándose uno de cada ocho ratones tratados en cada uno de los grupos al final del experimento (120 días) (Fig. 16B).

Tal como se muestra en la Fig. 17A, se observó una reducción significativa de $68 \pm 4\%$ en el crecimiento del tumor pancreático BxPC3 en ratones tratados con anticuerpos el día 56 post-implantación del tumor (correspondiente a 26 días después del inicio del tratamiento con anticuerpos), con respecto al tamaño del tumor medido en ratones tratados con vehículo ($p < 0,001$). Al final del experimento (135 días), el análisis de Kaplan-Meier reveló un retraso de 18 días en el tiempo medio de supervivencia del 50% para ratones pancreáticos BxPC3-xenoinjertados, tratados con muAb 9F7-F11 anti-HER3 (Fig. 17B). Además, el mAb 16D3-C1 específico para HER3 indujo un retraso de 24 días más prolongado en el tiempo de supervivencia de ratones xenoinjertados con células de tumor pancreático amplificadas con *HER2*-no amplificado/*PIK3CA*-wt BxPC3, siendo uno de ocho ratones completamente curado. En este caso (Fig. 18), los tumores extraídos de ratones tratados con 16D3-C1 demostraron una inhibición de la fosforilación de Y1289 HER3 y una regulación negativa del receptor HER3 con respecto a los tumores extraídos de ratones tratados con vehículo. Tomados en conjunto, estos resultados demostraron que los mAbs 16D3-C1 y 9F7-F11 podrían ser eficientes en tumores independientemente de la adicción a HRG o del estado de mutación de *p53*.

Los autores de la invención han demostrado previamente que la combinación del anticuerpo terapéutico trastuzumab con otras terapias dirigidas demostraron un efecto sinérgico sobre carcinomas con baja expresión de HER2 (Larbouret, 2007, 2010). Para verificar los efectos *in vivo* de los anticuerpos específicos para HER3 como agentes duales con trastuzumab (Tz) anti-HER2 en carcinomas con baja expresión de HER2, xenoinjertaron ratones con células A431 epidermoide $HER2^{\text{bajo}}$ y A549 de cáncer de pulmón, que secretaban HRG (Yonesaka, 2011, Zhou, 2006), y no mostraron efecto (Farhan, 2006) a un efecto moderado (Nakamura, 2005) a la terapia con trastuzumab, respectivamente. Para discriminar un efecto sinérgico potencial, se administró una dosis sub-eficiente de muAb 16D3-C1 anti-HER3 combinado con trastuzumab a sólo 10 mg/kg cada 3 días durante 4 semanas (Q3d-4S). Como se muestra en la Fig. 19A, una regresión del 60% en el crecimiento tumoral A431 se observó significativamente en ratones tratados con combinación doble de 16D3-C1 y Tz ($p < 0,001$) el día 35 post-implantación del tumor, con respecto a una reducción del 25% en el tamaño del tumor de ratones tratados con 16D3-C1 y no se observó efecto alguno en ratones xenoinjertados tratados con trastuzumab solo o vehículo. De forma similar, se midió una reducción significativa del 75% en el crecimiento del tumor en ratones xenoinjertados con A549 tratados con combinación doble 16D3-C1 + Tz ($p < 0,001$) en comparación con los observados en ratones tratados con anticuerpos solo (50%). En conjunto, estos resultados demostraron que la combinación doble de anticuerpo específico para HER3 y anticuerpo anti-HER2 podría ser eficiente en carcinomas de $HER2^{\text{bajo}}$ no elegibles para la terapia con trastuzumab.

REFERENCIAS:

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM

<120> ANTICUERPOS ANTI-HER3 HUMANOS Y SUS USOS

<130> PELEGRIN11044 / MC

5 <160> 14

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 1

15 Ala Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser
1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> péptido

<400> 2

Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser Gly
1 5 10 15

<210> 3

25 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

30 <400> 3

ES 2 643 694 T3

Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser Gly Gly
1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 4

Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser Gly Gly

10 1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> péptido

<400> 5

Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser Gly Gly Val
1 5 10 15

<210> 6

20 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

25 <400> 6

Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser Gly Gly Val Tyr
1 5 10 15

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

ES 2 643 694 T3

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 7

5 Leu Glu Ile Val Leu
 1 5

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> péptido

<400> 8

 Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu Ile Val Leu
 1 5 10 15

<210> 9

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

20 <400> 9

 Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu Ile Val Leu Thr
 1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 10

ES 2 643 694 T3

Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu Ile Val Leu Thr Gly
1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 11

Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu Ile Val Leu Thr Gly His
1 5 10 15

10 <210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> péptido

<400> 12

Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu Ile Val Leu Thr Gly His Asn
1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido

<400> 13

25 Val Val Met Gly Asn Leu Glu Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala
1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 643 694 T3

<220>

<223> péptido

<400> 14

Val	Met	Gly	Asn	Leu	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gly	His	Asn	Ala	Asp
1			5					10						15

5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que específicamente se une a la región de aminoácidos ALRQLRLTQLTEILSGGVY del dominio extracelular de HER-3 humano y compite por la unión al dominio extracelular de HER-3 humano con el anticuerpo obtenible de hibridoma depositado como CNCM-I-4486.
- 5 2. El anticuerpo monoclonal aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano.
3. El anticuerpo monoclonal aislado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que es el anticuerpo monoclonal murino 16D3-C1, obtenible del hibridoma disponible bajo el número de depósito I-4486 de CNCM.
- 10 4. Un fragmento de anticuerpo del anticuerpo monoclonal aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, seleccionado del grupo que consiste en Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos.
5. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 15 6. El anticuerpo monoclonal aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento del cáncer.

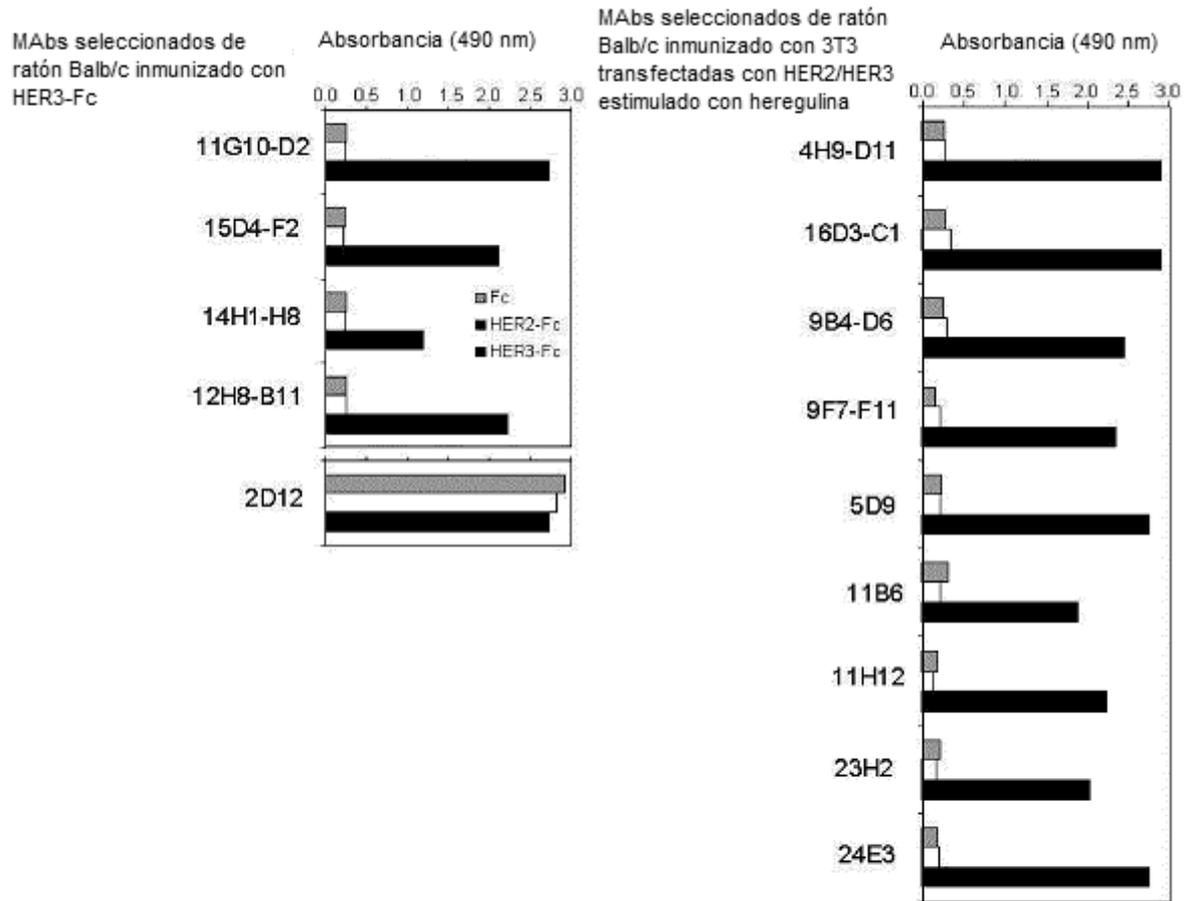


Figura 1A

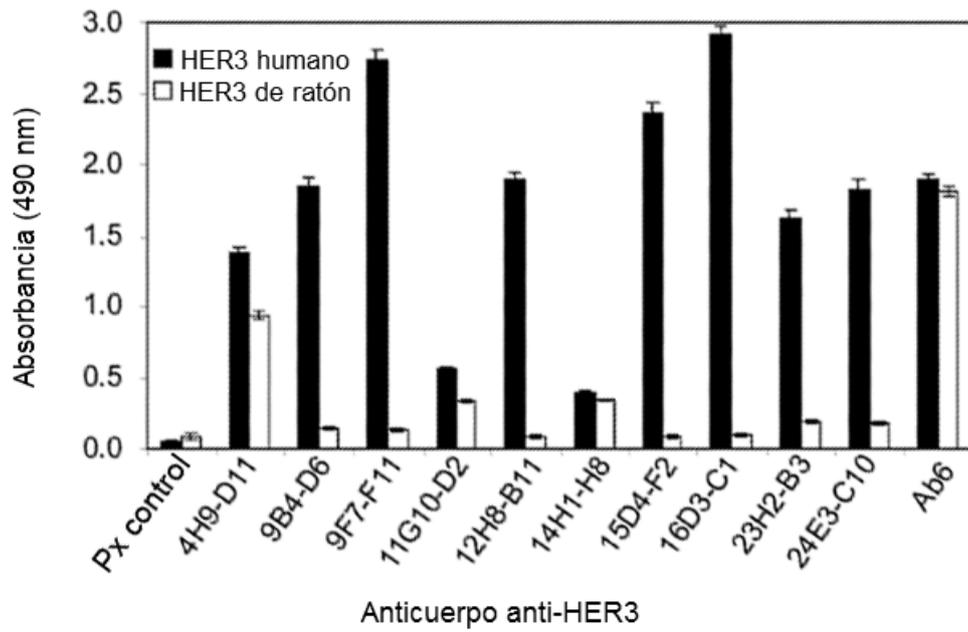


Figura 1B

A490 nm

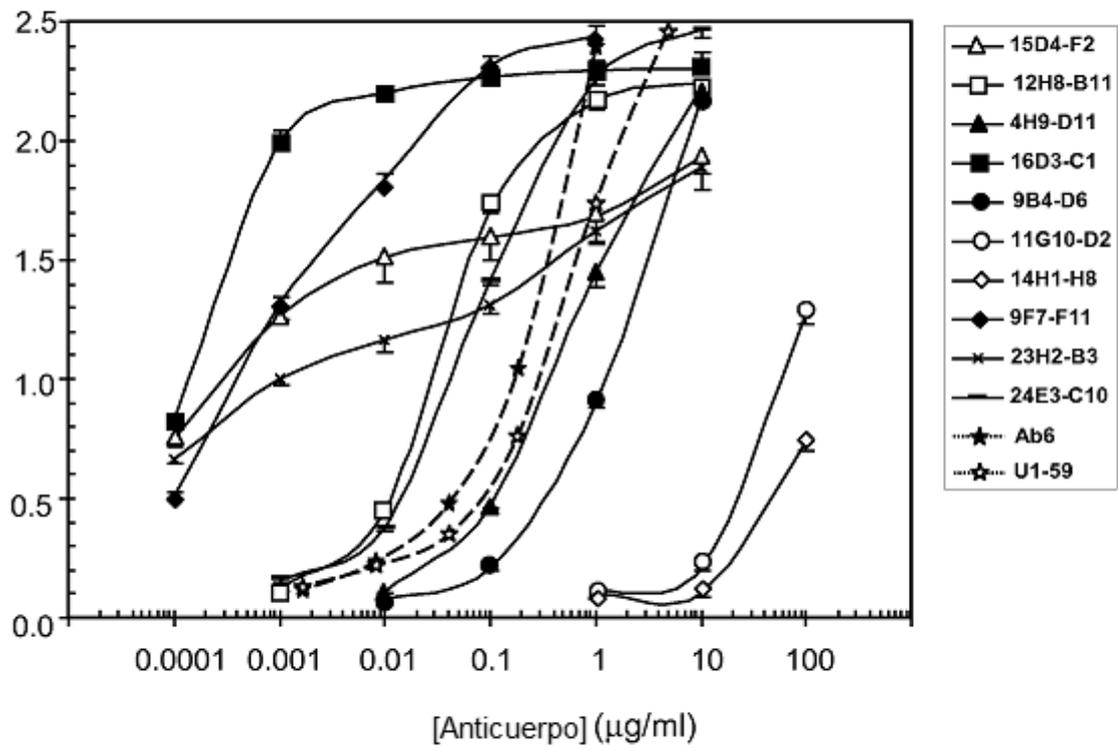


Figura 2A

Hibridoma	Formación de ascitis	Título de Ab de ascitis*	Ab purificado (mg/ml)	Título de Ab tras purificación*
15D4-F2	+++	10 M	0.20	300 pg/ml
12H8-B11	+++	1 M	3.50	30 ng/ml
14H1-H8	+	1000	0.18	250 µg/ml
11G10-D2	(+)	3 M	0.57	50 µg/ml
4H9-D11	+++	100	0.10	350 ng/ml
16D3-C1	++	3 M	1.20	150 pg/ml
9B4-D6	(+)	10000	0.05	1 µg/ml
9F7-F11	++	5 M	3.50	400 pg/ml
23H2-B3	+++	1 M	9.40	1 ng/ml
24E3-C10	+++	10000	0.16	40 ng/ml

* Dilución de anticuerpos o concentración de Ab que muestra una absorbancia de 1 por ELISA hacia una disolución de revestimiento de 250 ng/ml de receptor HER3

Figura 2B

Anticuerpo	células 3T3 salvajes	células 3T3 transfectadas				
		EGFR	HER2	HER3	HER2/HER3	EGFR/HER3
2º Ab anti-ratón	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0
Px control	0.5	0.3	0.6	0.4	0.5	0
4H9-D11	0.3	0.3	0.3	0.7	1.3	r
9B4-D6	0.2	0.2	0.3	6.6	18.3	r
9F7-F11	0.3	0.4	0.4	1.8	12.4	0
11G10-D2	0.3	0.2	0.3	1.4	10.1	r
12H8-B11	0.3	0.4	0.5	3.7	28.8	0
14H1-H8	0.4	0.4	0.5	0.9	1.1	r
15D4-F2	0.4	0.3	0.4	4.2	25.6	r
16D3-C1	0.4	0.4	0.7	4.5	26.8	0
U1-59	0.4	0.2	0.4	9.3	15.5	0
Ab6	0.4	0.2	0.3	7.8	14.1	0

* Media geométrica

Figura 3

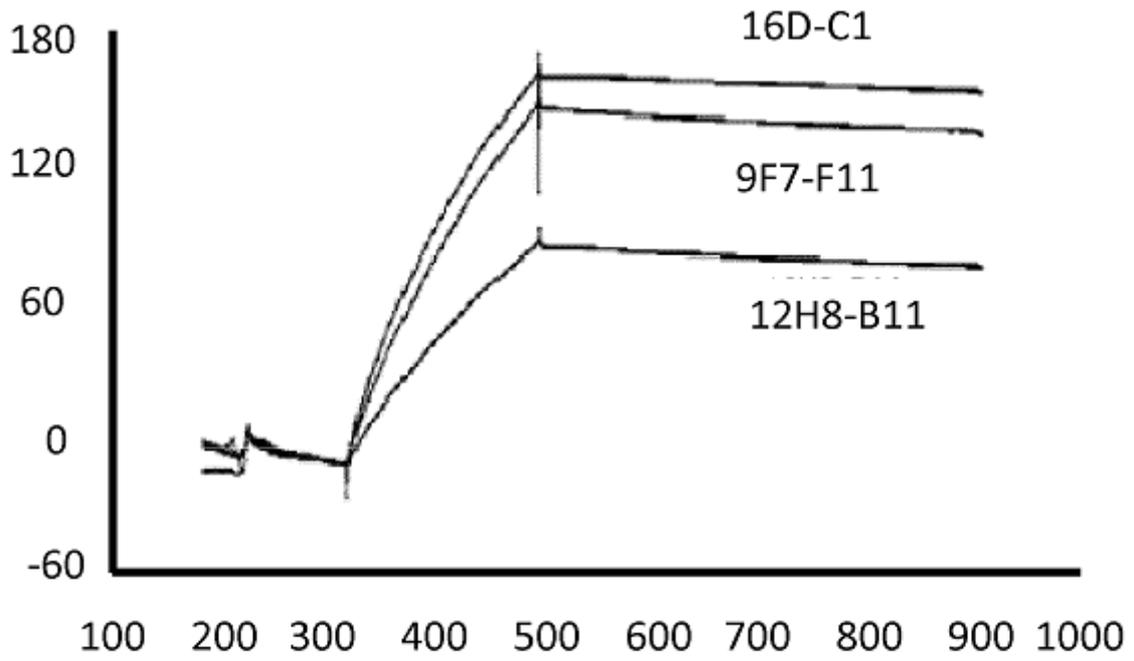


Figura 4

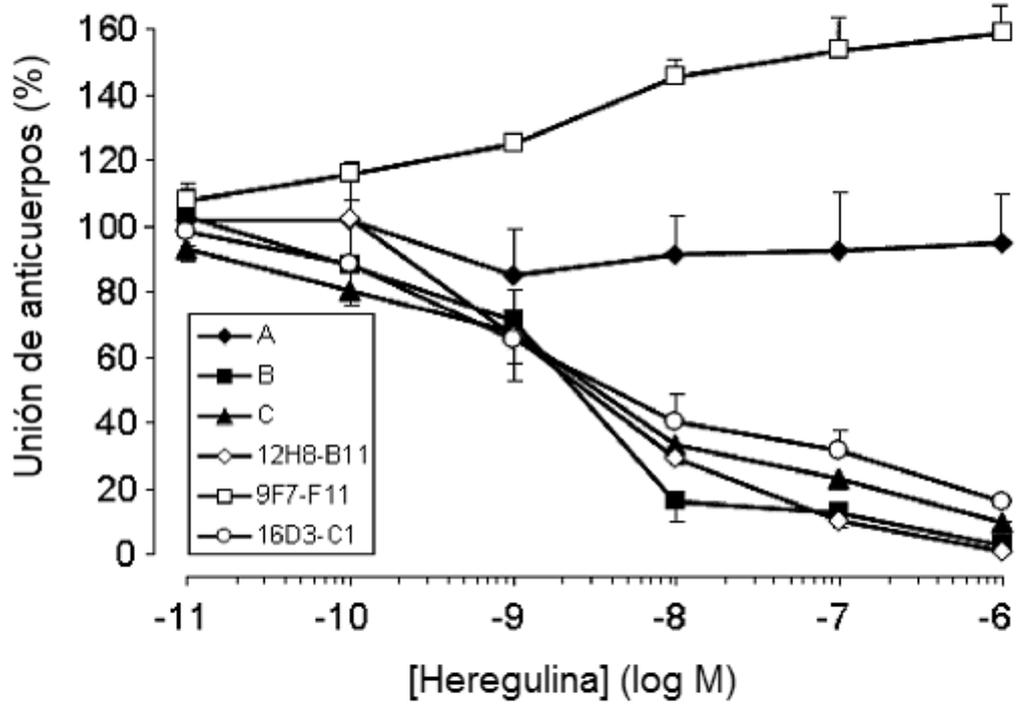


Figura 5

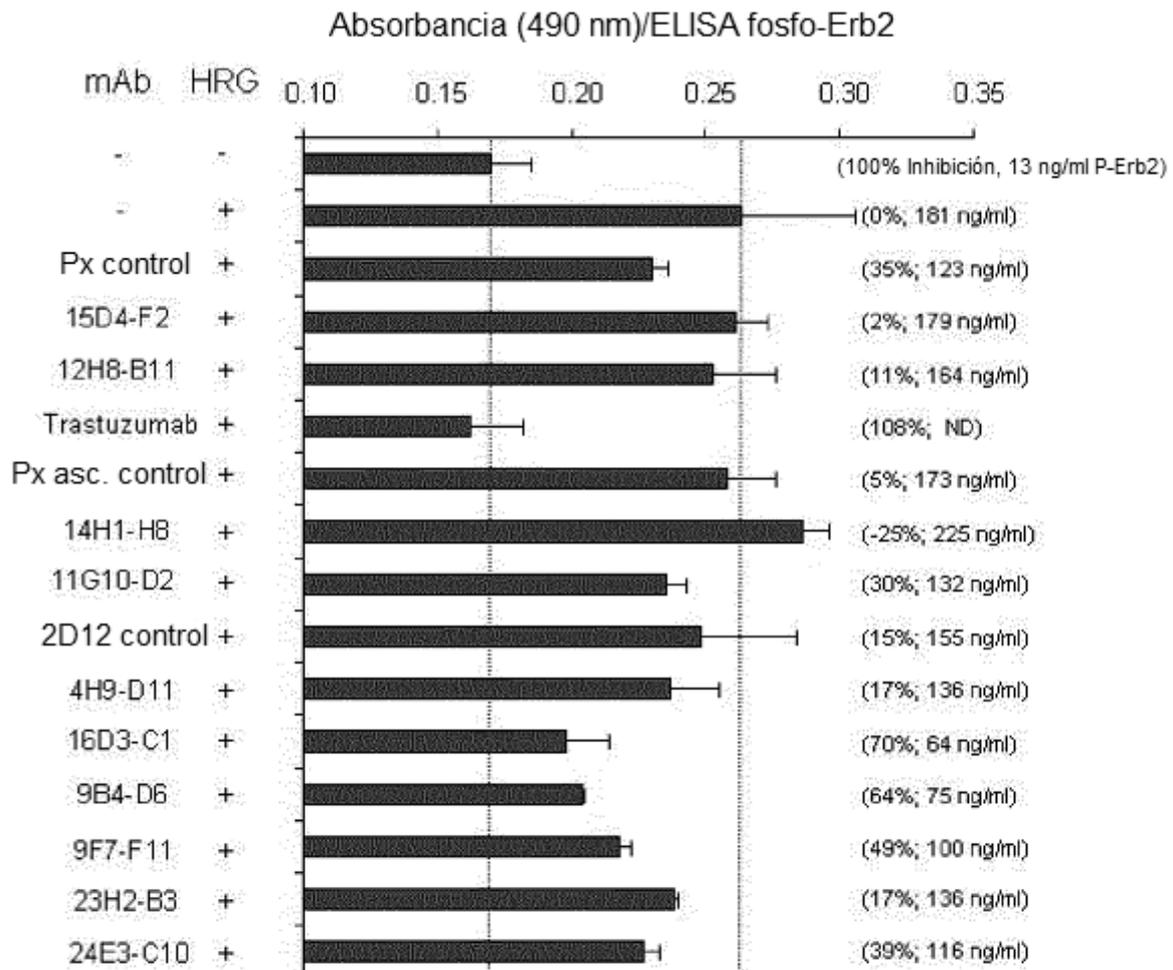


Figura 6

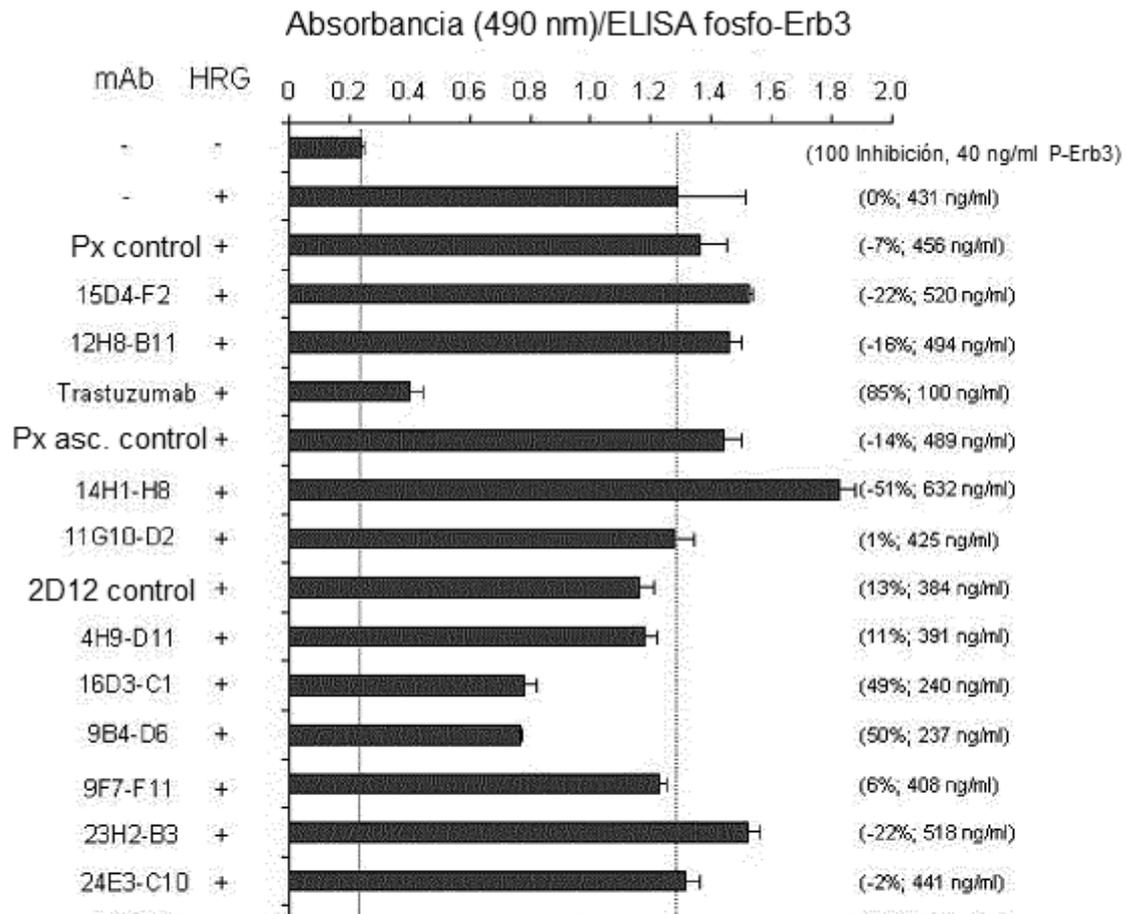


Figura 7

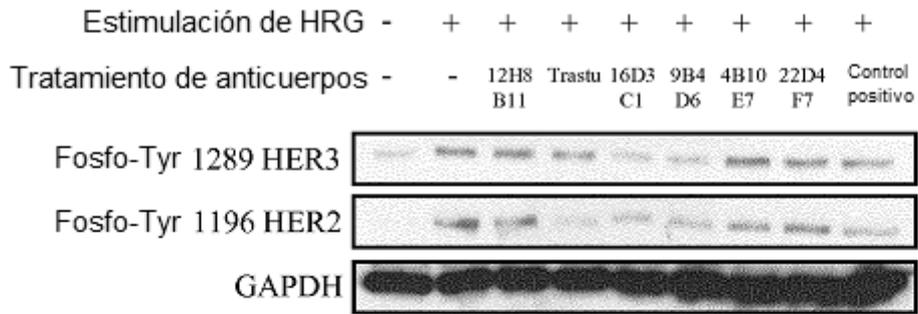


Figura 8A

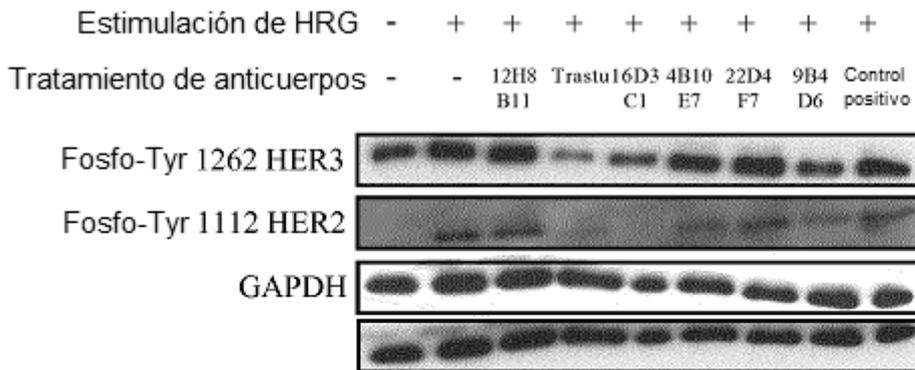


Figura 8B

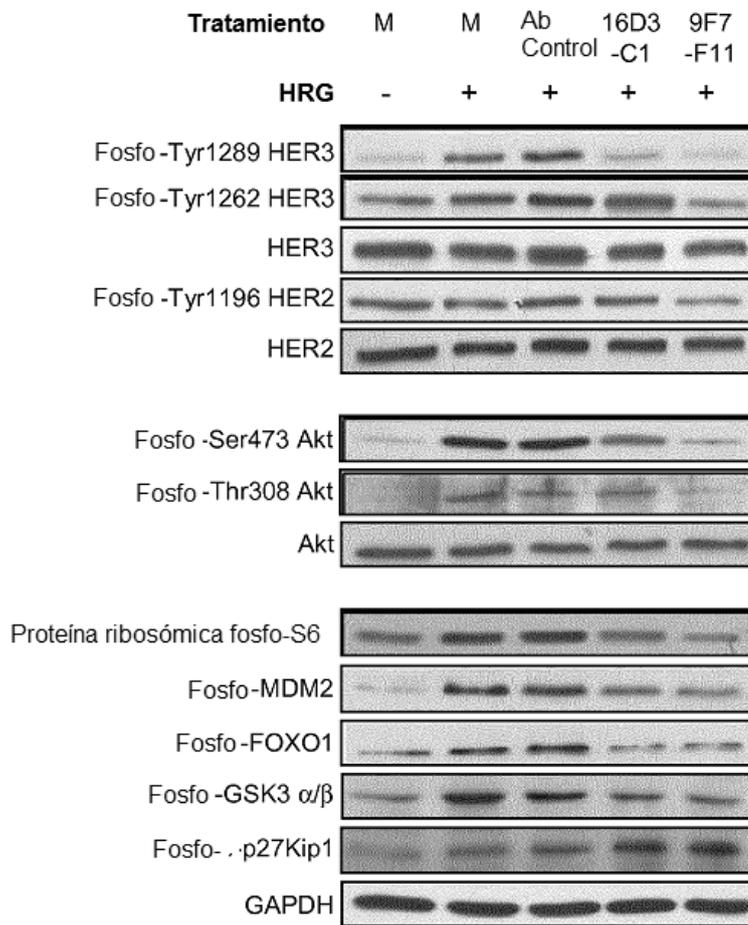


Figura 9

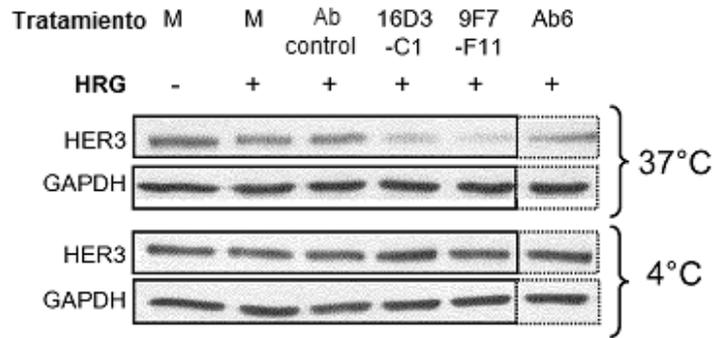


Figura 10A

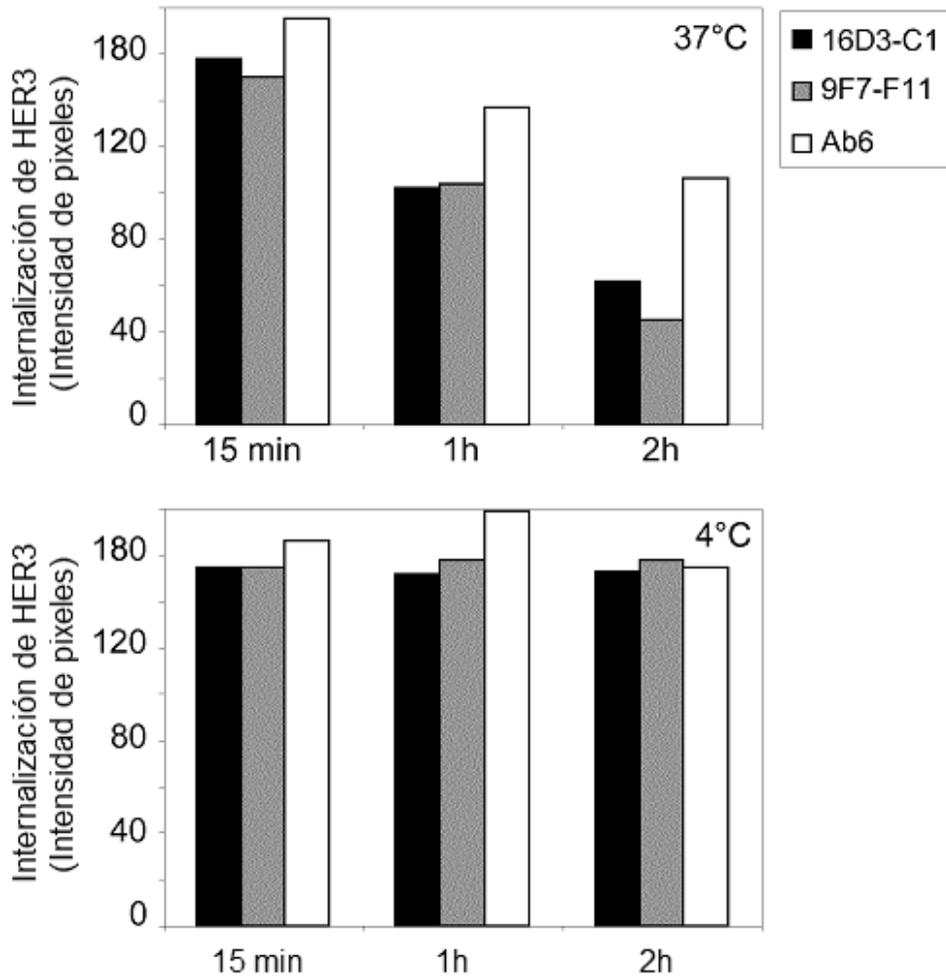


Figura 10B

Línea celular	Px control Trastuzumab Anticuerpo anti-HER3				
		16D3-C1	12H8-B11	9F7-F11	
Fibroblastos H2P3 transfectados con HER2/HER3	4.3 ± 0.8 ^a	17.8 ± 1.6	23.7 ± 5.9	1.8 ± 5.5	32.0 ± 9.0
Cáncer pancreático					
HER3 ⁺ HPAC	< 0.0	< 0.0	< 0.0	nd ^b	7.0
HER3 ⁺ CFPAC	< 0.0	< 0.0	2.3	nd	4.5
HER3 ⁺ BxPC3	< 0.0	0.9	< 0.0	nd	5.8
HER3 ⁺ Capan	< 0.0	< 0.0	< 0.0	nd	0.7
Cáncer de mama					
HER3 ⁺ MCF7	0.0	16.2	22.6	nd	32.7
HER3 ⁺ MDA-MB361	< 0.0	21.3	9.0	nd	16.3
HER3 ⁺ T47D	< 0.0	14.8	< 0.0	nd	14.4
HER3 ⁺ MDA-MB-231	< 0.0	0.0	0.0	2.5	nd
HER3 ⁺ carcinoma epidermoide A431	< 0.0	3.4	7.7	nd	16.1
Cáncer de ovario					
HER3 ⁺ COV434-AMHR-II (granulosa)	< 0.0	3.2	6.3	< 0.0	9.6
HER3 ⁺ ascitis 1 clon A5 (epitelial)	2.4	0.4	19.0	26.0	8.9
HER3 ⁺ ascitis 2 clon C9 (epitelial)	0.3	< 0.0	15.3	5.2	12.6
Meta 2815 (epitelial)	0.2	< 0.0	15.3	2.1	6.1
HER3 ⁺ OVCAR3 (epitelial)	2.2	7.4	6.5	6.0	7.0
HER3 ^{low} SKOV3 (epitelial)	0.3	5.4	4.6	1.1	6.6
HER3 ⁺ carcinoma de pulmón A549 (NSCLC)	5.6	4.5	2.7	2.6	9.8

^a Inhibición del crecimiento (%)
^b nd: no hecho

Figura 11

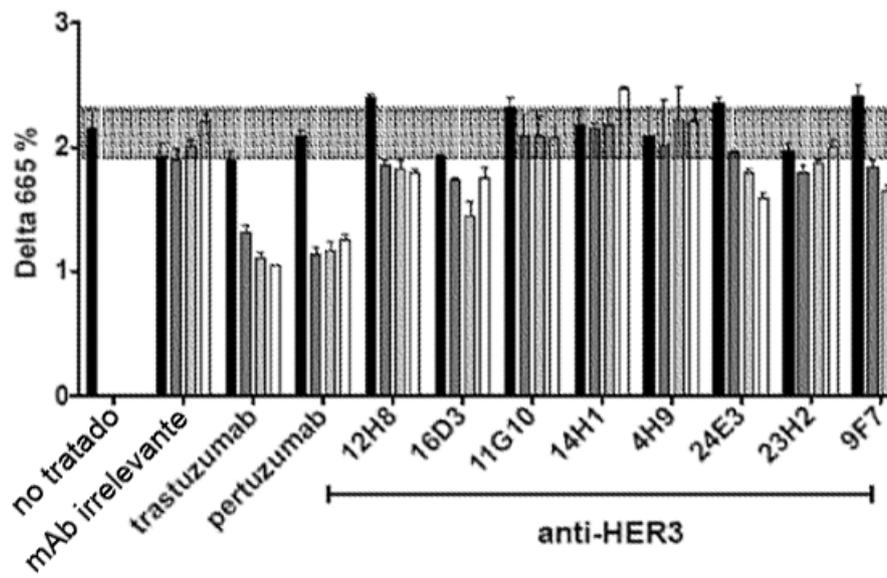


Figura 12

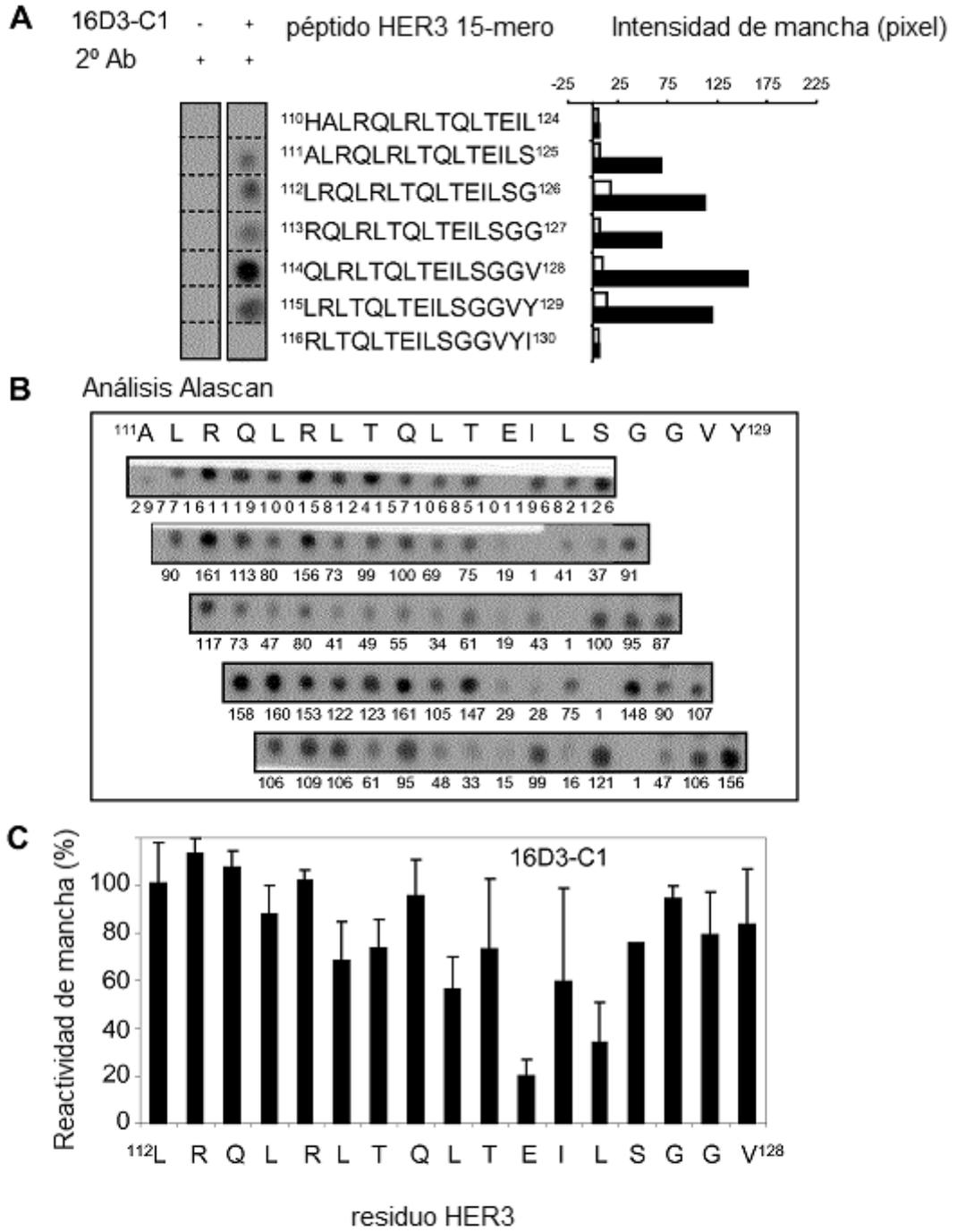
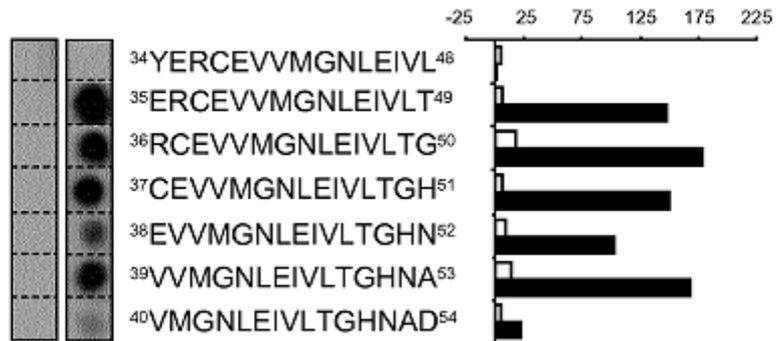
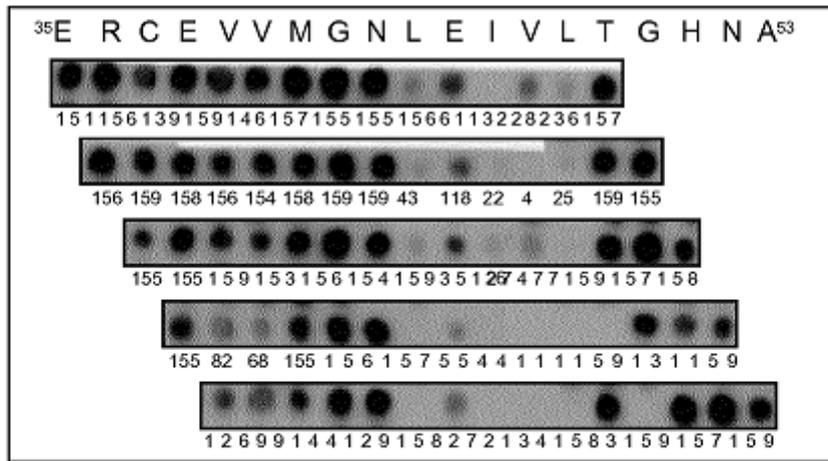


Figura 13

A 9F7-F11 - + péptido HER3 15-mero Intensidad de mancha (pixel)
 2º Ab + +



B Análisis Alascan



C

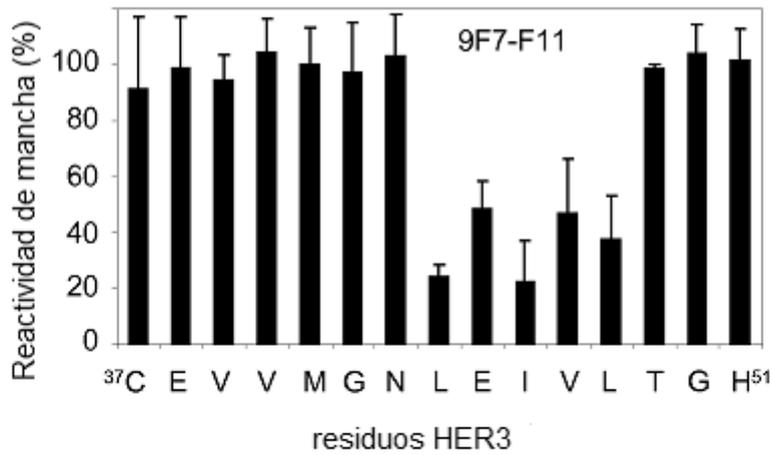


Figura 14

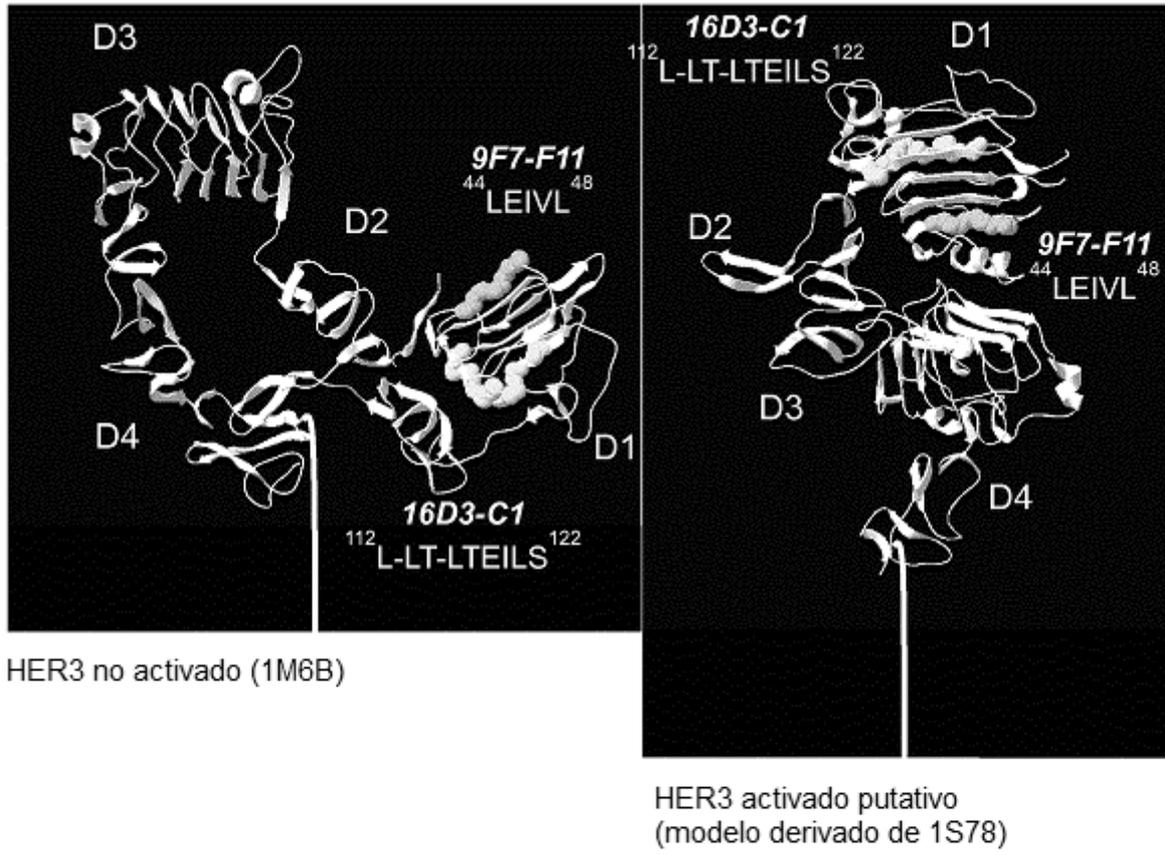


Figura 15

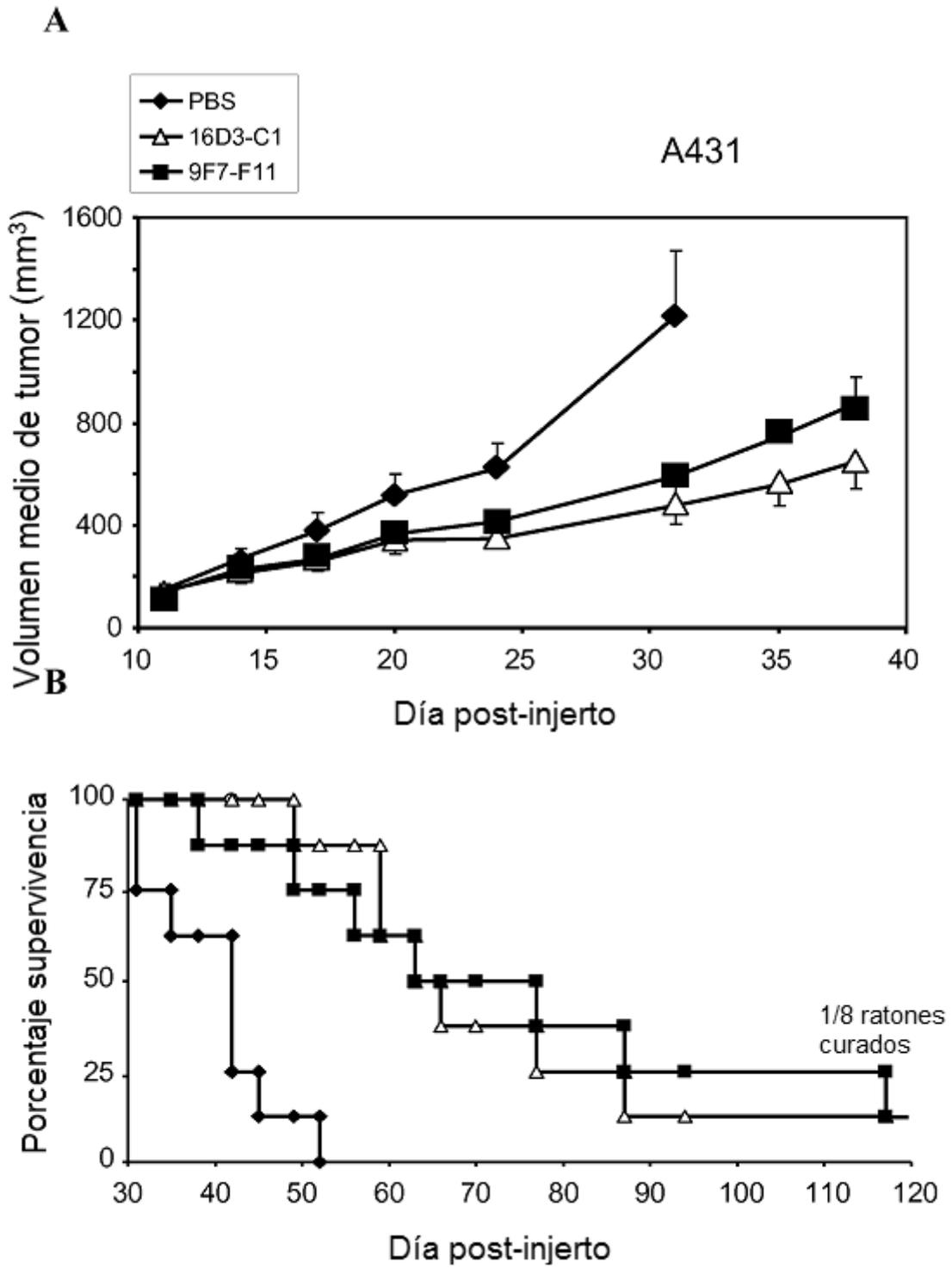
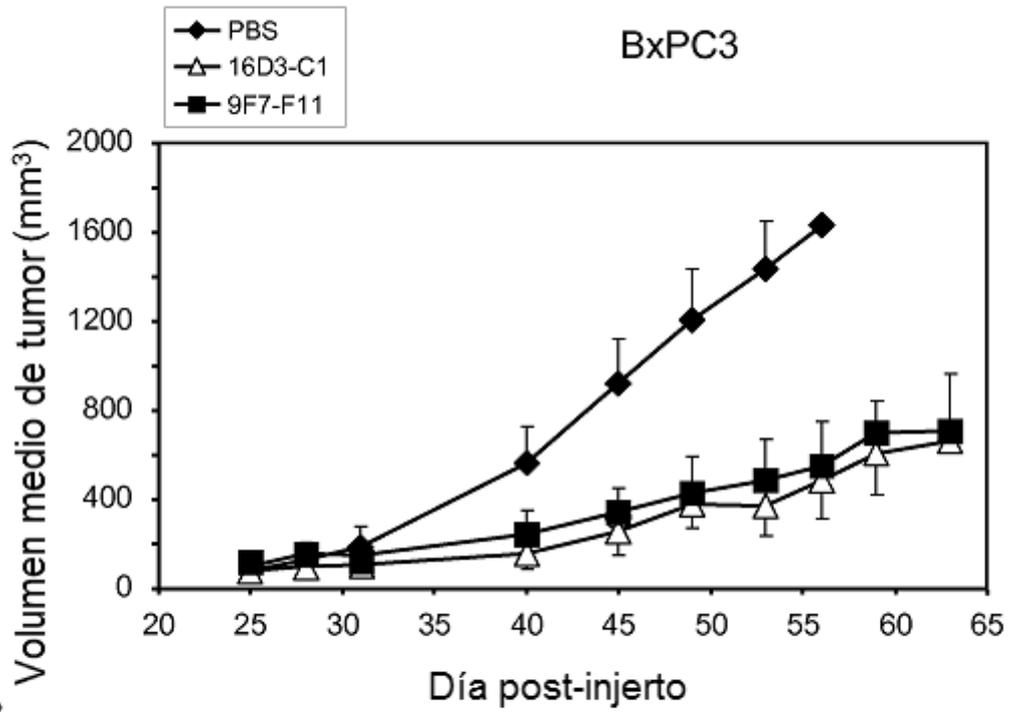


Figura 16

A



B

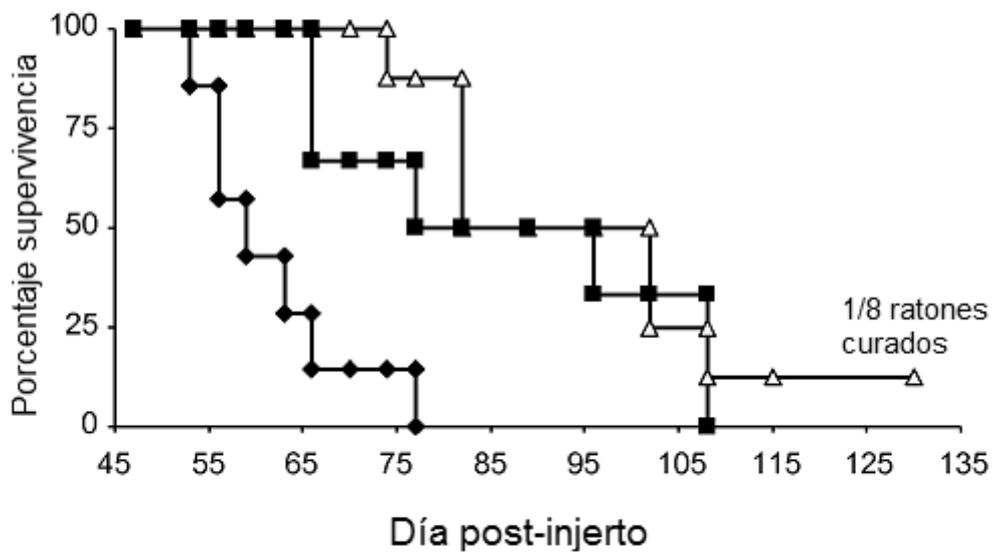


Figura 17

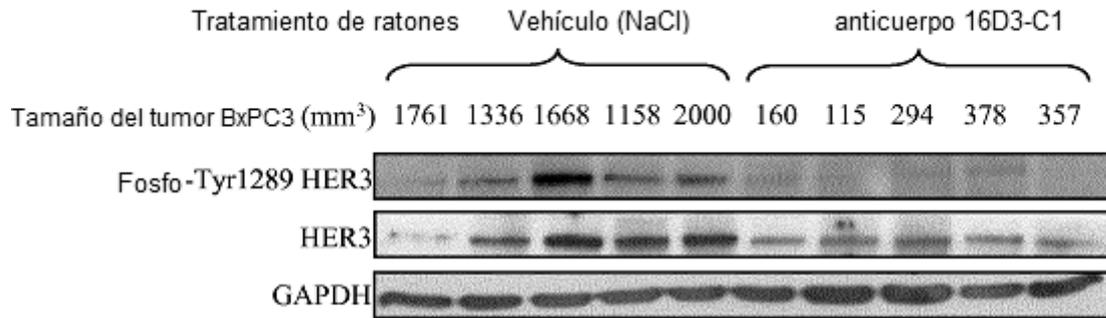


Figura 18

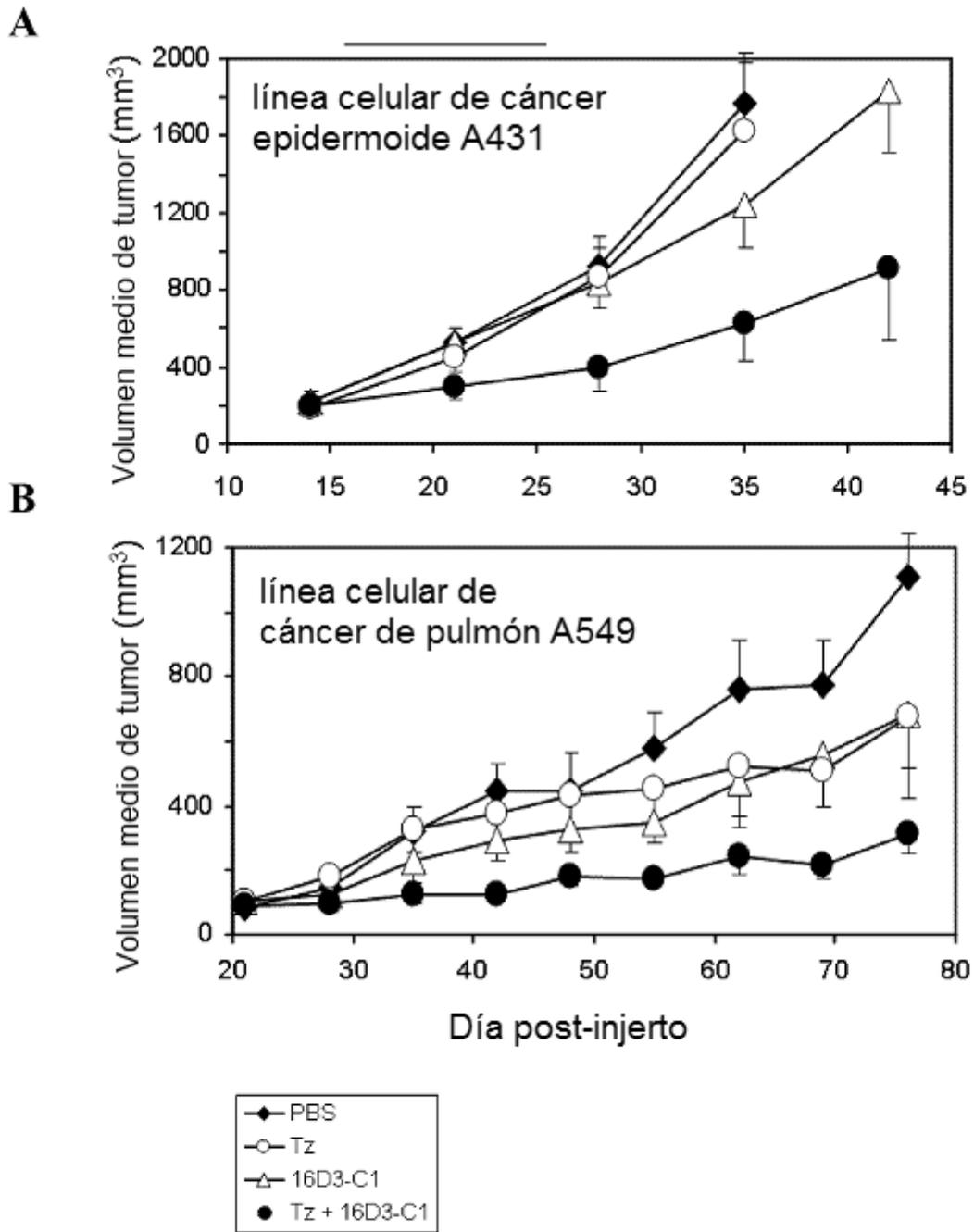


Figura 19