



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(11) Número de Publicação: **PT 896586 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/32 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01) **C07K 17/00** (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01) **C12N 15/64** (2006.01)

(22) Data de pedido: **1997.03.07**

(30) Prioridade(s): **1996.03.27 US 0624036**

(43) Data de publicação do pedido: **1999.02.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.10.17**
001/2007

(73) Titular(es):

GENENTECH, INC.

1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA
94080-4990

US

(72) Inventor(es):

MARK SLIWKOWSKI
ROBERT AKITA

US

US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS DE ERBB3**

(57) Resumo:

RESUMO

"Anticorpos de ErbB3"

Descrevem-se anticorpos que se ligam à proteína ErbB3 e possuem também qualquer uma ou mais das seguintes propriedades: uma capacidade para reduzir a formação de um complexo de proteína ErbB2-ErbB3 induzida por heregulina numa célula que expressa ErbB2 e ErbB3; a capacidade de aumentar a afinidade de ligação de heregulina relativamente à proteína ErbB3 e a característica de reduzir a activação de ErbB2 induzida por heregulina numa célula que expressa ErbB2 e ErbB3.

DESCRIÇÃO

"Anticorpos de ErbB3"

Campo da invenção

A presente invenção refere-se em geral a anticorpos que se ligam ao receptor ErbB3. Em particular, refere-se a anticorpos anti-ErbB3 que, surpreendentemente, reduzem a formação de um complexo de proteína ErbB2-ErbB3 induzida por HRG numa célula que expressa ambos estes receptores e reduz a activação de ErbB2 induzida por heregulina numa célula deste tipo e pode também aumentar a afinidade de ligação da heregulina (HRG) relativamente à proteína ErbB3.

Descrição da arte relacionada

A transdução de sinais que regulam o crescimento e diferenciação celular é regulada em parte por fosforilação de várias proteínas celulares. As proteínas tirosina-quinases são enzimas que catalisam este processo. Pensa-se que as proteínas tirosina-quinases receptoras dirigem o crescimento celular através da fosforilação de tirosina estimulada pelo ligando de substratos intracelulares. As proteínas tirosina-quinases receptoras do factor de crescimento da subfamília de classe 1 incluem o receptor do factor de crescimento epidérmico de 170 kDa (EGFR) codificado pelo gene *erbB1*, o *erbB1* foi implicado causalmente na malignidade humana. Em particular, observou-se uma expressão aumentada deste gene em carcinomas mais agressivos da mama, bexiga, pulmão e estômago.

O segundo membro da subfamília de classe 1, p185^{neu} foi originalmente identificado como o produto do gene transformante de neuroblastomas de ratos tratados quimicamente. O gene *neu* (também designado por *erbB2* e HER2) codifica para uma proteína-tirosina-quinase receptora de 185 kDa. A amplificação e/ou sobre-expressão do gene HER2 humano está correlacionada com um mau prognóstico em cancros da mama e ovários (Slamon *et al.*, *Science*, 235:177-182 (1987); e Slamon *et al.*, *Science*, 244:707-712 (1989)). A sobre-expressão de HER2 também foi correlacionada com outros

carcinomas, incluindo carcinomas do estômago, endométrio, glândula salivar, pulmão, rim, cólon e bexiga.

Outro gene relacionado, designado por *erbB3* ou HER3, também foi descrito. Vejam-se as patentes US N^{os} 5183884 e 5480968; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4905-4909 (1990); Kraus *et al.*, *Proc Natl. Acad Sci. USA*, 86:9193-9197 (1989); pedido de patente EP N^o 444961A1; e Kraus *et al.*, *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 90:2900-2904 (1993). Kraus *et al.* (1989) verificaram que estavam presentes níveis acentuadamente elevados de ARNm de *erbB3* nalgumas linhas celulares de tumor mamário humano, o que indica que o *erbB3*, tal como o *erbB1* e *erbB2*, pode desempenhar um papel nalgumas malignidades humanas. Estes investigadores demonstraram que algumas linhas celulares de tumor mamário humano apresentam um aumento significativo da fosforilação de tirosina de ErbB3 de estado estacionário, o que indica também que este receptor pode desempenhar um papel nas malignidades humanas. Deste modo, estão descritos bioensaios de diagnóstico utilizando anticorpos que se ligam a ErbB3 em Kraus *et al.* nas Patentes US N^{os} 5183884 e 5480968.

O papel de *erbB3* no cancro foi explorado por outros. Verificou-se que é sobre-expresso nos cancros da mama (Lemoine *et al.*, *Br. J. Cancer*, 66:1116-1121 (1992)), gastrointestinal (Poller *et al.*, *J Pathol.*, 168:275-280 (1992), Rajkumer *et al.*, *J. Pathol.*, 170:271-278 (1993), e Sanidas *et al.*, *Int. J. Cancer*. 54:935-940 (1993)), e pancreático (Lemoine *et al.*, *J. Pathol.*, 168:269-273 (1992), e Friess *et al.* *Clinical Cancer Research*. 1:1413-1420 (1995)).

O ErbB3 é único entre a família de receptores ErbB, na medida em que possui pouca ou nenhuma actividade de tirosina-quinase intrínseca (Guy *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91:8132-8136 (1994) e Kim *et al* *J. Biol Chem*. 269:24747-55 (1994)). Quando o ErbB3 é co-expresso com ErbB2, forma-se um complexo de sinalização activo e os anticorpos dirigidos contra ErbB2 são capazes de romper este complexo (Sliwkowski *et al.* *J. Biol Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)). Adicionalmente, a afinidade de ErbB3 para heregulina (HRG) aumenta para um estado de afinidade maior quando co-expresso com ErbB2. Veja-se também Levi *et al.*, *Journal of Neuroscience*

15: 1329-1340 (1995): Mortissey *et al.*, *Proc. Natl Acad Sci USA* 92: 1431-1435 (1995): e Lewis *et al.*, *Cancer Res*, 56:1457-1465 (1996) em relação ao complexo de proteína ErbB2-ErbB3.

Rajkumar *et al.*, *British Journal Cancer*. 70(3):459-465 (1994), desenvolveram um anticorpo monoclonal contra ErbB3 que tinha um efeito agonista no crescimento independente da ancoragem de linhas celulares que expressam este receptor.

A subfamília de classe I das proteína-tirosina-quinases receptoras do factor de crescimento tem sido alargada para incluir o receptor HER4/p180^{erb}B4. Veja-se pedido de patente EP N° 599274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); e Plowman *et al.*, *Nature*, 366:473-475 (1993). Plowman *et al.* verificaram que uma maior expressão de HER4 tinha uma correlação estreita com alguns carcinomas de origem epitelial, incluindo adenocarcinomas da mama. Deste modo, os métodos de diagnóstico para a detecção de condições neoplásicas humanas (em especial cancros da mama) que avaliam a expressão de HER4 estão descritos no pedido de patente EP N° 599274.

A procura de um activador do oncogene HER2 levou à verificação de existência de uma família de polipéptidos de heregulina. Estas proteínas parecem resultar de *splicing* alternativo de um único gene que foi mapeado no braço curto do cromossoma 8 humano por Lee *et al.*, *Genomics*, 16:790-791 (1993); e Orr-Urtreger *et al.*, *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, Vol. 90 pp. 1867-1871 (1993).

Holmes *et al.* isolaram e clonaram uma família de activadores polipeptídicos para o receptor HER2 que designaram por heregulina- α (HRG- α), heregulina- β 1 (HRG- β), heregulina- β 2 (HRG- β 2), tipo heregulina- β 2 (tipo HRG- β 2), e heregulina- β 3 (HRG- β 3). Veja-se Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205-1210 (1992); e WO 92/20798. O polipéptido de 45 kDa, HRG- α , foi purificado a partir do meio condicionado da linha celular de cancro da mama humano MDA-MB-231. Estes investigadores demonstraram a capacidade dos polipéptidos de heregulina purificados activarem a fosforilação de tirosina do receptor HER2 em células de tumor da mama MCF-7. Além disso, foi ilustrada a actividade mitogénica dos polipéptidos de

heregulina em células SK-BR-3 (que expressam níveis elevados do receptor HER2). Tal como outros factores de crescimento que pertencem à família EGF, os polipéptidos HRG solúveis parecem ser derivados de um precursor ligado à membrana (designado por pro-HRG) que é proteoliticamente processado para libertar a forma solúvel de 45 kDa. Estes pro-HRG não possuem um péptido de sinal de terminal N. Apesar das heregulinas serem substancialmente idênticas nos primeiros 213 resíduos de aminoácido, elas são classificadas em dois tipos principais, α e β , com base em dois domínios do tipo EGF variante que diferem nas suas porções de terminal C. Apesar de tudo, estes domínios do tipo EGF são idênticos no espaçamento de seis resíduos de cisteína neles contidos. Com base numa comparação de sequências de aminoácidos, Holmes *et al.* verificaram que entre a primeira e sexta cisteínas no domínio tipo EGF, as HRG eram 45% semelhantes ao factor de crescimento tipo EGF de ligação a heparina, 35% idêntico a anfiregulina (AR), 32% idênticos a TGF- α e 27% idênticos a EGF.

O factor de diferenciação *neu* de 44 kDa (NDF) que é o equivalente de rato da HRG humana, foi primeiro descrito por Peles *et al.* *Cell*. 69:205-216 (1992), e Wen *et al.*, *Cell*, 69:559-572 (1992). Tal como os polipéptidos HRG, o NDF tem um domínio de homologia de imunoglobulina (Ig) seguido por um domínio do tipo EGF e não possui um péptido de sinal de terminal N. Subsequentemente, Wen *et al.* *Mol Cell Biol.*, 14(3):1909-1919 (1994) realizaram uma "clonagem exaustiva" para alargar a família dos NDF. Este trabalho revelou seis pro-NDF fibroblásticos distintos. Adoptando a nomenclatura de Holmes *et al.*, os NDF são classificados ou como polipéptidos α ou β , com base nas sequências dos domínios tipo EGF. As isoformas 1 a 4 são caracterizadas com base na porção justamembranar variável (entre o domínio tipo EGF e o domínio transmembranar). Além disso, estão descritas isoformas a, b e c que têm domínios citoplasmáticos de comprimento variável. Estes investigadores concluíram que diferentes isoformas de NDF são produzidas por *splicing* alternativo e desempenham diferentes funções específicas do tecido.

Falls *et al.*, *Cell*, 72:801-815 (1993) descrevem outro membro da família de heregulina que designaram por polipéptido de actividade indutora do receptor de acetilcolina (ARIA). O

polipéptido ARIA derivado de galinha estimula a síntese de receptores de acetilcolina do músculo. Veja-se também WO 94/08007. ARIA é uma heregulina do tipo- β e não possui o espaçador "glico" completo (rico em locais de glicosilação) presente entre o domínio tipo Ig e o domínio tipo EGF de HRG β 1- β 3.

Marchionni *et al.*, *Nature*, 362:312-318 (1993) identificaram várias proteínas derivadas de bovino que podem designar por factores de crescimento da glia (GGF). Estes GGF partilham o domínio tipo Ig e o domínio tipo EGF com as outras proteínas heregulina descritas acima, mas também têm um domínio *kringle* de terminal amino. Os GGF não têm geralmente o espaçador "glico" completo entre o domínio tipo Ig e o domínio tipo EGF. Apenas um dos GGF, GGFII, possuía um péptido de sinal de terminal N.

A expressão da família de receptores de ErbB2 e polipéptidos de heregulina no cancro da mama é revista em Bacus *et al.*, *Pathology Patterns*, 102(4)(Supp. 1):S13-S24 (1994).

Veja-se também Alimandi *et al.*, *Oncogene*, 10:1813-1821 (1995); Beerli *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 15:6496-6505 (1995); Karunagaran *et al.*, *EMBO J*, 15:254-264 (1996); Wallasch *et al.*, *EMBO J*, 14:4267-4275 (1995); e Zhang *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 271:3884-3890 (1996), em relação à família de receptores acima.

A patente US 5480968 descreve o polipéptido erbB3 e anti-soros produzidos contra péptidos específicos a partir desse polipéptido, um dos quais provém do domínio extracelular. No entanto, apesar de mencionar utilizações possíveis dos anticorpos na terapia e detecção de erbB3, não menciona nenhum efeito na acção de heregulina e, de facto, não reconhece a sua existência. Não é conhecido se o anti-soro contra o domínio extracelular terá intrinsecamente esta propriedade, mas é em qualquer caso negada aqui a partir das reivindicações dirigidas para os anticorpos *per se*.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona anticorpos que se ligam a ErbB3 e possuem também as seguintes propriedades: uma capacidade para reduzir a formação de um complexo de proteína ErbB2-ErbB3 induzida por heregulina numa célula que expressa ErbB2 e ErbB3; e a característica de reduzir a activação de ErbB2 induzida por heregulina numa célula que expressa ErbB2 e ErbB3.

A afinidade de ligação de heregulina relativamente à proteína ErbB3 pode ser aumentada ou reduzida, mas é de preferência aumentada.

Os anticorpos preferidos são anticorpos monoclonais que se ligam a um epítipo no domínio extracelular do receptor ErbB3. Em geral, os anticorpos de interesse irão ligar-se ao receptor ErbB3 com uma afinidade de pelo menos cerca de 10 nM, mais preferencialmente pelo menos cerca de 1 nM. Nalgumas concretizações, o anticorpo está imobilizado (e.g. ligado de forma covalente a) numa fase sólida, e.g., para purificação por afinidade do receptor, ou para testes de diagnóstico.

Os anticorpos dos parágrafos anteriores podem ser proporcionados na forma de uma composição compreendendo o anticorpo e um transportador ou diluente farmacologicamente aceitável.

Descreve-se uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica para o anticorpo dos parágrafos anteriores que pode também compreender um promotor ligado de forma operacional a ele; um vector de expressão compreendendo a molécula de ácido nucleico ligada de forma operacional a sequências de controlo reconhecidas por uma célula hospedeira transformada com o vector; uma linha celular compreendendo o ácido nucleico (e.g., uma linha celular de hibridoma); e um processo para utilizar uma molécula de ácido nucleico que codifica para o anticorpo, para efectuar a produção do anticorpo compreendendo cultivar uma célula que compreende o ácido nucleico e, opcionalmente, recuperar o anticorpo a partir da cultura de células e, de preferência, do meio de cultura de células.

A invenção também proporciona a utilização do anticorpo no fabrico de um medicamento para tratar um mamífero.

Descreve-se um método para detectar ErbB3 *in vitro* ou *in vivo* compreendendo contactar o anticorpo com uma célula que se suspeita que contém ErbB3 e detectar se ocorreu ligação e um teste para detectar um tumor, caracterizado por expressão amplificada de ErbB3 compreendendo os passos de expor uma célula ao anticorpo aqui descrito e determinar o grau de ligação do anticorpo à célula. Em geral, o anticorpo para utilização neste teste será marcado. O teste aqui descrito pode ser um teste *in vitro* (tal como um teste ELISA) ou um teste *in vivo*. Para o diagnóstico de um tumor *in vivo*, o anticorpo é geralmente conjugado com um isótopo radioactivo e administrado a um mamífero e o grau de ligação do anticorpo aos tecidos no mamífero é observado por pesquisa externa de radioactividade.

Breve descrição das Figuras

A Figura 1 mostra a ligação de HRG a células K562 ErbB3 na presença de vários anticorpos monoclonais anti-ErbB3. Os anticorpos anti-ErbB3 purificados foram incubados com uma suspensão de células K562 ErbB3 e ^{125}I -HRG β_1 (₁₇₇₋₂₄₄). Após aproximadamente 18 horas em gelo, mediram-se as contagens de células ligadas. As contagens são apresentadas representadas graficamente como uma percentagem de ligação na ausência de anticorpo (controlo). A ligação não específica foi determinada utilizando um excesso de HRG β_1 (₁₇₇₋₂₄₄) (HRG) não marcado. Os anticorpos contra a proteína ErbB2 (2C4) e HSV (5B6) foram utilizados como controlos negativos.

A Figura 2 mostra o efeito da concentração de anticorpo na ligação de HRG. Realizou-se uma experiência de dose-resposta no anticorpo 3-8D6 que se verificou que aumenta a ligação de HRG. As células K562 ErbB3 foram incubadas com uma concentração fixa de ^{125}I -HRG e concentrações crescentes do anticorpo 3-8D6. Os dados da experiência são apresentados num gráfico de contagem ligada a células versus concentração de anticorpo.

A Figura 3 ilustra a ligação de HRG a células K562 ErbB3 na presença e ausência do anticorpo 3-8D6 ou um seu fragmento Fab. Fizeram-se experiências de ligação ao ligando competitivas, na ausência (controlo) e presença de 100 nM de 3-8D6 ou Fab. Os dados são representados graficamente como ligado/total (B/T) versus HRG β 1₍₁₇₇₋₂₄₄₎ total.

Descrição detalhada das concretizações preferidas

I. Definições

Salvo indicação em contrário, o termo "ErbB3" quando aqui utilizado refere-se à proteína ErbB3 de mamífero e "erbB3" refere-se ao gene erbB3 de mamífero. A proteína ErbB3 preferida é a proteína ErbB3 humana presente na membrana celular de uma célula. O gene erbB3 humano está descrito na patente US 5480968 e Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4905-4909 (1990).

O anticorpo de interesse pode ser um que não tem reacção cruzada significativa com outras proteínas, tais como as codificadas pelos genes erbB1, erbB2 e/ou erbB4. Nestas concretizações, o grau de ligação do anticorpo a estas proteínas que não a ErbB3 (e.g. ligação de superfície celular ao receptor endógeno) será inferior a 10%, como determinado por análise de separação de células activada por fluorescência (FACS) ou radioimunoprecipitação (RIA). No entanto, por vezes o anticorpo pode ser um que tem reacção cruzada com o receptor ErbB4 e, opcionalmente, não tem reacção cruzada com o receptor de EGFR e/ou ErbB2, por exemplo.

"Heregulina"(HRG) quando aqui utilizada, refere-se a um polipéptido que activa o complexo de proteína ErbB2-ErbB3 (i.e. induz a fosforilação de resíduos de tirosina no complexo ErbB2-ErbB3 por ligação a este). Vários polipéptidos de heregulina abrangidos por este termo foram descritos acima. O termo inclui fragmentos biologicamente activos e/ou variantes de um polipéptido HRG que ocorre naturalmente, tal como um seu domínio tipo EGF (e.g. HRG β 1₁₇₇₋₂₄₄).

O "complexo de proteína ErbB2-ErbB3" é um oligómero associado de forma não covalente do receptor ErbB2 e do

receptor ErbB3. Este complexo forma-se quando uma célula que expressa ambos os receptores é exposta a HRG. O complexo pode ser isolado por imunoprecipitação e analisado por SDS-PAGE, como descrito no Exemplo a seguir.

A expressão “reduz a formação de um complexo de proteína ErbB2-ErbB3 induzida por heregulina numa célula que expressa ErbB2 e ErbB3” refere-se à capacidade do anticorpo reduzir de forma estatisticamente significativa, o número de complexos de proteína ErbB2-ErbB3 que se formam numa célula que foi exposta ao anticorpo e HRG, em relação a uma célula não tratada (controlo). A célula que expressa ErbB2 e ErbB3 pode ser uma célula ou linha celular que ocorre naturalmente (e.g. célula Caov3) ou pode ser produzida de forma recombinante introduzindo um ácido nucleico que codifica para cada uma destas proteínas numa célula hospedeira. De preferência, o anticorpo irá reduzir a formação deste complexo em pelo menos 50% e mais preferencialmente em pelo menos 70%, como determinado por densitometria de varrimento de reflectância de transferências de Western do complexo (veja-se o Exemplo a seguir).

O anticorpo que “reduz a activação de ErbB2 induzida por heregulina numa célula que expressa ErbB2 e ErbB3” é um que reduz de forma estatisticamente significativa a actividade de fosforilação de tirosina de ErbB2 que ocorre quando o HRG se liga a ErbB3 no complexo de proteína ErbB2-ErbB3 (presente na superfície de uma célula que expressa os dois receptores) em relação a uma célula não tratada (controlo). Isto pode ser determinado com base nos níveis de fosfotirosina no complexo ErbB2-ErbB3 após exposição do complexo a HRG e ao anticorpo de interesse. A célula que expressa a proteína ErbB2 e ErbB3 pode ser uma célula ou linha celular que ocorre naturalmente (e.g. célula Caov3) ou pode ser produzida de forma recombinante. A activação de ErbB2 pode ser determinada por transferência de Western, seguida de sondagem com um anticorpo anti-fosfotirosina, como descrito no Exemplo a seguir. Alternativamente, o teste de activação do receptor de quinase descrito no WO9514930 e Sadick *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 235:207-214 (1996) pode ser utilizado para quantificar a activação de ErbB2. De preferência, o anticorpo irá reduzir a activação de ErbB2 induzida por heregulina em

pelo menos 50% e mais preferencialmente pelo menos 70%, tal como determinado por densitometria de varrimento de reflectância de transferências de Western do complexo sondado com um anticorpo anti-fosfotirosina (veja-se o Exemplo a seguir).

O anticorpo pode ser um que “aumenta a afinidade de ligação de heregulina relativamente à proteína ErbB3”. Isto significa que, na presença do anticorpo (e.g. 100 nM de anticorpo), a quantidade de HRG que se liga a ErbB3 (e.g. ErbB3 endógeno presente numa célula que ocorre naturalmente ou linha celular, ou introduzido numa célula por técnicas recombinantes, veja-se o Exemplo a seguir); em relação ao controlo (sem anticorpo) aumenta de forma estatisticamente significativa. Por exemplo, a quantidade de HRG que se liga à linha celular K562 transfectada com *erbB3*, tal como aqui descrito, pode aumentar na presença de 100 nM de anticorpo em pelo menos 10%, de preferência pelo menos 50% e muito preferencialmente pelo menos cerca de 100% (veja-se Figura 1), em relação ao controlo.

O anticorpo que reduz a ligação de HRG à proteína ErbB3 (e.g. ErbB3 presente numa célula) é um que interfere com o local de ligação a HRG na proteína ErbB3, de modo que diminui de forma estatisticamente significativa a quantidade de heregulina que é capaz de se ligar a este local na molécula. Exemplos destes anticorpos são os anticorpos 3-2F9, 3-3E9 e 3-6B9 descritos aqui nos Exemplos.

O termo “anticorpo” é utilizado no sentido mais lato e abrange especificamente anticorpos monoclonais intactos, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (e.g. anticorpos biespecíficos) formados a partir de pelo menos dois anticorpos intactos e fragmentos de anticorpo, desde que exibam a actividade biológica desejada. O anticorpo pode ser um IgM, IgG (e.g. IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄), IgD, IgA ou IgE, por exemplo. De preferência, no entanto, o anticorpo não é um anticorpo IgM.

“Fragmentos de anticorpo” compreendem uma porção de um anticorpo intacto, em geral a região de ligação ao antigénio, ou região variável do anticorpo intacto. Exemplos de

fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv: diacorpos; moléculas de anticorpo de cadeia simples e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo.

O termo "anticorpo monoclonal", tal como aqui utilizado, refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, *i.e.*, os anticorpos individuais que constituem a população são idênticos, excepto quanto a possíveis mutações que ocorrem naturalmente que possam estar presentes em quantidades menores. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único local antigénico. Além disso, ao contrário das preparações de anticorpo convencionais (policlonais) que tipicamente incluem diferentes anticorpos dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antigénio. Além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos na medida em que são sintetizados pela cultura de hibridoma, não contaminados por outras imunoglobulinas. O modificador "monoclonal" indica que o anticorpo é obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea e não deve ser entendido que é necessário produzir o anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a ser utilizados de acordo com a presente invenção podem ser produzidos pelo método do hibridoma primeiro descrito por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:49 (1975), ou podem ser produzidos por métodos de ADN recombinante (veja-se, *e.g.* patente U.S. N° 4816567). Os "anticorpos monoclonais" também podem ser isolados de bibliotecas de apresentação em fagos, utilizando as técnicas descritas em Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por exemplo.

Os anticorpos monoclonais incluem aqui especificamente anticorpos "quiméricos" (imunoglobulinas) em que uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica a, ou homóloga às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular, ou que pertence a uma classe ou subclasse de anticorpo particular, enquanto que o restante da(s) cadeia é idêntico a, ou homólogo a sequências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies, ou que pertencem a

outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos desses anticorpos, desde que exibam a actividade biológica desejada (Patente N° 4816567: Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

As formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (*e.g.* murídeo) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou seus fragmentos (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outras subsequências de anticorpos de ligação ao antigénio) que contêm a sequência mínima derivada da imunoglobulina não humana. Na sua maioria, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpos receptores) em que resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do receptor são substituídos por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo dador), tal como um ratinho, rato ou coelho, com a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Nalguns casos, os resíduos da região esqueleto (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados nem no anticorpo receptor, nem nas sequências CDR ou sequências esqueleto importadas. Estas modificações são feitas para refinar e otimizar a performance do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todo, de pelo menos um, e tipicamente dois domínios variáveis, em que todas, ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também irá compreender, de forma óptima, pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, veja-se Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). O anticorpo humanizado inclui um anticorpo PRIMATIZED™ em que a região de ligação ao antigénio do anticorpo é derivada de um anticorpo produzido por imunização de macacos Macaca com o antigénio de interesse.

Os fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia simples" ou "sFv" compreendem os domínios V_H e V_L de anticorpo, em que

estes domínios estão presentes numa única cadeia de polipéptido. Em geral, o polipéptido Fv compreende também um ligante de polipéptido entre os domínios V_H e V_L , o que permite que o sFv forme a estrutura desejada para ligação ao antigénio. Para uma revisão sobre sFv, veja-se Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, Nova Iorque, pp. 269-315 (1994).

O termo "diacorpos" refere-se a fragmentos de anticorpo pequenos com dois locais de ligação ao antigénio, que compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) ligado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) na mesma cadeia de polipéptido (V_H - V_L). Utilizando um ligante que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois locais de ligação ao antigénio. Os diacorpos estão descritos em mais detalhe, por exemplo, na EP 404097; WO 93/11161; e Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1983).

Um anticorpo "isolado" é um que foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de um componente do seu meio ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu meio ambiente natural são materiais que iriam interferir com as utilizações de diagnóstico ou terapêuticas do anticorpo e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos proteicos ou não proteicos. Em concretizações preferidas, o anticorpo será purificado (1) para mais do que 95% em peso de anticorpo, tal como determinado pelo método de Lowry e muito preferencialmente mais do que 99% em peso, (2) a um grau suficiente para se obterem pelo menos 15 resíduos do terminal N ou internos da sequência de aminoácidos, utilizando um sequenciador de copo giratório, ou (3) até à homogeneidade, por SDS-PAGE, sob condições redutoras ou não redutoras, utilizando coloração com azul de Coomassie ou, de preferência, com prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes, uma vez que pelo menos um componente do meio ambiente natural do anticorpo não estará presente. Normalmente, no entanto, o anticorpo isolado será preparado por pelo menos um passo de purificação.

Tal como aqui utilizado, o termo "epítopo de ligação ao receptor de salvamento" refere-se a um epítopo da região Fc de uma molécula IgG (e.g., IgG₁, IgG₂, IgG₃, ou IgG₄) que é responsável pelo aumento da semivida da molécula IgG no soro, *in vivo*.

"Tratamento" refere-se quer a tratamento terapêutico, quer a medidas profiláticas ou preventivas. Aqueles necessitados de tratamento incluem os que já têm o distúrbio, bem como aqueles em que se pretende prevenir o distúrbio.

"Mamífero" para fins de tratamento refere-se a qualquer animal classificado como mamífero, incluindo humanos, animais domésticos e de quinta e animais de zoo, desporto ou de estimação, tais como cães, cavalos, gatos, vacas, etc. De preferência, o mamífero é humano.

Um "distúrbio" é qualquer condição que irá beneficiar do tratamento com o anticorpo anti-ErbB3. Isto inclui distúrbios ou doenças crónicos e agudos, incluindo as condições patológicas que predisõem o mamífero para o distúrbio em questão. Em geral, o distúrbio será aquele em que ocorre activação excessiva do complexo de proteína ErbB2-ErbB3 pela heregulina. Exemplos não limitativos de distúrbios a ser tratados aqui incluem tumores benignos e malignos; leucemias e malignidades linfóides: distúrbios neuronais, gliais, astrocíticos, hipotalâmicos e outros distúrbios glandulares, macrofágicos, epiteliais, estromais e blastocélicos: e distúrbios inflamatórios, angiogénicos e imunológicos.

Os termos "cancro" e "canceroso" referem-se a, ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que se caracteriza tipicamente por um crescimento celular desregulado. Exemplos de cancro incluem, mas não se limitam a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia. Exemplos mais particulares destes cancros incluem, cancro de células escamosas, cancro de pulmão de células pequenas, cancro de pulmão de células não pequenas, cancro gastrointestinal, cancro pancreático, glioblastoma, cancro cervical, cancro dos ovários, cancro do fígado, cancro da bexiga, hepatoma, cancro da mama, cancro do cólon, cancro colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma das glândulas salivares, cancro do rim,

cancro renal, cancro da próstata, cancro vulvar, cancro da tiróide, carcinoma hepático e vários tipos de cancro da cabeça e pescoço.

O termo "agente citotóxico" tal como aqui utilizado, refere-se a uma substância que inibe ou previne a função das células e/ou causa destruição das células. O termo inclui isótopos radioactivos (e.g. I, Y e Re), agentes quimioterapêuticos e toxinas, tais como toxinas enzimaticamente activas de origem bacteriana, fúngica, de plantas ou animais, ou seus fragmentos.

Um "agente quimioterapêutico" é um composto químico útil no tratamento do cancro. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem adriamicina, doxorrubicina, 5-fluorouracilo, citosina arabinósido ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, bussulfano, citoxina, Taxol, metotrexato, cisplatina, melfalan, vinblastina, bleomicina, etoposido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatina, teniposido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (veja-se Patente US No. 4675187), melfalan e outras mostardas de azoto relacionadas.

O termo "citóquina" é um termo genérico para proteínas libertadas por uma população de células que actuam noutra célula como mediadores celulares. Exemplos destas citóquinas incluem linfóquinas, monóquinas e hormonas polipeptídicas tradicionais. Inclui-se nas citóquinas a hormona de crescimento, tal como hormona de crescimento humana, hormona de crescimento humana de N-metionilo e hormona de crescimento bovina; hormona paratiróide; tiroxina; insulina; pró-insulina; relaxina; pró-relaxina; hormonas glicoproteicas, tais como a hormona estimuladora de folículo (FSH), hormona estimuladora da tiróide (TSH), e hormona luteinizante (LH); factor de crescimento hepático; factor de crescimento de fibroblastos; prolactina; lactogénio da placenta; factor de necrose de tumor- α e β ; substância inibidora de *mulleriano*; péptido associado a gonadotrofina de ratinho; inibina; activina; factor de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); factores de crescimento nervoso tais como NGF- β ; factor de crescimento de plaquetas; factores de

crescimento transformantes (TGF), tais como TGF- α e TGF- β ; factor de crescimento tipo insulina-I e II; eritropoietina (EPO); factores osteoinductores; interferões, tais como interferão- α , - β , e - γ ; factores estimuladores de colónias (CSF), tais como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulócito-macrófago (GM-CSF); e CSF de granulócito (G-CSF); interleucinas (IL), tais como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; um factor de necrose de tumor, tal como TNF- α ou TNF- β ; e outros factores polipeptídicos incluindo LIF e ligando *kit* (KL). Tal como aqui utilizado, o termo citóquina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura de células recombinante e equivalentes biologicamente activos das citóquinas de sequência nativa.

O termo "prodroga" tal como utilizado neste pedido, refere-se a uma forma precursora ou derivada de uma substância farmacologicamente activa que é menos citotóxica para as células de tumor em comparação com a droga mãe e é capaz de ser enzimaticamente activada ou convertida na forma mãe mais activa. Veja-se, e.g., Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th. Meeting Belfast (1986) e Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). As prodrogas da presente invenção incluem, mas não se limitam a, prodrogas contendo fosfato, prodrogas contendo tiofosfato, prodrogas contendo sulfato, prodrogas contendo péptido, prodrogas modificadas de D-aminoácidos, prodrogas glicosiladas, prodrogas contendo β -lactama, prodrogas contendo fenoxiacetamida opcionalmente substituída ou prodrogas contendo fenilacetamida opcionalmente substituída, 5-fluorocitosina e outras prodrogas de 5-fluorouridina que podem ser convertidas na forma de droga livre citotóxica, mais activa. Exemplos de drogas citotóxicas que podem ser derivatizadas forma de prodroga para utilização na presente invenção incluem, mas não se limitam aos agentes quimioterapêuticos descritos acima.

A palavra "marcador" quando aqui utilizada, refere-se a um composto ou composição detectável que é conjugado directa ou indirectamente com o anticorpo. O marcador pode ser ele próprio detectável (e.g., marcadores de radioisótopos ou

fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, pode catalisar a alteração química de um composto ou composição substrato que é detectável.

O termo "fase sólida" significa uma matriz não aquosa à qual o anticorpo da presente invenção pode aderir. Exemplos de fases sólidas aqui abrangidas incluem as formadas parcial ou inteiramente de vidro (e.g., vidro de poro controlado), polissacáridos (e.g., agarose), poliacrilamidas, poliestireno, poli(álcool vinílico) e silicones. Em certas concretizações, dependendo do contexto, a fase sólida pode compreender o poço de uma placa de teste; noutras é uma coluna de purificação (e.g., uma coluna de cromatografia de afinidade). Este termo também inclui uma fase sólida descontínua de partículas discretas, tais como as descritas na patente US No. 4275149.

Um "lipossoma" é uma vesícula pequena composta por vários tipos de lípidos, fosfolípidos e/ou tensioactivos que é útil para fornecer uma droga (tal como os anticorpos anti-ErbB3 aqui descritos e, opcionalmente, um agente quimioterapêutico) a um mamífero. Os componentes do lipossoma são normalmente organizados numa formação em bicamada, semelhante à organização de lípidos das membranas biológicas.

Uma molécula de ácido nucleico "isolada" é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual está normalmente associada na fonte natural do ácido nucleico do anticorpo é outra diferente da forma ou arranjo em que é encontrada na natureza. As moléculas de ácido nucleico isoladas distinguem-se assim da molécula de ácido nucleico como existe nas células naturais. No entanto, uma molécula de ácido nucleico isolada inclui uma molécula de ácido nucleico contida em células que normalmente expressam o anticorpo, em que, por exemplo, a molécula de ácido nucleico está numa localização cromossómica diferente da de células naturais.

O termo "sequências de controlo" refere-se a sequências de ADN necessárias para a expressão de uma sequência codificante ligada de forma operacional, num organismo hospedeiro particular. As sequências de controlo que são adequadas para procariotas, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência de operador e um local de ligação

ao ribossoma. É conhecido que as células eucariotas utilizam promotores, sinais de poliadenilação e potenciadores.

Um ácido nucleico está "ligado de forma operacional" quando é colocado numa relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, o ADN para uma pré-sequência ou líder secretor está ligado de forma operacional ao ADN para um polipéptido se é expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipéptido; um promotor ou potenciador está ligado de forma operacional a uma sequência codificante se afecta a transcrição da sequência; ou um local de ligação ao ribossoma está ligado de forma operacional a uma sequência codificante se está posicionado de modo a facilitar a tradução. Em geral, "ligado de forma operacional" significa que as sequências de ADN a ser ligadas são contíguas e, no caso de um líder secretor, contíguas e em fase de leitura. No entanto, os potenciadores não têm que ser contíguos. A ligação é realizada por ligação em locais de restrição convenientes. Se estes locais não existem, utilizam-se adaptadores ou ligantes de oligonucleótidos sintéticos, de acordo com a prática convencional.

Tal como aqui utilizadas, as expressões "célula", "linha celular" e "cultura de células" são utilizadas de forma permutável e todas estas designações incluem a progénie. Assim, as palavras "transformantes" e "células transformadas" incluem a célula objecto principal e culturas derivadas desta, independentemente do número de transferências. Também deve entender-se que toda a progénie pode não ser exactamente idêntica em termos de conteúdo de ADN, devido a mutações deliberadas ou inadvertidas. Inclui-se a progénie mutante que tem a mesma função ou actividade biológica, tal como pesquisado na célula originalmente transformada. Quando se pretendem utilizar designações distintas, isso será claro a partir do contexto.

II. Modos de realizar a invenção

A. Preparação de anticorpo

Segue-se uma descrição de exemplos de técnicas para a produção dos anticorpos reivindicados.

(i) *Anticorpos policlonais*

Os anticorpos policlonais são geralmente produzidos em animais por injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) múltiplas do antigénio relevante e um adjuvante. Poderá ser útil conjugar o anticorpo relevante a uma proteína que é imunogénica na espécie a ser imunizada, e.g. hemocianina de lapa buraco de fechadura, albumina do soro, tiroglobulina de bovino ou inibidor de tripsina de soja, utilizando um agente bifuncional ou de derivatização, por exemplo, éster de maleimidobenzoilsulfosuccinimida (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (através de resíduos de lisina), gluteraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 , ou $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, em que R e R^1 são grupos alquilo diferentes.

Os animais são imunizados contra o antigénio, conjugados imunogénicos ou derivados, combinando, e.g. 100 μg ou 5 μg da proteína ou conjugado (para coelhos ou ratinhos, respectivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e injectando a solução intradermicamente em múltiplos locais. Um mês mais tarde, os animais levam um reforço com 1/5 a 1/10 da quantidade original de péptido ou conjugado, em adjuvante completo de Freund, por injeção subcutânea em múltiplos locais. Sete a 14 dias mais tarde, os animais são sangrados e o soro é testado quanto ao título de anticorpo. Os animais levam um reforço até o título atingir um patamar. De preferência, o animal leva um reforço com o conjugado do mesmo antigénio, mas conjugado com uma proteína diferente e/ou através de um reagente de reticulação diferente. Os conjugados também podem ser produzidos em cultura de células recombinante, como fusões de proteínas. Além disso, os agentes de agregação, tais como alúmen, são utilizados adequadamente para potenciar a resposta imunitária.

(ii) *Anticorpos monoclonais*

Os anticorpos monoclonais são obtidos a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogénea, i.e. os anticorpos individuais que constituem a população são idênticos, excepto quanto a possíveis mutações que ocorrem naturalmente que poderão estar presentes em quantidades

menores. Assim, o modificador "monoclonal" indica que o anticorpo não é uma mistura de anticorpos discretos.

Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos utilizando o método do hibridoma primeiro descrito por Kohler e Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975), ou podem ser produzidos por métodos de ADN recombinantes (patente US N° 4816567).

No método do hibridoma um ratinho ou outro animal hospedeiro adequado, tal como um *hamster*, é imunizado como aqui descrito acima para produzir linfócitos que produzem, ou são capazes de produzir anticorpos que se irão ligar especificamente à proteína utilizada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são então fundidos com células de mieloma utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 [Academic Press, (1986)]).

As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e crescidas num meio de cultura adequado que contém preferencialmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma mãe não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma mãe não possuem a enzima hipoxantina guanina fosforribosil-transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT) substâncias que impedem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

As células de mieloma preferidas são as que se fundem de forma eficaz, suportam uma produção de anticorpo de nível elevado, estável, pelas células que produzem anticorpo seleccionadas e são sensíveis a um meio, tal como o meio HAT. De entre estas, as linhas celulares de mieloma preferidas são linhas celulares de mieloma de murídeo, tais como as derivadas de tumores de ratinho MOPC-21 e MPC-11, disponíveis do Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia EUA e células SP-2 ou X63-Ag-8-653 disponíveis da American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EUA. Também foram

descritas linhas celulares de mieloma humano e de heteromieloma ratinho-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker. Inc., Nova Iorque, 1987)).

O meio de cultura em que as células de hibridoma crescem é testado quanto à produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antigénio. De preferência, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação, ou por um teste de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA).

A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada pela análise de Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Após se identificarem as células de hibridoma que produzem anticorpos com a especificidade, afinidade e/ou actividade desejadas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitante e crescidos por métodos convencionais (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Os meios de cultura adequados para este fim incluem, por exemplo, o meio D-MEM ou RPMI-1640. Adicionalmente, as células de hibridoma podem ser crescidas *in vivo* como tumores ascíticos, num animal.

Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones podem ser separados adequadamente do meio de cultura, fluido de ascites, ou soro, por procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulina tais como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia de hidroxilapatite, electroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

O ADN que codifica para os anticorpos monoclonais é facilmente isolado e sequenciado, utilizando procedimentos convencionais (e.g., utilizando sondas de oligonucleótido que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam para as cadeias pesada e leve de anticorpos de murídeo). As

células de hibridoma servem como uma fonte preferida deste ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vectores de expressão, que são então transfectados para células hospedeiras, tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma que não produzem de outro modo proteína imunoglobulina, para se obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Artigos de revisão sobre a expressão recombinante em bactérias de ADN que codifica para o anticorpo incluem Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) e Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992).

Os anticorpos ou fragmentos de anticorpo podem ser isolados de bibliotecas de fagos de anticorpos produzidas utilizando as técnicas descritas em McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos de murídeo e humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de afinidade elevada (gama nM) por mistura de cadeias (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), bem como a infecção combinatória e recombinação *in vivo* como uma estratégia par a construção de bibliotecas de fagos muito grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Assim, estas técnicas são alternativas viáveis às técnicas de hibridoma de anticorpos monoclonais, tradicionais, para o isolamento de anticorpos monoclonais.

O ADN também pode ser modificado, por exemplo, substituindo a sequência codificante para os domínios constantes de cadeia pesada e leve no lugar das sequências de murídeo homólogas (patente US N° 4816567; Morrison, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 81: 6851 [1984]) ou ligando de forma covalente à sequência codificante de imunoglobulina toda ou parte da sequência codificante para um polipéptido que não imunoglobulina.

Tipicamente, os domínios constantes de um anticorpo são substituídos por estes polipéptidos que não imunoglobulina, ou os domínios variáveis de um local de combinação com o

antigénio de um anticorpo são substituídos por eles, para criar um anticorpo bivalente quimérico compreendendo um local de combinação com o antigénio que tem especificidade para um antigénio e outro local de combinação com o antigénio que tem especificidade para um antigénio diferente.

(iii) Anticorpos humanizados e humanos

Os métodos para humanizar anticorpos não humanos são bem conhecidos na arte. Em geral, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácido introduzidos nele de uma fonte que é não humana. Estes resíduos de aminoácido não humanos são muitas vezes designados por resíduos de "importação", que são tipicamente retirados de um domínio variável de "importação". A humanização pode ser essencialmente realizada de acordo com o método de Winter e colaboradores [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)], substituindo as sequências correspondentes de um anticorpo humano pelas CDR ou sequências de CDR de roedores. Deste modo, estes anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente US N°. 4816567), em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em que alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedores.

A escolha de domínios variáveis humanos, quer leves, quer pesados, a ser utilizados na produção de anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o designado método do "melhor ajuste", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é pesquisada contra toda a biblioteca de sequências de domínio variável humanas, conhecidas. A sequência humana que é mais próxima da do roedor é aceite como sequência esqueleto (FR) humana para o anticorpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2296 [1993]; Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 [1987]). Outro método utiliza uma sequência esqueleto particular derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias leves

e pesadas. A mesma sequência esqueleto pode ser utilizada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 [1992]; Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623 [1993]).

Também é importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de afinidade elevada para o antigénio e outras propriedades biológicas favoráveis. Para alcançar este objectivo, de acordo com um método preferido, os anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das sequências mãe e vários produtos humanizados conceptuais, utilizando modelos tridimensionais das sequências mãe e humanizadas. Os modelos de imunoglobulina tridimensionais prováveis estão disponíveis usualmente e são familiares para os peritos na arte. Estão disponíveis programas de computador que ilustram e apresentam estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobulina candidatas, seleccionadas. A inspecção destas apresentações permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, *i.e.* a análise dos resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata se ligar ao seu antigénio. Deste modo, os resíduos de FR podem ser seleccionados e combinados a partir das sequências de consenso e de importação, de modo a se obter a característica do anticorpo desejada, tal como maior afinidade para o(s) antigénio alvo. Em geral, os resíduos de CDR estão directa e muito substancialmente envolvidos em influenciar a ligação ao antigénio.

Alternativamente, é agora possível produzir animais transgénicos (*e.g.* ratinhos) que são capazes, por imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulinas endógenas. Por exemplo, foi descrito que a eliminação homozigótica do gene da região de ligação de cadeia pesada (J_H) do anticorpo em ratinhos quiméricos e ratinhos mutantes da linha germinativa resulta na inibição completa da produção de anticorpos endógenos. A transferência da série do gene de imunoglobulina da linha germinativa humana neste ratinho mutante da linha germinativa irá resultar na produção de anticorpos humanos, aquando do desafio com o antigénio. Veja-se, *e.g.*, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993);

Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993). Os anticorpos humanos também podem ser derivados a partir de bibliotecas de apresentação em fagos (Hoogenboom *et al.* *J. Mol Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol Biol.*, 222:581-597(1991)).

(iv) *Fragmentos de anticorpo*

Foram desenvolvidas várias técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados por digestão proteolítica de anticorpos intactos (veja-se, *e.g.*, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) e Brennan *et al.*, *Science*. 229:81 (1985)). No entanto, estes fragmentos podem agora ser produzidos directamente pelas células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpo podem ser isolados a partir de bibliotecas de fago de anticorpos discutidas acima. Alternativamente, os fragmentos Fab'-SH podem ser directamente recuperados de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, os fragmentos F(ab')₂ podem ser isolados directamente a partir da cultura de células hospedeiras recombinante. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão evidentes para o perito na arte.

(v) *Anticorpos biespecíficos*

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos que têm especificidades de ligação para pelo menos dois antigénios diferentes. Exemplos de anticorpos biespecíficos podem ligar-se a dois epítotos diferentes da proteína ErbB3. Outros anticorpos deste tipo podem combinar um local de ligação de ErbB3 com um local(s) de ligação para EGFR, ErbB2 e/ou ErbB4. Alternativamente, um braço anti-ErbB3 pode ser combinado com um braço que se liga a uma molécula desencadeadora num leucócito, tal como uma molécula receptora de células T (*e.g.* CD2 ou CD3), ou receptores Fc para IgG (FcγR), tais como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16) de modo a focar os mecanismos de defesa celular na célula que expressa ErbB3. Também se podem utilizar anticorpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos em células que expressam ErbB3.

Estes anticorpos possuem um braço de ligação a ErbB3 e um braço que se liga ao agente citotóxico (e.g. saporina, anti-interferão- α , alcalóide de vinca, cadeia A de ricina, metotrexato ou hapteno de isótopo radioactivo). Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento total ou fragmentos de anticorpo (e.g. anticorpos biespecíficos F(ab')₂).

Os métodos para produzir anticorpos biespecíficos são conhecidos na arte. A produção tradicional de anticorpos biespecíficos de tamanho total baseia-se na co-expressão de dois pares de cadeia pesada/cadeia leve de imunoglobulina, em que as duas cadeias têm especificidades diferentes (Milstein e Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Devido ao sortido ao acaso de cadeias pesadas e leves de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10 moléculas de anticorpo diferentes, das quais apenas uma tem a estrutura biespecífica correcta. A purificação da molécula correcta, que é normalmente realizada por passos de cromatografia de afinidade, é algo complicada e os rendimentos de produto são baixos. Estão descritos processos semelhantes no WO 93/08829, publicado em 13 de Maio de 1993 e em Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acordo com uma abordagem diferente e mais preferida, os domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (locais de combinação de anticorpo-antigénio) são fundidos com sequências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão é de preferência com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte das regiões dobradiça, CH2 e CH3. É preferido que a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) contendo o local necessário para ligação à cadeia leve esteja presente em pelo menos uma das fusões. Os ADN que codificam para as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vectores de expressão separados e são co-transfectados num organismo hospedeiro adequado. Isto proporciona uma grande flexibilidade no ajuste de proporções mútuas dos três fragmentos de polipéptido quando razões desiguais das três cadeias de polipéptido utilizadas na construção proporcionam os rendimentos óptimos. É, no entanto, possível inserir as

sequências codificantes para dois ou todos os três polipéptidos num vector de expressão quando a produção de pelo menos duas cadeias polipeptídicas em razões iguais resulta em rendimentos elevados, ou quando as razões não têm nenhum significado particular.

Os anticorpos biespecíficos podem ser compostos por uma cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade de ligação num braço e um par de cadeia leve-cadeia pesada de imunoglobulina híbrida (proporcionando uma segunda especificidade de ligação) no outro braço. Verificou-se que esta estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico desejado das combinações de cadeia de imunoglobulina indesejadas, dado que a presença de uma cadeia leve de imunoglobulina em apenas metade da molécula biespecífica proporciona um modo fácil de separação. Esta abordagem está descrita em WO 94/04690. Para mais detalhes sobre a produção de anticorpos biespecíficos veja-se, por exemplo, Suresh *et al. Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

De acordo com outra abordagem, a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser manipulada para maximizar a percentagem de heterodímeros que são recuperados da cultura de células recombinante. A interface preferida compreende pelo menos uma parte do domínio C_H3 de um domínio constante de anticorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais de aminoácido pequenas da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas por cadeias laterais maiores (e.g. tirosina ou triptofano). São criadas "cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou semelhante ao da(s) cadeia lateral grande na interface da segunda molécula de anticorpo, substituindo cadeias laterais de aminoácido grandes por outras mais pequenas (e.g. alanina ou treonina). Isto proporciona um mecanismo para aumentar o rendimento do heterodímero em relação a outros produtos finais indesejados, tais como homodímeros.

Os anticorpos biespecíficos incluem anticorpos reticulados ou "heteroconjugados". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado a avidina, o outro a biotina. Foi proposto, por exemplo, que estes anticorpos dirigem células do sistema imunitário para células

indesejadas (Patente US N° 4676980) e para o tratamento da infecção por HIV (WO 91/00360, WO 92/200373 e EP 03089). OS anticorpos heteroconjugados podem ser produzidos utilizando quaisquer métodos de reticulação convenientes. Os agentes de reticulação adequados são bem conhecidos na arte e estão descritos na patente US No 4676980, juntamente com várias técnicas de reticulação.

Também foram descritas na literatura técnicas para produzir anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpo. Por exemplo, podem-se preparar anticorpos biespecíficos utilizando ligação química. Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985) descrevem um procedimento em que anticorpos intactos são clivados proteoliticamente para produzir fragmentos $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente complexante de ditiol, arsenito de sódio, para estabilizar ditióis vizinhos e prevenir a formação de ligações dissulfureto intermoleculares. Os fragmentos Fab' produzidos são então convertidos em derivados tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados Fab' -TNB é então reconvertido no Fab' -tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado Fab' -TNB, para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser utilizados como agentes para a imobilização selectiva de enzimas.

Progressos recentes facilitaram a recuperação directa de fragmentos Fab' -SH de *E. coli* que podem ser quimicamente acoplados para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) descrevem a produção de uma molécula de anticorpo biespecífico $F(ab')_2$ totalmente humanizada. Cada fragmento Fab' foi segregado separadamente a partir de *E. coli* e submetido a acoplamento químico directo *in vitro*, para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado era capaz de se ligar a células que sobre-expressam o receptor Her2 e a células T humanas normais, bem como desencadear a actividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor da mama humano.

Também foram descritas várias técnicas para produzir e isolar fragmentos de anticorpo biespecíficos, directamente a partir da cultura de células recombinante. Por exemplo, foram

produzidos anticorpos biespecíficos utilizando fechos de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). Os péptidos fecho de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos diferentes, por fusão de genes. Os homodímeros de anticorpo foram reduzidos na região dobradiça para formar monómeros e em seguida foram re-oxidados para formar os heterodímeros de anticorpo. Este método também pode ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo. A tecnologia de "diacorpos" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) proporcionou um mecanismo alternativo para produzir fragmentos de anticorpo biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) ligado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) por um ligante que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Assim, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a emparelhar com os domínios V_L e V_H complementares de outro fragmento, formando assim dois locais de ligação ao antigénio. Também foi referida outra estratégia para produzir fragmentos de anticorpo biespecíficos utilizando dímeros Fv de cadeia simples (sFv). Veja-se Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

São contemplados anticorpos com mais de duas valências. Por exemplo, podem-se preparar anticorpos triespecíficos. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147:60 (1991).

(vi) Pesquisa de anticorpos com as propriedades desejadas

As técnicas para produzir anticorpos foram descritas acima. Os anticorpos com as características aqui descritas são seleccionados.

Para seleccionar anticorpos que reduzem a formação do complexo de proteína ErbB2-ErbB3 induzida por HRG, as células que expressam ambos os receptores (e.g. células Caov3) podem ser pré-incubadas com tampão (controlo) ou anticorpo, em seguida tratadas com HRG ou tampão de controlo. As células são então lisadas e os lisados brutos podem ser centrifugados para remover o material insolúvel. Os sobrenadantes podem ser incubados com um anticorpo específico para ErbB2 ligado de forma covalente a uma fase sólida. Após lavagem, os

imunoprecipitados podem ser separados por SDS-PAGE. As transferências de Western dos geles são então sondadas com anticorpo anti-ErbB3. Após visualização, as transferências podem ser removidas e sondadas de novo com um anticorpo anti-ErbB2. A densitometria de varrimento de reflectância do gel pode ser feita de modo a quantificar o efeito do anticorpo em questão na formação do complexo induzida por HRG. Os anticorpos que reduzem a formação do complexo ErbB2-ErbB3 em relação ao controlo (células não tratadas) podem ser seleccionados. Veja-se o Exemplo a seguir.

Para seleccionar os anticorpos que reduzem a activação de ErbB2 induzida por HRG numa célula que expressa o receptor ErbB2 e ErbB3, as células podem ser pré-incubadas com tampão (controlo) ou anticorpo, em seguida tratadas com HRG ou tampão de controlo. As células são então lisadas e os lisados brutos podem ser centrifugados para remover material insolúvel. A activação de ErbB2 pode ser determinada por transferência de Western seguida de sondagem com um anticorpo anti-fosfotirosina, como descrito no Exemplo a seguir. A activação de ErbB2 pode ser quantificada por densitometria de varrimento de reflectância do gel, por exemplo. Alternativamente, o teste de activação do receptor de quinase descrito em WO 95/14930 e Sadick *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 235:207-214 (1996) pode ser utilizado para determinar a activação de ErbB2.

O efeito do anticorpo na ligação de HRG a ErbB3 pode ser determinado incubando as células que expressam este receptor (e.g. células 4E9H3 transfectadas para expressar ErbB3) com HRG radiomarcado (e.g. o seu domínio do tipo EGF) na ausência (controlo) ou presença do anticorpo anti-ErbB3, como descrito no Exemplo a seguir, por exemplo. Os anticorpos que aumentam a afinidade de ligação de HRG relativamente ao receptor ErbB3 podem ser seleccionados para posterior desenvolvimento. Quando o anticorpo de escolha é um que bloqueia a ligação de HRG a ErbB3, os anticorpos que o fazem neste teste podem ser identificados.

Para pesquisar anticorpos que se ligam ao epítipo no ErbB3 ligado por um anticorpo de interesse (e.g. os que bloqueiam a ligação do anticorpo 3-8BS a ErbB3) pode fazer-se um teste de bloqueio cruzado, de rotina, tal como o descrito

em *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Ed Harlow and David Lane (1998).

(vii) *Manipulação da função efectora*

Poderá ser desejável modificar o anticorpo da invenção em relação à função efectora, de modo a aumentar a eficácia do anticorpo no tratamento do cancro, por exemplo. Por exemplo, o(s) resíduo de cisteína pode ser introduzido na região Fc, permitindo assim a formação de ligações dissulfureto intercadeia, nesta região. O anticorpo homodimérico assim produzido pode ter uma melhor capacidade de internalização e/ou maior morte celular mediada por complemento e citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC). Veja-se Caron *et al.*. *J Exp Med*. 176:1191-1195 (1992) e Shopes, B. *J. Immunol*. 148:2918-2922 (1992). Os anticorpos homodiméricos com maior actividade antitumoral também podem ser preparados utilizando agentes de reticulação heterobifuncionais, como descrito em Wolff *et al.* *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, um anticorpo pode ser manipulado de modo a ter regiões Fc duplas e pode assim ter lise do complemento e capacidades de ADCC aumentadas. Veja-se, Stevenson *et al.* *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

(viii) *Imunoconjugados*

Também se incluem imunoconjugados compreendendo o anticorpo da invenção conjugado com um agente citotóxico, tal como um agente quimioterapêutico, toxina (por exemplo, uma toxina enzimaticamente activa de origem bacteriana, fúngica, de planta, ou animal, ou seus fragmentos), ou um isótopo radioactivo (isto é, um radioconjugado).

Os agentes quimioterapêuticos úteis na produção destes imunoconjugados foram descritos acima. As toxinas enzimaticamente activas e seus fragmentos que podem ser utilizados incluem a cadeia A de difteria, fragmentos activos não ligantes da toxina de difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, and PAP-S), inibidor de

Momordica charantia, curcina, crotina, inibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Estão disponíveis vários radionuclídeos para a produção de anticorpos anti-ErbB3 radioconjugados. Exemplos incluem ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , e ^{186}Re .

Os conjugados do anticorpo e agente citotóxico são produzidos utilizando uma variedade de agentes de acoplamento de proteína bifuncionais, tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tais como suberato de disuccinimidilo), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoíl)-hexanodiamina), derivados de bis-diazónio (tais como bis-(p-diazónio-benzoíl)etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno), e compostos de flúor bis-activos (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, pode-se preparar uma imunotoxina de ricina como descrito em Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). O ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietilenotriaminapentacético (MX-DTPA) marcado com carbono-14 é um exemplo de agente quelante para a conjugação de radionucleótido com o anticorpo. Veja-se WO94/11026.

O anticorpo pode ser conjugado com um "receptor" (tal como estreptavidina) para utilização no pré-direccionamento para um tumor, em que o conjugado anticorpo-receptor é administrado ao paciente, seguido de remoção do conjugado não ligado da circulação, utilizando um agente de eliminação e em seguida administração de um "ligando" (e.g. avidina) que é conjugado com um agente citotóxico (e.g., um radionuclídeo).

(ix) *Imunolipossomas*

Os anticorpos anti-ErbB3 aqui descritos também podem ser formulados como imunolipossomas. Os lipossomas que contêm o anticorpo são preparados por métodos conhecidos na arte, tal como descrito em Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); e Pat. US N^{os}. 4 485 045 e 4 544 545. Os

lipossomas com tempo de circulação melhorado estão descritos na Patente US N°. 5013556.

Lipossomas particularmente úteis podem ser produzidos pelo método de evaporação de fase inversa com uma composição de lípidos que compreende fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada com PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudidos através de filtros com um tamanho de poro definido, para se obterem lipossomas com o diâmetro desejado. Os fragmentos Fab' do anticorpo da presente invenção podem ser conjugados com os lipossomas, como descrito em Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) através de uma reacção de interpermuta de dissulfureto. Um agente quimioterapêutico (tal como doxorubicina) está opcionalmente contido no lipossoma. Veja-se Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.*, 81(19): 1484 (1989).

(x) *Terapia de prodroga mediada por enzima dependente de anticorpo (ADEPT)*

O anticorpo da presente invenção também pode ser utilizado em ADEPT conjugando o anticorpo com uma enzima activadora de prodroga que converte uma prodroga (e.g. um agente quimioterapêutico de peptidilo, veja-se WO81/01145) numa droga anticancerosa activa. Veja-se, por exemplo, WO88/07378 e patente US N° 4975278.

O componente enzimático do imunoconjugado útil para ADEPT inclui qualquer enzima capaz de actuar numa prodroga de um modo tal que a converte na sua forma citotóxica, mais activa.

As enzimas que são úteis no método incluem, mas não se limitam a fosfatase alcalina útil para converter prodrogas contendo fosfato em drogas livres; arilsulfatase útil para converter prodrogas contendo sulfato em drogas livres; citosina-desaminase útil para converter 5-fluorocitosina não tóxica na droga anticancerosa, 5-fluorouracilo; proteases, tais como protease de *Serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidase e catepsinas (tais como catepsina B e L), que são úteis para converter prodrogas contendo péptidos em drogas livres; D-alanilcarboxipeptidases, úteis para converter prodrogas que contêm substituintes de D-aminoácidos; enzimas

que clivam hidratos de carbono, tais como β -galactosidase e neuraminidase útil para converter prodrogas glicosiladas em drogas livres; β -lactamase útil para converter drogas derivatizadas com β -lactamas em drogas livres e penicilina-amidases, tais como penicilina V-amidase ou penicilina G-amidase, útil para converter drogas derivatizadas nos azotos das suas aminas com grupos fenoxiacetilo ou fenilacetilo, respectivamente, em drogas livres. Alternativamente, os anticorpos com actividade enzimática, também conhecidos na arte como "abzimas", podem ser utilizados para converter as prodrogas em drogas activas livres (veja-se, e.g., Massey. *Nature* 328: 457-458 (1987)). Os conjugados anticorpo-abzima podem ser preparados como aqui descrito para fornecer a abzima a uma população de células de tumor.

As enzimas podem ser ligadas de forma covalente aos anticorpos anti-ErbB3 por técnicas bem conhecidas na arte, tais como a utilização dos reagentes de reticulação heterobifuncionais discutidos acima. Alternativamente, as proteínas de fusão que compreendem pelo menos a região de ligação ao antigénio de um anticorpo da invenção ligado a pelo menos uma porção funcionalmente activa de uma enzima podem ser construídas utilizando técnicas de ADN recombinante bem conhecidas na arte (veja-se e.g., Neuberger *et al.*, *Nature* 312:604-608 (1984)).

(xi) *Fusões de anticorpo-epítipo de ligação ao receptor de salvamento*

Nalgumas concretizações da invenção, poderá ser desejável utilizar um fragmento de anticorpo, em vez de um anticorpo intacto, para aumentar a penetração no tumor, por exemplo. Neste caso, poderá ser desejável modificar o fragmento de anticorpo de modo a aumentar a sua semivida no soro. Isto pode ser conseguido, por exemplo, incorporando um epítipo de ligação ao receptor de salvamento no fragmento de anticorpo, (e.g. por mutação da região adequada no fragmento de anticorpo ou incorporando o epítipo num marcador peptídico que é então fundido ao fragmento de anticorpo em qualquer das extremidades ou no meio, e.g. por síntese de ADN ou péptidos).

Um método sistemático para preparar esta variante de anticorpo com uma semivida *in vivo* aumentada compreende vários passos. O primeiro envolve identificar a sequência e conformação de um epítipo de ligação ao receptor de salvamento de uma região Fc de uma molécula de IgG. Uma vez identificado este epítipo, a sequência do anticorpo de interesse é modificada para incluir a sequência e conformação do epítipo de ligação identificado. Após a sequência ser mutada, a variante do anticorpo é testada para ver se tem uma semivida *in vivo* maior do que a do anticorpo original. Se a variante do anticorpo não tem uma semivida *in vivo* maior aquando do teste, a sua sequência é posteriormente alterada para incluir a sequência e conformação do epítipo de ligação identificado. O anticorpo alterado é testado quanto a uma semivida *in vivo* mais longa e este processo é continuado até se obter uma molécula que exhibe uma semivida *in vivo* mais longa.

O epítipo de ligação ao receptor de salvamento assim incorporado no anticorpo de interesse é qualquer epítipo deste tipo adequado, como definido acima, e a sua natureza dependerá, *e.g.*, do tipo de anticorpo a ser modificado. A transferência é feita de modo que o anticorpo de interesse ainda possui as actividades biológicas aqui descritas.

O epítipo geralmente constitui uma região em que qualquer um ou mais resíduos de aminoácido de uma ou duas laçadas de um domínio Fc são transferidas para uma posição análoga do fragmento de anticorpo. Ainda mais preferencialmente, são transferidos três ou mais resíduos de uma ou duas laçadas do domínio Fc. Ainda mais preferencialmente, o epítipo é retirado do domínio CH₂ da região Fc (*e.g.*, de uma IgG) e transferido para a região CH₁, CH₃ ou V_H, ou mais do que uma destas regiões do anticorpo. Alternativamente, o epítipo é retirado do domínio CH₂ da região Fc e transferido para a região C_L ou região V_L, ou ambas, do fragmento de anticorpo.

O epítipo de ligação ao receptor de salvamento compreende de preferência a sequência (5' para 3') PKNSSMISNTP (SEQ ID NO:1), e opcionalmente compreende ainda uma sequência seleccionada do grupo constituído por HQSLGTQ (SEQ ID NO:2), HQNLSDGK (SEQ ID NO:3), HQNISDGK (SEQ ID NO:4), ou VISSHLGQ (SEQ ID NO:5), em particular quando o fragmento de anticorpo é

um Fab ou F(ab')₂ ou o epítopo de ligação ao receptor de salvamento é um polipéptido contendo a(s) sequência (5' para 3'): HQNLSDGK (SEQ ID NO:3), HQNISDGK (SEQ ID NO:4), ou VISSLGQ (SEQ ID NO:5) e a sequência: PKNSSMISNTP (SEQ ID NO:1).

B: Vectores, células hospedeiras e métodos recombinantes

Contempla-se um ácido nucleico isolado que codifica para um anticorpo como aqui descrito, vectores e células hospedeiras compreendendo o ácido nucleico; e técnicas recombinantes para a produção do anticorpo.

Para a produção recombinante do anticorpo, o ácido nucleico que o codifica é isolado e inserido num vector replicável para posterior clonagem (amplificação do ADN) ou para expressão. O ADN que codifica para o anticorpo monoclonal é facilmente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (e.g. utilizando sondas de oligonucleótido que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam para as cadeias pesada e leve do anticorpo). Estão disponíveis muitos vectores. Os componentes do vector geralmente incluem, mas não se limitam a, um ou mais dos seguintes: uma sequência de sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento potenciador, um promotor e uma sequência de terminação da transcrição.

(i) Componente de sequência de sinal

O anticorpo anti-ErbB3 da presente invenção pode ser produzido de forma recombinante não só directamente, mas também como um polipéptido de fusão com um polipéptido heterólogo, que é de preferência uma sequência de sinal ou outro polipéptido com um local de clivagem específico no terminal N da proteína ou polipéptido maduro. A sequência de sinal heteróloga seleccionada é de preferência uma que é reconhecida e processada (i.e., clivada por uma peptidase de sinal) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procariotas que não reconhecem e processam a sequência de sinal do anticorpo anti-ErbB3 nativo, a sequência de sinal é substituída por uma sequência de sinal procariota seleccionada, por exemplo, de um grupo constituído pelos

líderes de fosfatase alcalina, penicilinase, Ipp, ou enterotoxina II estável ao calor. Para secreção em levedura, a sequência de sinal nativa pode ser substituída por, e.g., o líder de invertase de levedura, líder do factor α de levedura (incluindo líderes do factor- α de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*), ou líder de fosfatase ácida de levedura, líder de glucoamilase de *C. albicans* ou o sinal descrito em WO 90/13646. Na expressão de células de mamífero estão disponíveis as sequências de sinal de mamífero, bem como líderes secretores virais, por exemplo, o sinal gD de herpes simples.

O ADN para esta região precursora é ligado em fase de leitura ao ADN que codifica para o anticorpo anti-ErbB3.

(ii) Componente de origem de replicação

Ambos os vectores, de expressão e clonagem contêm uma sequência de ácido nucleico que permite ao vector replicar-se numa ou mais células hospedeiras seleccionadas. Em geral, nos vectores de clonagem, esta sequência é uma que permite ao vector replicar-se independentemente do ADN cromossómico do hospedeiro e inclui origens de replicação ou sequências de replicação autónoma. Estas sequências são bem conhecidas para uma variedade de bactérias, leveduras e vírus. A origem de replicação do plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas, a origem do plasmídeo 2 μ é adequada para levedura e várias origens virais (SV40, políoma, adenovírus, VSV, ou BPV) são úteis para vectores de clonagem em células de mamífero. Em geral, a origem do componente de replicação não é necessária para vectores de expressão de mamífero (a origem de SV40 pode ser tipicamente utilizada apenas porque contém o promotor precoce).

(iii) Componente de gene de selecção

Os vectores de expressão e clonagem podem conter um gene de selecção, também designado por gene marcador. Os genes de selecção típicos codificam para proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, e.g., ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas; ou (c) fornecem

nutrientes críticos não disponíveis de meios complexos, e.g., o gene que codifica para D-alanina racemase para *Bacilli*.

Um exemplo de um esquema de selecção utiliza uma droga para parar o crescimento de uma célula hospedeira. As células que são transformadas com sucesso com um gene heterólogo produzem uma proteína que confere resistência à droga e assim sobrevivem ao regime de selecção. Exemplos desta selecção dominante utilizam as drogas neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Outro exemplo de marcadores seleccionáveis adequados para células de mamífero são os que permitem a identificação de células competentes para incorporar o ácido nucleico do anticorpo anti-ErbB3, tais como DHFR ou timidina-quinase, metalotioneína-I e -II, de preferência genes de metalotioneína de primata, adenosina-desaminase, ornitina-descarboxilase, etc.

Por exemplo, as células transformadas com o gene de selecção de DHFR são primeiro identificadas por cultura de todos os transformantes num meio de cultura que contém metotrexato (Mtx), um antagonista competitivo de DHFR. Uma célula hospedeira adequada quando se utiliza DHFR do tipo selvagem é a linha celular de ovário de *hamster* chinês (CHO) deficiente em actividade de DHFR.

Alternativamente, as células hospedeiras (em particular hospedeiros do tipo selvagem que contêm DHFR endógeno) transformadas ou co-transformadas com sequências de ADN que codificam para o anticorpo anti-ErbB3, proteína DHFR do tipo selvagem e outro marcador seleccionável, tal como aminoglicósido-3'-fosfotransferase (APH), podem ser seleccionadas por crescimento celular num meio contendo um agente de selecção para o marcador seleccionável, tal como um antibiótico aminoglicosídico, e.g., canamicina, neomicina ou G418. Veja-se patente US N° 4965199.

Um gene de selecção adequado para utilização em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282: 39 [1979]; Kingsman et al., *Gene*, 7: 141 [1979]; ou Tschemper et al., *Gene*, 10: 157

[1980]). O gene *trp1* proporciona um marcador de selecção para uma estirpe mutante de levedura que não possui a capacidade de crescer em triptofano, por exemplo, ATCC N° 44076 ou PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85: 12 [1977]). A presença da lesão *trp1* no genoma da célula hospedeira de levedura proporciona então um meio ambiente eficaz para detectar a transformação por crescimento na ausência de triptofano. De igual modo, as estirpes de levedura deficientes em *Leu2* (ATCC 20622 ou 38626) são complementadas por plasmídeos conhecidos que possuem o gene *Leu2*.

Adicionalmente, os vectores derivados do plasmídeo pKD1 circular de 1,6 μ m podem ser utilizados para transformação de leveduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, foi descrito um sistema de expressão para a produção em grande escala de quimosina de vitela recombinante, para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990). Também foram descritos vectores de expressão de múltiplas cópias, estáveis, para a secreção de albumina de soro humano recombinante, madura, por estirpes industriais de *Kluyveromyces*. Fleer et al., *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991).

(iv) *Componente de promotor*

Os vectores de expressão e clonagem normalmente contêm um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está ligado de forma operacional ao ácido nucleico do anticorpo anti-ErbB3.

Os promotores adequados para utilização com hospedeiros procariotas incluem o promotor *phoA*, os sistemas promotores de β -lactamase e lactose, fosfatase alcalina, um sistema promotor de triptofano (*trp*) e promotores híbridos, tais como o promotor *tac*. No entanto, outros promotores bacterianos conhecidos são úteis. Os promotores para utilização em sistemas bacterianos também irão conter uma sequência de Shine-Dalgarno (S.D.) ligada de forma operacional ao ADN que codifica para o anticorpo anti-ErbB3.

São conhecidas sequências promotoras para eucariotas. Praticamente todos os genes eucariotas têm uma região rica em AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases a montante do

local em que a transcrição é iniciada. Outra sequência encontrada 70 a 80 bases a montante do início da transcrição de muitos genes é uma região CNCAAT, em que N pode ser qualquer nucleótido. Na extremidade 3' da maioria dos genes eucarióticos está uma sequência AATAAA que pode ser o sinal para a adição de uma cauda poliA à extremidade 3' da sequência codificante. Todas estas sequências são inseridas de forma adequada em vectores de expressão eucarióticos.

Exemplos de sequências promotoras adequadas para utilização com hospedeiros de levedura incluem os promotores para 3-fosfoglicerato-quinase ou outras enzimas glicolíticas, tais como enolase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, hexoquinase, piruvato-descarboxilase, fosfofrutoquinase, glucose-6-fosfato-isomerase, 3-fosfoglicerato-mutase, piruvato-quinase, triosefosfato-isomerase, fosfoglucose-isomerase e glucoquinase.

Outros promotores de levedura que são promotores indutíveis com a vantagem adicional da transcrição controlada por condições de crescimento, são as regiões promotoras para álcool desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas degradativas associadas com o metabolismo de azoto, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Vectores e promotores adequados para utilização na expressão de levedura são também descritos em EP 73657. Os potenciadores de levedura também são utilizados com vantagem com promotores de levedura.

A transcrição do anticorpo anti-ErbB3 a partir de vectores em células hospedeiras de mamífero é controlada, por exemplo, por promotores obtidos dos genomas de vírus como o vírus polioma, poxvírus de aves, adenovírus (tal como Adenovírus 2), vírus de papiloma de bovino, vírus de sarcoma de aves, citomegalovírus, um retrovírus, vírus de hepatite B e muito preferencialmente vírus de símio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, e.g., o promotor de actina ou um promotor de imunoglobulina, de promotores de choque térmico, desde que estes promotores sejam compatíveis com os sistemas da célula hospedeira.

Os promotores precoce e tardio do vírus SV40 são obtidos de forma conveniente como um fragmento de restrição de SV40 que também contém a origem de replicação viral de SV40. O promotor precoce imediato do citomegalovírus humano é obtido de forma conveniente como um fragmento de restrição *HindIII*. Um sistema para expressar ADN em hospedeiros mamíferos utilizando o vírus de papiloma de bovino como um vector é descrito na patente US N° 4419446. Uma modificação deste sistema está descrita na patente US N° 4601978. Veja-se também Reyes *et al.*, *Nature*, 297: 598-601 (1982) sobre a expressão de ADNc de interferão- β humano em células de ratinho sob o controlo de um promotor de timidina-quinase do vírus de herpes simples. Alternativamente, pode-se utilizar como promotor a repetição terminal longa do vírus de sarcoma de Rous.

(v) *Componente de elemento potenciador*

A transcrição de um ADN que codifica para o anticorpo anti-ErbB3 da presente invenção por eucariotas superiores é muitas vezes aumentada inserindo uma sequência potenciadora no vector. Muitas sequências potenciadoras são agora conhecidas de genes de mamífero (globina, elastase, albumina, α -fetoproteína e insulina). Tipicamente, no entanto, utilizar-se-á um potenciador de um vírus de célula eucariota. Exemplos incluem o potenciador de SV40 no lado tardio da origem de replicação (pb 100-270), o potenciador do promotor precoce de citomegalovírus, o potenciador de polioma no lado tardio da origem de replicação e potenciadores de adenovírus. Veja-se também Yaniv, *Nature*, 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para activação de promotores eucariotas. O potenciador pode ser organizado por *splicing* no vector, numa posição 5' ou 3' em relação à sequência codificante do anticorpo anti-ErbB3, mas está localizado de preferência num local 5' em relação ao promotor.

(vi) *Componente de terminação da transcrição*

Os vectores de expressão utilizados em células hospedeiras eucariotas (levedura, fungos, insectos, plantas, animais, humanos ou células nucleadas de outros organismos pluricelulares) também irão conter sequências necessárias para a terminação da transcrição e para estabilização do ARNm.

Estas sequências estão normalmente disponíveis das regiões não traduzidas 5' e, ocasionalmente, 3' de ADN ou ADNc eucariótico ou viral. Estas regiões contêm segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do ARNm que codifica para o anticorpo anti-ErbB3. Um componente de terminação da transcrição útil é a região de poliadenilação da hormona de crescimento de bovino. Veja-se W094/11026 e o vector de expressão aí descrito.

(vi) *Seleccção e transformação de células hospedeiras*

As células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão de ADN nos vectores aqui descritos são as células procariotas, de levedura ou eucariotas superiores descritas acima. Os procariotas adequados para este fim incluem eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, Enterobacteriaceae tais como *Escherichia*, e.g., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, e.g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e.g., *Serratia marcescans*, e *Shigella*, bem como Bacilli, tal como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (e.g., *B. licheniformis* 41P descrito em DD 266710 publicado em 12 de Abril de 1989), *Pseudomonas* tais como *P. aeruginosa*, e *Streptomyces*. Um hospedeiro de clonagem de *E. coli* preferido é *E. coli* 294 (ATCC 31.446), embora sejam adequadas outras estirpes tais como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) e *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estes exemplos são ilustrativos e não limitativos.

Além dos procariotas, os micróbios eucariotas, tais como fungos filamentosos ou leveduras, são hospedeiros de clonagem ou expressão para vectores que codificam para o anticorpo anti-ErbB3. A *Saccharomyces cerevisiae*, ou fermento de padeiro comum, é o mais utilizado entre os microorganismos hospedeiros eucariotas inferiores. No entanto, vários outros géneros, espécies e estirpes estão normalmente disponíveis e são úteis aqui, tais como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedeiros *Kluyveromyces*, tais como, e.g., *K. lactis* *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, e *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183070; *Candida*; *Trichoderma*

reesia (EP 244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* e fungos filamentosos tais como, e.g., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolytocladium* e hospedeiros *Aspergillus*, tais como *A. nidulans*.

As células hospedeiras adequadas para a produção de anticorpo anti-ErbB3 glicosilado são derivadas de organismos pluricelulares. Exemplos de células de invertebrados incluem células de plantas e insectos. Foram identificadas várias estirpes e variantes de baculovírus e células hospedeiras de insecto permissivas, correspondentes de hospedeiros como *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) e *Bombyx mori*. Está disponível ao público uma variedade de estirpes virais para transfecção, e.g., a variante L-1 de *Autographa californica* NPV e a estirpe Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, e estes vírus podem ser utilizados como os vírus aqui descritos de acordo com a invenção, em particular para transfecção de células de *Spodoptera frugiperda*.

As culturas de células de plantas de algodão, milho, batata, soja, petúnia, tomate e tabaco podem ser utilizadas como hospedeiros.

No entanto, tem havido um maior interesse em células de vertebrado e a propagação de células de vertebrado em cultura (cultura de tecido) tornou-se um procedimento de rotina. Exemplos de linhas celulares de hospedeiros mamíferos úteis incluem uma linha celular de rim de macaco CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); uma linha de rim embrionário de humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36: 59 [1977]); células de rim de *hamster* bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de *hamster* chinês/-DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216 [1980]); células de Sertoli de ratinho (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 [1980]); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim de canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano

(Hep G2, HB 8065); células de tumor mamário de ratinho (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383: 44-68 [1982]); células MRC 5; células FS4; e uma linha de hepatoma humano (Hep G2).

As células hospedeiras são transformadas com os vectores de expressão ou clonagem acima descritos para o anticorpo anti-ErbB3 e cultivadas em meio nutriente convencional, modificado como adequado para induzir promotores, seleccionar transformantes ou amplificar os genes que codificam para as sequências desejadas.

(viii) Cultura de células hospedeiras

As células hospedeiras utilizadas para produzir o anticorpo anti-ErbB3 da presente invenção podem ser cultivadas numa variedade de meios. Os meios de cultura disponíveis comercialmente tais como F-10 de Ham (Sigma), Meio Mínimo Essencial ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma), meio de Eagle modificado da Dulbecco ((D-MEM), Sigma) são adequados para cultura de células hospedeiras. Adicionalmente, qualquer dos meios descritos, por exemplo, em Ham e Wallace, *Methods in Enzymology*, 58: 44 (1979); Barnes e Sato, *Anal. Biochem.*, 102: 255 (1980); patentes U.S. N^{os} 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; ou 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195 ou patente U.S. Re. N^o 30985 pode ser utilizado como meio de cultura para as células hospedeiras. Qualquer destes meios pode ser suplementado como necessário com hormonas e/ou outros factores de crescimento (tais como insulina, transferrina, ou factor de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio e fosfato), tampões (tais como HEPES), nucleótidos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tais como a droga GENTAMYCINTM), elementos vestigiais (definidos como compostos inorgânicos normalmente presentes em concentrações finais na gama micromolar), e glucose ou uma fonte de energia equivalente. Também se podem incluir quaisquer outros suplementos necessários a concentrações adequadas, que serão conhecidos dos peritos na arte. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e semelhantes, são as previamente utilizadas com a célula hospedeira seleccionada para expressão e serão evidentes para o perito na arte.

(ix) *Purificação do anticorpo anti-ErbB3*

Quando se utilizam técnicas recombinantes o anticorpo pode ser produzido intracelularmente, no espaço periplasmático, ou segregado directamente para o meio. Se o anticorpo é produzido intracelularmente, como um primeiro passo, os restos de partículas, quer de células hospedeiras, quer fragmentos lisados, são removidos, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração. Carter *et al.* *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) descrevem um procedimento para isolar anticorpos que são segregados para o espaço periplasmático de *E. coli*. Resumidamente, a pasta de células é descongelada na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA e fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante cerca de 30 minutos. Os restos celulares podem ser removidos por centrifugação. Quando o anticorpo é segregado para o meio, os sobrenadantes destes sistemas de expressão são, em geral, primeiro concentrados utilizando um filtro de concentração de proteínas disponível comercialmente, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Pode-se incluir um inibidor de protease, tal como PMSF em qualquer dos passos anteriores, para inibir a proteólise e podem-se incluir antibióticos para prevenir o crescimento de contaminantes fortuitos.

A composição de anticorpo preparada a partir das células pode ser purificada utilizando, por exemplo, cromatografia de hidroxilapatite, electroforese em gel, diálise e cromatografia de afinidade, sendo a cromatografia de afinidade a técnica de purificação preferida. A adequabilidade da proteína A como ligando de afinidade depende da espécie e isotipo de qualquer domínio Fc de imunoglobulina que esteja presente no anticorpo. A proteína A pode ser utilizada para purificar anticorpos que se baseiam em cadeias pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ ou $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol Meth* 62:1-13 (1983)). A proteína G é recomendada para todos os isotipos de rato e para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). A matriz à qual o ligando de afinidade está ligado é muitas vezes agarose, mas estão disponíveis outras matrizes. As matrizes mecanicamente estáveis, tais como vidro de poro controlado ou poli(estireno-divinil)benzeno permitem caudais mais rápidos e menores tempos de processamento do que os que são obtidos com agarose. Quando o anticorpo compreende um domínio C_H3, a

resina Bakerbond ABX™resin (J.T. Baker. Phillipsburg, NJ) é útil para purificação. Também estão disponíveis outras técnicas para a purificação de proteínas, tais como fraccionamento numa coluna de troca iónica, precipitação com etanol, HPLC de fase inversa, cromatografia em sílica, cromatografia em Sepharose™ heparina, cromatografia numa resina de troca aniónica ou catiónica (tal como uma coluna de poli(ácido aspártico), cromatofocagem, SDS-PAGE e precipitação com sulfato de amónio, dependendo do anticorpo a ser recuperado.

Após qualquer passo(s) de purificação preliminar, a mistura compreendendo o anticorpo de interesse e contaminantes pode ser submetida a cromatografia de interacção hidrófoba a pH baixo, utilizando um tampão de eluição a um pH entre cerca de 2,4-4,5, de preferência realizadas concentrações de sal baixas (e.g. de cerca de 0-0,25 M de sal).

C. Formulações farmacêuticas

As formulações terapêuticas do anticorpo são preparadas para armazenamento misturando o anticorpo com o grau de pureza desejado, com transportadores, excipientes ou estabilizantes fisiologicamente aceitáveis, opcionais (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edição, Osol, A. Ed. [1980]), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os transportadores, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações utilizadas e incluem tampões, tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilamónio; cloreto de hexametónio; cloreto de benzalcónio, cloreto de benzetónio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquilparabenos, tais como metil- ou propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de baixo peso molecular (inferior a cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacáridos, dissacáridos, e outros hidratos de carbono, incluindo glucose, manose, ou dextrinas; agentes

quelantes, tais como EDTA; glícidos, tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íões formadores de sal, tais como sódio; complexos metálicos (e.g. complexos de Zn-proteína); e/ou tensioactivos não iónicos, tais como TweenTM, PluronicTM ou polietilenoglicol (PEG).

A formulação aqui descrita pode também conter mais do que um composto activo, como necessário para a indicação particular a ser tratada, de preferência os que têm actividades complementares que não se afectam umas às outras de forma adversa. Por exemplo, poderá ser desejável proporcionar também anticorpos que se ligam a EGFR, ErbB2, ErbB4 ou factor endotelial vascular (VEGF) na formulação. Alternativamente, ou em adição, a composição pode compreender um agente quimioterapêutico ou uma citóquina. Estas moléculas estão adequadamente presentes em combinação, em quantidades que são eficazes para os fins pretendidos.

Os ingredientes activos também podem ser incluídos em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou de gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de fornecimento de drogas coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Estas técnicas estão descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Oslo, A. Ed. (1980).

As formulações a ser utilizadas para administração *in vivo* deverão ser estéreis. Isto é facilmente conseguido por filtração através de membranas de filtração estéreis.

Podem-se preparar preparações de libertação controlada. Exemplos adequados de preparações de libertação controlada incluem matrizes semi-permeáveis de polímeros hidrófobos sólidos contendo o anticorpo, as quais são na forma de artigos moldados, e.g., películas ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de libertação controlada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) ou poli(álcool vinílico)), poliláctidos (Patente US N° 3773919), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ -etil-L-glutamato,

copolímeros de etileno-acetato de vinilo não degradáveis, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis, tais como Lupron Depot™ (microesferas injectáveis compostas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Apesar dos polímeros, tais como etileno-acetato de vinilo e ácido láctico-ácido glicólico, permitirem a libertação de moléculas durante mais de 100 dias, alguns hidrogéis libertam proteínas durante períodos de tempo menores. Quando os anticorpos encapsulados permanecem no corpo durante um tempo prolongado, eles podem-se desnaturar ou agregar, como resultado da exposição à humidade a 37°C, resultando numa perda de actividade biológica e possíveis alterações na imunogenicidade. Podem-se delinear estratégias racionais para a estabilização, dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, quando se verifica que o mecanismo de agregação é a formação de ligações S-S intermoleculares através da interpermuta tio-dissulfureto, a estabilização pode ser conseguida modificando resíduos de sulfidrilo, liofilizando a partir de soluções ácidas, controlando o teor de humidade, utilizando aditivos adequados, e desenvolvendo composições de matriz de polímeros específicas.

D. Utilizações não terapêuticas para o anticorpo

Os anticorpos da invenção podem ser utilizados como agentes de purificação por afinidade. Neste processo, os anticorpos estão imobilizados numa fase sólida, tal como uma resina de Sephadex ou papel de filtro, utilizando métodos bem conhecidos na arte. O anticorpo imobilizado é contactado com uma amostra contendo a proteína ErbB3 (ou um seu fragmento) a ser purificado e em seguida o suporte é lavado com um solvente adequado que irá remover substancialmente todo o material na amostra, excepto a proteína ErbB3 que está ligada ao anticorpo imobilizado. Por fim, o suporte é lavado com outro solvente adequado, tal como tampão glicina, pH 5,0, que irá libertar a proteína ErbB3 do anticorpo.

Os anticorpos anti-ErbB3 podem também ser úteis em testes de diagnóstico para a proteína ErbB3, e.g., detectando a sua expressão em células, tecidos específicos ou soro. Assim, os

anticorpos podem ser utilizados no diagnóstico de malignidades humanas (veja-se, por exemplo, patente US 5183884).

Para aplicações de diagnóstico, o anticorpo será tipicamente marcado com uma porção detectável. Estão disponíveis vários marcadores que podem ser geralmente agrupados nas seguintes categorias:

(a) Radioisótopos, tais como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H e ^{131}I . O anticorpo pode ser marcado com o radioisótopo utilizando as técnicas descritas em *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 e 2. Coligen et al., Ed., Wiley-Interscience. Nova Iorque, Nova Iorque, Pubs., (1991) por exemplo e a radioactividade pode ser medida utilizando contagem de cintilação.

(b) Estão disponíveis marcadores fluorescentes, tais como quelatos de terrosos raros (quelatos de európio) ou fluoresceína e seus derivados, rodamina e seus derivados, dansilo, Lissamina, ficoeritrina e Texas Red. Os marcadores fluorescentes podem ser conjugados com o anticorpo utilizando as técnicas descritas em *Current Protocols in Immunology*, supra, por exemplo. A fluorescência pode ser quantificada utilizando um fluorímetro.

(c) Estão disponíveis vários marcadores enzima-substrato e a patente US N° 4275149 proporciona uma revisão de alguns destes. A enzima geralmente catalisa uma alteração química do substrato cromogénico que pode ser medida utilizando várias técnicas. Por exemplo, a enzima pode catalisar uma alteração de cor num substrato, que pode ser medida espectrofotometricamente. Alternativamente, a enzima pode alterar a fluorescência ou quimioluminescência do substrato. As técnicas para quantificar uma alteração na fluorescência estão descritas acima. O substrato quimioluminescente torna-se electronicamente excitado por uma reacção química e pode então emitir luz que pode ser medida (utilizando um quimioluminómetro, por exemplo) ou fornece energia a um aceitador fluorescente. Exemplos de marcadores enzimáticos incluem luciferases (e.g. luciferase de pirilampo e luciferase bacteriana; patente US N° 4-737.456); luciferina, 2,3-di-hidroftalazinodionas, malato-desidrogenase, urease,

peroxidase, tal como peroxidase de rábano (HRPO), fosfatase alcalina, β -galactosidase, glucoamilase, lisozima, sacárido-oxidases (e.g. glucose-oxidase, galactose-oxidase e glucose-6-fosfato-desidrogenase), oxidases heterocíclicas (tal como uricase e xantina-oxidase), lactoperoxidase, microperoxidase e semelhantes). As técnicas para conjugar enzimas a anticorpos estão descritas em O'Sullivan *et al.*, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym* (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, Nova Iorque, 73: 147-166 (1981).

Exemplos de combinações de enzima-substrato incluem, por exemplo:

- (i) peroxidase de rábano (HRPO) com peroxidase de hidrogénio como substrato, em que a peroxidase de hidrogénio oxida um precursor corante (e.g. ortofenilenodiamina (OPD) ou cloridrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB));
- (ii) fosfatase alcalina (AP) com para-nitrofenilfosfato como substrato cromogénico e
- (iii) β -D-galactosidase (β -D-Gal) com um substrato cromogénico (e.g. p-nitrofenil- β -D-galactosidase) ou substrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidase.

Estão disponíveis para os peritos na arte várias outras combinações enzima-substrato. Para uma revisão geral destas, vejam-se as patentes US N^{os} 4275149 e 4318980.

Por vezes, o marcador é indirectamente conjugado com o anticorpo. O perito na arte conhece várias técnicas para obter isto. Por exemplo, o anticorpo pode ser conjugado com biotina e qualquer um das três grandes categorias de marcadores mencionada acima pode ser conjugado com avidina ou *vice-versa*. A biotina liga-se selectivamente a avidina e assim o marcador pode ser conjugado com o anticorpo deste modo indirecto. Alternativamente, para se obter a conjugação indirecta do marcador com o anticorpo, o anticorpo é conjugado com um hapteno pequeno (e.g. digoxina) e um dos diferentes tipos de marcadores mencionados acima é conjugado com um anticorpo anti-hapteno (e.g. anticorpo anti-digoxina). Assim, obtém-se a conjugação indirecta do marcador com o anticorpo.

Não é necessário que o anticorpo anti-ErbB3 seja marcado e a sua presença pode ser detectada utilizando um anticorpo marcado que se liga ao anticorpo ErbB3.

Os anticorpos da presente invenção podem ser utilizados em qualquer método de teste conhecido, tal como testes de ligação competitiva, testes sanduíche directos e indirectos e testes de imunoprecipitação. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

Os testes de ligação competitiva baseiam-se na capacidade de um padrão marcado competir com o analito da amostra de teste para a ligação com uma quantidade limitada de anticorpo. A quantidade de proteína ErbB3 na amostra de teste é inversamente proporcional à quantidade de padrão que fica ligada aos anticorpos. Para facilitar a determinação da quantidade de padrão que fica ligada, os anticorpos geralmente são insolubilizados antes ou após a competição, de modo que o padrão e o analito que estão ligados aos anticorpos podem ser convenientemente separados do padrão e analito que permanecem não ligados.

Os testes sanduíche envolvem a utilização de dois anticorpos, cada um capaz de se ligar a uma porção imunogénica ou epítopo diferente da proteína a ser detectada. Num teste sanduíche, o analito de amostra de teste é ligado por um primeiro anticorpo que está imobilizado num suporte sólido e em seguida um segundo anticorpo liga-se ao analito, formando assim um complexo de três partes, insolúvel. Veja-se, e.g. patente U.S. N° 4376110. O segundo anticorpo pode ser ele próprio marcado com uma porção detectável (teste sanduíche directo) ou pode ser medido utilizando um anticorpo anti-imunoglobulina que é marcado com uma porção detectável (efeito sanduíche indirecto). Por exemplo, um tipo de teste sanduíche é um teste ELISA, caso em que a porção detectável é uma enzima.

Para imuno-histoquímica, a amostra de tumor pode ser fresca ou congelada, ou pode ser embebida em parafina e fixada com um conservante, tal como formalina, por exemplo.

Os anticorpos podem também ser utilizados para testes de diagnóstico *in vivo*. Em geral, o anticorpo é marcado com um radionuclídeo (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P ou ^{35}S) de modo que o tumor pode ser localizado utilizando imunocintigrafia.

E. Kits de diagnóstico

Para conveniência, o anticorpo da presente invenção pode ser proporcionado num kit, *i.e.*, uma combinação de reagentes embalados, em quantidades pré-determinadas com instruções para realizar o teste de diagnóstico. No caso do anticorpo ser marcado com uma enzima, o kit irá incluir substratos e cofactores requeridos pela enzima (*e.g.* um precursor de substrato que proporciona o cromóforo ou fluoróforo detectável). Além disso, podem-se incluir outros aditivos, tais como conservantes, tampões (*e.g.* um tampão de bloqueio ou um tampão de lise) e semelhantes. As quantidades relativas dos vários reagentes podem ser variadas amplamente para proporcionar concentrações em solução dos reagentes que otimizam substancialmente a sensibilidade do teste. Em particular, os reagentes podem ser proporcionados como pós secos, normalmente liofilizados, incluindo excipientes que por dissolução irão proporcionar uma solução de reagente com a concentração adequada.

F. Utilizações terapêuticas para o anticorpo

É contemplado que o anticorpo anti-ErbB3 da presente invenção possa ser utilizado para tratar condições em que ocorre uma activação excessiva do complexo Erb2-erbB3, em particular quando essa activação é mediada por um polipéptido heregulina, vários tumores, *e.g.*, cancro. Exemplos de condições ou distúrbios a ser tratados com o anticorpo anti-ErbB3 incluem tumores benignos ou malignos (*e.g.*, carcinomas renal, do fígado, rim, bexiga, mama, gástrico, ovárico, colorrectal, da próstata, pancreático, do pulmão, vulvar, da tiróide, hepático; sarcomas; glioblastomas; e vários tumores da cabeça e pescoço); leucemias e malignidades linfóides; outros distúrbios, tais como distúrbio neuronal, glial, de astrócitos, hipotalâmico e outros glandular, macrofágico,

epitelial, estromal e blastocélico; e distúrbios inflamatórios, angiogénicos e imunológicos.

Os anticorpos da presente invenção são administrados a um mamífero, de preferência um humano, de acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa como um bólus, ou por infusão contínua durante um período de tempo, ou pelas vias intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutânea, intra-articular, intra-sinovial, intratecal, oral, tópica ou por inalação. É preferida a administração intravenosa do anticorpo.

Podem-se combinar outros regimes terapêuticos com a administração dos anticorpos anti-ErbB3 da presente invenção. Por exemplo, o paciente a ser tratado com os anticorpos aqui descritos pode também receber terapia de radiação. Alternativamente, ou em adição, pode-se administrar um agente quimioterapêutico ao paciente. A preparação e esquemas de dosagem para estes agentes quimioterapêuticos podem ser utilizados de acordo com as instruções do fabricante, ou como determinado empiricamente pelo perito na arte. A preparação e esquemas de dosagem para esta quimioterapia também estão descritos em *Chemotherapy Service Ed.*, M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). O agente quimioterapêutico pode preceder, ou suceder à administração do anticorpo.

Poderá ser desejável administrar também anticorpos contra outros antigénios associados a tumores, tais como anticorpos que se ligam a EGFR, ErbB2, ErbB4, ou factor endotelial vascular (VEGF). Dois ou mais anticorpos anti-ErbB3 podem ser co-administrados ao paciente. Alternativamente, ou em adição, pode-se administrar uma ou mais citóquinas ao paciente.

Para a prevenção ou tratamento de doenças, a dosagem adequada de anticorpo dependerá do tipo de doença a ser tratada, como definido acima, da gravidade e evolução da doença, do facto de o anticorpo ser administrado para fins preventivos ou terapêuticos, da terapia anterior, do historial clínico do paciente e da resposta ao anticorpo e do critério do médico assistente. O anticorpo é adequadamente administrado ao paciente de uma só vez, ou ao longo de uma série de tratamentos.

Dependendo do tipo e gravidade da doença, cerca de 1 µg/kg a 15 mg/kg (e.g. 0,1-20 mg/kg) de anticorpo é uma dosagem candidata inicial para administração ao paciente, quer seja, por exemplo, por uma ou mais administrações separadas, ou por infusão contínua. Uma dose diária típica pode variar entre cerca de 1 µg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos factores acima mencionados. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é mantido até ocorrer uma supressão desejada dos sintomas da doença. No entanto, poderão ser úteis outros regimes de dosagem. O progresso desta terapia é facilmente monitorizado por técnicas e testes convencionais.

G. Artigos de fabrico

É descrito um artigo de fabrico contendo materiais úteis para o tratamento dos distúrbios descritos acima. O artigo de fabrico compreende um recipiente e um rótulo. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais, tais como vidro ou plástico. O recipiente ou tratamento da condição e pode ter uma porta de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser um saco de solução intravenosa, ou um frasco com uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). O agente activo na composição é o anticorpo anti-ErbB3. O rótulo no, ou associado com o recipiente indica que a composição é utilizada para tratar a condição de escolha. O artigo de fabrico pode ainda compreender um segundo recipiente compreendendo um tampão farmacologicamente aceitável, tal como solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Pode ainda incluir outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do utilizador, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e folhetos informativos com instruções de utilização.

H. Depósito de materiais

A linha celular de hibridoma seguinte foi depositada na American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, EUA (ATCC):

Designação do hibridoma/anticorpo	Nº da ATCC	Data de depósito
8B8	HB-12070	22 de Março de 1996

Este depósito foi feito sob as condições do tratado de Budapeste sobre o reconhecimento Internacional do depósito de microorganismos para efeitos do procedimento em matéria de patentes e regulamentos do mesmo (tratado de Budapeste).

Os exemplos seguintes são dados a título ilustrativo e não limitativo.

EXEMPLO

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-ErbB3

Este exemplo descreve a produção dos anticorpos anti-ErbB3 com as características aqui descritas.

Materiais e Métodos

Linhas celulares. A linha celular de leucemia mielóide humana K562 (que não possui proteína-tirosina-quinase receptora da subfamília de classe 1, tal como determinado por transferência de Northern) e a linha celular de carcinoma ovárico humano Caov3 foram obtidas da American Type Culture Collection (Rockville, MD). Ambas foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal de bovino a 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e HEPES 10 mM ("meio de crescimento").

Transfecção estável de células K562. A linha celular K562 foi transfectada e seleccionaram-se os clones que expressam ErbB3. Em resumo, subclonou-se ADNc de *erbB3* no vector de expressão de células de mamífero pcDNA-3 (Invitrogen) e introduziu-se em células K562 por electroporação (1180 mF. 350 V). As células transfectadas foram cultivadas em meio de crescimento contendo G418 0,8 mg/ml. Os clones resistentes foram obtidos por diluição limitante e testados quanto a expressão de ErbB3 por transferência de Western e testes de ligação a heregulina (HRG). O clone que expressa ErbB3 4E9H3 foi utilizado nas experiências descritas nesta descrição.

Verificou-se que a estimulação com éster de forbol aumentava significativamente a expressão de ErbB3 nos transfectantes de K562. Assim, as células 4E9H3 foram colocadas em meio de crescimento contendo acetato de forbol-12-miristato 10 ng/ml (PMA) durante a noite, antes de utilização nos vários testes descritos a seguir.

Anticorpos. Produziram-se anticorpos monoclonais específicos para a proteína ErbB3, contra um fragmento recombinante do receptor, correspondendo ao seu domínio extracelular (ECD) fundido no seu terminal amino ao epítipo de glicoproteína D (gpD) do vírus de herpes simples tipo 1 (HSV1) para o anticorpo monoclonal 5B6. A sequência codificante para a sequência de sinal de ErbB3 foi substituída com uma sequência que codifica para os aminoácidos 1-53 do polipéptido gD. Os aminoácidos 1-25 codificam para a sequência de sinal de gD, enquanto que os aminoácidos 26-53 contêm um epítipo para o anticorpo monoclonal 5B6. Veja-se W095/14776. A construção resultante, gD.Erb3.ECD foi purificada utilizando uma coluna de afinidade de anticorpo anti-gD. As imunizações foram realizadas como se segue. Injectaram-se inicialmente ratinhos Balb/c fêmea (Charles River) na almofada da pata com 5 µg de gD.ErbB3.ECD em 100 µl de adjuvante de RIBI™ (Ribi ImmunochemREsearch, Inc. Hamilton, MT). Os animais receberam um reforço 2 vezes com 5 µg de gD.ErbB3.ECD na sua almofada da pata, a cada duas semanas seguido de uma injeção final na almofada da pata de 5 µg de gD.ErbB3.ECD. Três dias após a última imunização, removeram-se os nódulos linfáticos popliteais e preparou-se uma suspensão de células individuais para fusão de PEG.

Os anticorpos monoclonais foram purificados e testados por ELISA imobilizada e em fase de solução, para reactividade cruzada com ErbB2 e ErbB4. Para o ELISA imobilizado utilizou-se 1 µg/ml de ErbB2.ECD, gD.ErbB3.ECD ou gD.ErbB4.ECD para revestir uma placa de microtítulo de 96 poços durante a noite. Adicionou-se um mAc anti-ErbB3 a 1 µg/ml e incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente (TA), lavou-se e seguiu-se IgG de cabra anti-ratinho (car) conjugada com HRP0. O ELISA foi desenvolvido e lido a 490 nm. Para o ELISA em fase de solução utilizou-se 1 µg/ml de IgG car (específica de Fc) para revestir uma placa de microtítulo de 96 poços durante a

noite. Adicionou-se um mAc anti-ErbB3 a 1 µg/ml e incubou-se durante 1 hora à TA, lavou-se e seguiu-se por ErbB2.ECD, gD.ErbB3 ou gD.ErbB4.ECD biotinilado. Esta reacção foi incubada durante 1 hora à TA; lavou-se e seguiu-se por HRPO estreptavidina. A ELISA foi desenvolvida e lida a 490 nm. Neste teste, nenhum dos anticorpos anti-ErbB3 teve reacção cruzada com ErbB2 ou ErbB4.

Os fragmentos Fab do anticorpo 3-8D6 foram produzidos por digestão com papaína. Os fragmentos IgG e Fc não digeridos foram removidos por cromatografia de afinidade de proteína A seguido de cromatografia de filtração em gel. Nenhuma IgG era detectável no conjunto de Fab por SDS PAGE e por uma transferência de Western sondada com um anticorpo específico para Fc.

Testes de ligação a HRG. Todas as experiências de ligação a HRG foram realizadas utilizando o domínio tipo EGF da isoforma β1, i.e. HRG β1₁₇₇₋₂₄₄ (Sliwkowski *et al.*, *J. Biol Chem.* 269: 14661-5 (1994)). O painel de anticorpos ErbB3 foi pesquisado quanto a um efeito na ligação de HRG incubando $5,0 \times 10^4$ células 4E9H3 com 100 pM de ¹²⁵I-HRG, durante a noite, a 0°C, na ausência (controlo) ou presença de 100 nM de anticorpo anti-ErbB3. Utilizaram-se IgG irrelevantes como controlos negativos. As células foram recolhidas e rapidamente lavadas com tampão de teste arrefecido em gelo (meio RPMI contendo HEPES 10 mM, pH = 7,2) num dispositivo de filtração de 96 poços (Millipore). Os filtros foram então removidos e contados.

Para as experiências de dose-resposta de anticorpo, as células 4E9H3 foram incubadas com 100 pM de ¹²⁵I-HRG na presença de concentrações crescentes de anticorpo. As medições de afinidade de HRG foram determinadas na ausência (controlo) ou presença ou de 100 nM de anticorpo, ou fragmento Fab. Estas experiências foram realizadas num formato de inibição competitiva com quantidades crescentes de HRG não marcado e uma concentração fixa (35 pM) de ¹²⁵I-HRG. Para a experiência de controlo (sem anticorpo) utilizaram-se 1×10^5 células 4E9H3 para cada amostra. Devido às limitações na gama dinâmica do teste, o número de células 4E9H3 utilizadas para ligação na

presença quer de anticorpo, quer de Fab foi reduzido para $2,5 \times 10^4$ células por amostra.

Redução de anticorpos de fosforilação estimulada por HRG. As células Caov3 que expressam naturalmente ErbB2 e ErbB3 foram pré-incubadas com 250 nM de anticorpo anti-ErbB3 3-8D6, fragmentos Fab deste anticorpo, ou tampão (controlo), durante 60 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo anti-ErbB2, 2C4 (Fendly et al., *Cancer Res.*, 50:1550-1558 (1990)) que se verificou previamente que bloqueia a fosforilação de ErbB2 estimulada por HRG foi incluído como um controlo positivo. As células foram então estimuladas com HRG a uma concentração final de 10 nM durante 8 minutos à temperatura ambiente, ou deixadas não estimuladas. A reacção foi parada removendo os sobrenadantes e dissolvendo as células em tampão de amostra de SDS. Os lisados foram então corridos em SDS-PAGE. As transferências de Western dos geles foram sondadas com anti-fosfotirosina conjugada com peroxidase de rábano (Transduction Labs) e as transferências foram visualizadas utilizando um substrato quimioluminescente (Amersham). As transferências foram pesquisadas com um densitómetro de varrimento de reflectância, como descrito em Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992).

Redução do anticorpo da formação do complexo de proteína ErbB2-ErbB3. As células Caov3 foram pré-incubadas com tampão (controlo), anticorpo anti-ErbB3 3-8D6 250 nM ou fragmentos Fab deste anticorpo ou o anticorpo anti-ErbB2 (2C4) durante 60 minutos à temperatura ambiente, em seguida foram tratadas com HRG 10 nM ou tampão de controlo durante 10 minutos. As células foram lisadas em Tris 25 mM, pH = 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100™ a 1,0%, CHAPS a 1,0%, glicerol a 10% v/v, contendo PMSF 0,2 mM, aprotinina 50 mTU/mL, e leupeptina 10 mM ("tampão de lise"), e os lisados brutos foram centrifugados brevemente para remover o material insolúvel. Os sobrenadantes foram incubados com 3E8, um anticorpo monoclonal específico para ErbB2 (Fendly et al., *Cancer Res.*, 50:1550-1558 (1990)), acoplado de forma covalente a um suporte insolúvel (Affi Prep-10™, Bio-Rad). A incubação foi realizada durante a noite a 4°C. Os imunoprecipitados foram lavados duas vezes com tampão de lise arrefecido em gelo, ressuspensos num volume mínimo de tampão de amostra de

SDS e corridos em SDS-PAGE. As transferências de Western dos géis foram então sondadas com um anti-ErbB3 policlonal (Santa Cruz, Biotech). As transferências foram pesquisadas com um densitómetro de varrimento de reflectância, como descrito em Holmes *et al.*, *Science*. 256:1205-1210 (1992). Após visualização com o substrato quimioluminescente ECL, as transferências foram removidas e novamente sondadas com um anti-ErbB2 policlonal (Santa Cruz Biotech). Um gráfico em duplicado sondado com anti-ErbB2 mostrou que quantidades iguais de ErbB2 foram imunoprecipitadas a partir de cada amostra.

Resultados

Um painel de anticorpos monoclonais dirigidos contra o domínio extracelular de ErbB3 foi avaliado quanto à sua capacidade de afectar a ligação de HRG a ErbB3. A pesquisa inicial foi realizada incubando cada um dos anticorpos purificados a uma concentração final de 100 nM com células 4E9H3 na presença de ^{125}I -HRG. As células 4E9H3 são transfectantes de ErbB3 da linha celular de leucemia mielóide humana K562. A linha celular K562 não expressa receptores de ErbB endógenos ou HRG. Assim, a ligação de heregulina a células 4E9H3 ocorre exclusivamente através de ErbB3. Após incubação das amostras durante a noite em gelo, mediram-se as contagens associadas a células. Como se pode ver na Figura 1, dois dos anticorpos monoclonais anti-ErbB3 (2F9 e 3E9) reduziram a quantidade de ^{125}I -HRG ligado a células 4E9H3 em relação ao controlo (sem anticorpo). No entanto, vários outros aumentaram significativamente a ligação do ligando. Estes resultados sugeriram que estes anticorpos anti-ErbB3 eram capazes de aumentar a afinidade para a ligação de HRG e/ou aumentar a disponibilidade de locais de ligação a HRG. Para melhor caracterizar a influência destes anticorpos na ligação de HRG a ErbB3, realizaram-se experiências de dose-resposta utilizando o anticorpo 3-8D6 que aumentou a ligação de HRG. As células 4E9H3 foram incubadas com 100 pM de ^{125}I -HRG na presença de concentrações crescentes do anticorpo 3-8D6. As contagens associadas a células foram então medidas após uma incubação durante a noite em gelo. Os resultados são apresentados na Fig. 2 como gráficos de contagens associadas a células versus concentrações de anticorpo. Há uma correlação

entre a ligação de HRG aumentada e a concentração de anticorpo crescente. A ligação de heregulina atingiu a saturação entre 10 e 100 nM de IgG. O valor de EC_{50} para o anticorpo 3-8D6 era de 722 pM. Não se observou nenhum decréscimo nas curvas de dose-resposta a concentrações de anticorpo elevadas, para nenhum dos anticorpos.

A análise de Scatchard da ligação de HRG foi determinada na presença destes anticorpos e os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1

Conjunto de dados	K_d	Locais/Célula
Controlo	$1,2 \times 10^{-9}$	$3,6 \times 10^5$
MAC 3-8D6	$2,1 \times 10^{-10}$	$2,4 \times 10^5$
FAb 3-8D6	$2,8 \times 10^{-10}$	$2,9 \times 10^5$

Na ausência do anticorpo, mediu-se uma K_d de 1200 pM para a ligação de HRG a ErbB3, o que está de acordo com uma medição de afinidade previamente medida da ligação de HRG a ErbB3. O número de locais de ligação por célula foi determinado como sendo de 36 000. Na presença do anticorpo 3-8D6, a constante de ligação medida para a ligação de HRG é significativamente aumentada para 210 pM. No entanto, o número de locais de ligação a HRG não aumenta na presença de 3-8D6.

Para determinar se o aumento na afinidade de ligação do ligando ErbB3 era dependente do facto de o anticorpo ser bivalente, fizeram-se experiências de ligação de HRG na presença de 100 nM de um fragmento Fab, preparado por digestão com papaína do anticorpo 3-8D6. Os fragmentos Fab utilizados para estas experiências foram purificados por cromatografia de afinidade de proteína A e por cromatografia de filtração em gel. Não foi detectada nenhuma IgG intacta nesta preparação purificada por SDS-PAGE. Como se pode ver na Figura 3, a ligação de HRG na presença do anticorpo intacto ou o Fab resultante são praticamente idênticos. A análise de Scatchard destes dados originou uma constante de dissociação para a ligação de HRG na presença de Fab de 280 pM e o número de receptores por célula determinado a partir desta experiência também era essencialmente o mesmo que o do controlo. Estes dados são consistentes com os apresentados na Figura 2, em que

as curvas de dose-resposta com os anticorpos intactos apresentavam um patamar em vez de uma curva em forma de sino a concentração de anticorpo mais elevada, quando a ligação de anticorpo univalente pode estar a ocorrer. Sem pretender estar ligado a uma teoria particular, estes dados sugerem que a alteração na ligação de HRG observada na presença destes anticorpos não requer um anticorpo bivalente.

O efeito do anticorpo 3-8D6 num teste de fosforilação de tirosina do receptor utilizando a linha celular de tumor de ovários Caov3 que co-expressa ErbB2 e ErbB3 foi analisado a seguir. As células foram estimuladas com HRG 10 nM após uma pré-incubação de 60 minutos, quer com anticorpo 3-8D6 (a 250 nM) quer tampão (controlo). Os lisados de células totais foram analisados numa transferência de Western analisada com anti-fosfotirosina. O tratamento com HRG não estimulou a fosforilação em células 4E9H3. O tratamento de células 4E9H3 com o anticorpo 3.8D6 não induziu a fosforilação de ErbB3 por si próprio, nem teve nenhum efeito na fosforilação de tirosina em células Caov3. Detectou-se um sinal de fosforilação de tirosina acentuado numa proteína com um peso molecular de ~180 kDa após estimulação com HRG. O tratamento de células Caov3 com 2C4, um anticorpo específico para ErbB2 conseguiu bloquear o sinal de fosforilação de tirosina mediado por HRG. Quando as células foram tratadas com o anticorpo anti-ErbB3 3-8D6 antes da estimulação com HRG, a fosforilação de tirosina também diminuiu. Por análise densitométrica das transferências anti-fosfotirosina de lisados de células totais, observou-se que o 3-8D6 inibia o sinal de fosfotirosina a 180-185 kDa em cerca de 80% (gama de 76-84%). Para este sinal contribuem os resíduos de fosfato de tirosina quer em ErbB3, quer ErbB2. O tratamento de células Caov3 com os fragmentos Fab preparados a partir do anticorpo 3-8D6 também reduziu a fosforilação estimulada por HRG da banda de 180 kDa em relação ao controlo. No entanto, a actividade inibitória de Fab era ligeiramente menos potente do que a do anticorpo intacto.

O aumento na afinidade do receptor, mediado por anticorpo 3-8D6 em células que expressam ErbB3 isolado é análogo ao aumento na afinidade associada com a co-expressão de ErbB2 com ErbB3. Além disso, este anticorpo bloqueia a actividade de quinase de ErbB2 estimulada por HRG em células que expressam

ambos os receptores. Para determinar se o anticorpo anti-ErbB3 compete directamente com ErbB2 para a ligação a ErbB3, realizaram-se uma série de experiências de co-imunoprecipitação utilizando células Caov3. As células foram pré-incubadas quer com anticorpo, quer tampão (controlo) e em seguida tratadas com HRG 10 nM durante 10 minutos. Os lisados das células foram então imunoprecipitados com um anticorpo monoclonal contra ErbB2. Os imunoprecipitados foram então analisados por transferência de Western quanto à presença de ErbB3. Os resultados destas experiências indicaram que o ErbB3 estava presente no imunoprecipitado de ErbB2 do lisado celular estimulado com HRG, mas não no imunoprecipitado do lisado não estimulado. Estes dados sugerem que o HRG dirige a formação de um complexo ErbB2-ErbB3 em células Caov3. O ErbB3 não era detectável no imunoprecipitado da amostra tratada com o anticorpo monoclonal anti-ErbB2, 2C4. Observou-se uma diminuição significativa no sinal de ErbB3 quando as células foram pré-incubadas com o anticorpo 3-8D6, ou o seu Fab resultante, antes da estimulação com HRG. Estes dados indicam que o anticorpo 3-8D6 inibe a formação de um complexo ErbB2-ErbB3 após tratamento com HRG. A densitometria de varrimento das transferências de Western de anti-ErbB3 de imunoprecipitados anti-ErbB2 revelou que o sinal anti-ErbB3 (que indica o número de complexos ErbB2-ErbB3 presentes) também é diminuído por 3-8D6 em cerca de 80% (gama 71,90%). Quando as transferências em duplicado foram sondadas com anti-ErbB2, estavam presentes quantidades equivalentes de ErbB2 em todas as colunas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

- (i) REQUERENTE: Genentech, Inc.
- (ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Anticorpos de ErbB3
- (iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 5
- (iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:
 - (A) DESTINATÁRIO: Genentech, Inc.
 - (B) RUA: 460 Point San Bruno Blvd
 - (C) CIDADE: South San Francisco
 - (D) ESTADO: California
 - (E) PAÍS: EUA
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 94080

- (v) FORMATO LEGÍVEL EM COMPUTADOR:
 (A) TIPO DE MEIO: disquete de 3,5 pol, 1,44 Mb
 (B) COMPUTADOR: Compatível com PC IBM
 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 (D) *SOFTWARE*: WinPatin (Genentech)
- (vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:
 (A) NÚMERO DE PEDIDO:
 (B) DATA DE APRESENTAÇÃO:
 (C) CLASSIFICAÇÃO:
- (viii) INFORMAÇÃO SOBRE REPRESENTANTE/AGENTE:
 (A) NOME: Lee, Wendy M.
 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 40,378
 (C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/PROCESSO: P1003PCT
- (ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:
 (A) TELEFONE: 415/225-1994
 (B) TELEFAX: 415/952-9881
 (C) TELEX: 910/371-7168

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 (A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos
 (B) TIPO: Aminoácido
 (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

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

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 (A) COMPRIMENTO: 7 aminoácidos
 (B) TIPO: Aminoácido
 (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

His Gln Ser Leu Gly Thr Gln
1 5 7

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 (A) COMPRIMENTO: 8 aminoácidos
 (B) TIPO: Aminoácido
 (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys
1 5 8

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo que se liga à proteína ErbB3 e
 - (i) reduz a formação induzida por heregulina de um complexo de proteína ErbB2-ErbB3 numa célula que expressa ErbB2 e ErbB3 e
 - (ii) reduz a activação de ErbB2 induzida por heregulina numa célula que expressa ErbB2 e ErbB3.
2. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1 que também aumenta a afinidade de ligação da heregulina relativamente à proteína ErbB3.
3. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2 que é um anticorpo monoclonal.
4. Anticorpo de acordo com a reivindicação 3 que é humanizado.
5. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, que é humano.
6. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 que é um fragmento de anticorpo.
7. Fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 6 que é um Fab.
8. Anticorpo que se liga ao epítopo ligado pelo anticorpo 8B8 que se pode obter a partir da linha celular de hibridoma ATCC N° HB-12070.
9. Anticorpo de acordo com a reivindicação 8 que se pode obter a partir da linha celular de hibridoma ATCC N° HB-12070.
10. Anticorpo que tem as regiões determinantes de complementaridade do anticorpo 8B8 que se pode obter a partir da linha celular de hibridoma ATCC N° HB-12070.
11. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 que é marcado.

12. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11 que está imobilizado numa fase sólida.

13. Composição compreendendo o anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e um transportador farmacologicamente aceitável.

14. Linha celular que produz o anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

15. Linha celular de hibridoma que produz o anticorpo 8B8 (ATCC N° HB-12070).

16. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 para utilização num método de tratamento médico.

17. Utilização de um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 no fabrico de um medicamento para o tratamento de uma condição em que ocorre a activação excessiva do complexo de proteína ErbB2-ErbB3, tal como tumores benignos e malignos; leucemias e malignidades linfóides; distúrbios neuronais, gliais astrocíticos, hipotalâmicos e outros distúrbios glandulares, macrofágicos, epiteliais, estromais e blastocélulas; e distúrbios inflamatórios, angiogénicos e imunológicos.

Lisboa,

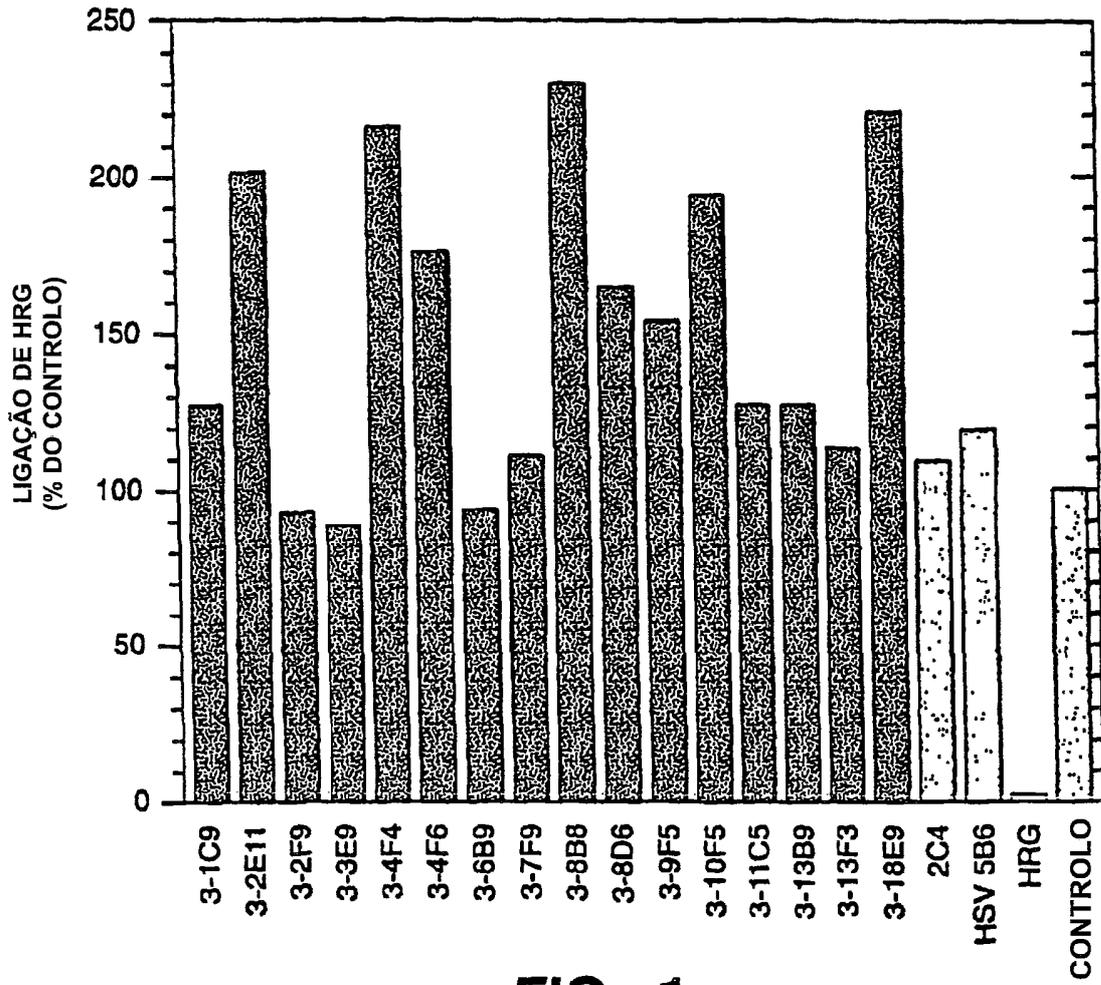


FIG. 1

