

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 481**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2006 E 06735838 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 1850874**

54 Título: **Prolongación del tiempo hasta la progresión de la enfermedad o supervivencia en pacientes de cáncer de ovario usando pertuzumab**

30 Prioridad:

23.02.2005 US 655277 P

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

29.01.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DERYNCK, MIKA K. y
KELSEY, STEPHEN M.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 440 481 T3

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

DESCRIPCIÓN

Prolongación del tiempo hasta la progresión de la enfermedad o supervivencia en pacientes de cáncer de ovario usando pertuzumab

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos N° de serie 60/655.277, presentada el 23 de febrero de 2005.

Campo de la invención

10 La presente divulgación se refiere a la prolongación del tiempo hasta la progresión de la enfermedad o supervivencia en un paciente de cáncer, donde el cáncer del paciente presenta activación de HER, tratando al paciente con un inhibidor de dimerización de HER, tal como pertuzumab.

15 Antecedentes de la invención**Receptores de HER y anticuerpos contra los mismos**

20 La familia HER de receptores tirosina quinasa son mediadores importantes del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. La familia de receptores incluye cuatro miembros distintos incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1, o HER1), HER2 (ErbB2 o p185^{neu}), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2).

25 AGFR, codificado por el gen *erbB1*, se ha implicado de forma causal en neoplasias humanas. En particular, la expresión aumentada de EGFR se ha observado en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y estómago así como glioblastomas. La expresión aumentada del receptor EGFR a menudo está asociada con una producción aumentada del ligando de EGFR, el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), por las mismas células tumorales provocando una activación del receptor por una vía estimuladora autocrina. Baselga y Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994). Anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFR o sus ligandos, TGF- α y EGF, se han evaluado como agentes terapéuticos en el tratamiento de dichas neoplasias. Véase, por ejemplo, Baselga y Mendelsohn., *supra*; Masui et al. *Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); y Wu et al. *J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995).

35 El segundo miembro de la familia HER, p185^{neu}, se identificó originalmente como el producto del gen transformante de neuroblastomas de ratas tratadas químicamente. La forma activada del proto-oncogén *neu* resulta de una mutación puntual (valina a ácido glutámico) en la región transmembrana de la proteína codificada. La amplificación del homólogo humano de *neu* se observa en cánceres de mama y ovario y se correlaciona con un mal pronóstico (Slamon et al., *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon et al., *Science*, 244:707-712 (1989); y la patente de Estados Unidos N° 4.968.603). Hasta la fecha, no se ha informado de ninguna mutación puntual análoga a la presente en el proto-oncogén *neu* para tumores humanos. La sobreexpresión de HER2 (de forma frecuente pero no uniforme debido a amplificación génica) también se ha observado en otros carcinomas incluyendo carcinomas del estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. Véase, entre otros, King et al., *Science*, 229:974 (1985); Yokota et al., *Lancet*: 1:765-767 (1986); Fukushige et al., *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Guerin et al. *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen et al., *Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura et al., *Cancer Res.*, 51:1034 (1991); Borst et al., *Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990); Weiner et al., *Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern et al., *Cancer Res.*, 50:5184 (1990); Park et al., *Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau et al., *Mol. Carcinog.*, 3:254-257 (1990); Aasland et al. *Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988); Williams et al. *Pathobiology* 59:4652 (1991); y McCann et al., *Cancer*, 65:88-92 (1990). HER2 puede sobre-expresarse en cáncer de próstata (Gu et al. *Cancer Lett.* 99:185-9 (1996); Ross et al. *Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997); Ross et al. *Cancer* 79:2162-70 (1997); 7 Sadasivan et al. *J. Urol.* 150:126-31 (1993)).

50 Se han descrito anticuerpos dirigidos contra los productos proteicos p135^{neu} de rata y HER2 humano.

Drebin y sus colegas han creado anticuerpos contra el producto génico *neu* de rata, p185^{neu}. Véase, por ejemplo, Drebin et al., *Cell* 41:695-706 (1985); Myers et al., *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991); y el documento WO94/22478. Drebin et al. *Oncogene* 2:273-277 (1988) informan de que mezclas de anticuerpos reactivos contra dos regiones distintas de p185^{neu} provocan efectos antitumorales sinérgicos sobre células NIH-3T3 transformadas con *neu* implantadas en ratones desnudos. Véase también la patente de Estados Unidos N° 5.824.311 expedida el 20 de octubre de 1998.

60 Hudziak et al., *Mol. Cell. Biol.* 9 (3): 1165- 1172 (1989) describen la generación de un panel de anticuerpos contra HER2 que se caracterizaron usando la línea celular de tumor de mama humano SK-BR-3. La proliferación celular relativa de las células SK-BR-3 después de exposición a los anticuerpos se determinó por tinción con cristal violeta de las monocapas después de 72 horas. Usando este ensayo, se obtuvo una inhibición máxima con el anticuerpo llamado 4D5 que inhibía la proliferación celular en un 56 %. Otros anticuerpos en el panel reducían la proliferación celular a un grado menor en este ensayo. Adicionalmente se descubrió que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba líneas celulares de tumor de mama que sobre-expresaban HER2 a los efectos citotóxicos de TNF- α . Véase, también la

patente de Estados Unidos Nº 5.677.171 expedida el 14 de octubre de 1997. Los anticuerpos contra HER2 analizados en Hudziak et al. se caracterizaron adicionalmente en Fendly et al. *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts et al. *In Vitro* 26(3):59A (1990); Sarup et al. *Growth Regulation* 1:72-82 (1991); Shepard et al. *J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127 (1991); Kumar et al. *Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986 (1991); Lewis et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras et al. *Oncogene* 9:1829-1838 (1994); Vitetta et al. *Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski et al. *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994); Scott et al. *J. Biol. Chem.* 266:14300-5(1991); D'souza et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994); Lewis et al. *Cancer Research* 56:1457-1465 (1996); y Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997).

Una versión humanizada recombinante del anticuerpo murino contra HER2 4D5 (huMab4D5-8, rhuMab HER2, trastuzumab o HERCEPTIN®; patente de Estados Unidos Nº 5.821.337) es clínicamente activo en pacientes con cánceres de mama metastásico que sobreexpresan HER2 que han recibido terapia antineoplásica previa extensiva (Baselga et al., *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996)). Trastuzumab recibió la aprobación para su comercialización de la Food and Drug Administration el 25 de septiembre de 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2.

Otros anticuerpos contra HER2 con diversas propiedades se han descrito en Tagliabue et al. *Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991); McKenzie et al. *Oncogene* 4:543-548 (1989); Maier et al. *Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991); Bacus et al. *Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990); Stancovski et al. *PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991); Bacus et al. *Cancer Research* 52:2580-2589 (1992); Xu et al. *Int. J. Cancer* 53:401-408 (1993); documento WO94/00136; Kasprzyk et al. *Cancer Research* 52:2771-2776 (1992); Hancock et al. *Cancer Res.* 51:4575-4580 (1991); Shawver et al. *Cancer Res.* 54:1367-1373 (1994); Arteaga et al. *Cancer Res.* 54:3758-3765 (1994); Harwerth et al. *J. Biol. Chem.* 267:15160-15167 (1992); patente de Estados Unidos Nº 5.783.186; y Klapper et al. *Oncogene* 14:2099-2109 (1997).

La exploración de homología ha provocado la identificación de otros dos miembros de la familia de receptores de HER; HER3 (patentes de Estados Unidos Nº 5.183.884 y 5.480.968 así como Kraus et al. *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)) y HER4 (solicitud de patente EP Nº 599.274; Plowman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); y Plowman et al., *Nature*, 366:473-475 (1993)). Estos dos receptores presentan expresión aumentada en al menos algunas líneas celulares de cáncer de mama.

Los receptores de HER se hallan generalmente en diversas combinaciones en células y se cree que la heterodimerización aumenta la diversidad de las respuestas celulares a varios de ligandos HER (Earp et al. *Breast Cancer Research and Treatment* 35:115-132 (1995)). EGFR se une por seis ligandos diferentes; el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), anfiregulina, el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), betacelulina y epiregulina (Groenen et al. *Growth Factors* 11: 235- 257 (1994)). Una familia de proteínas heregulina resultantes de corte y ajuste alternativo de un único gen son ligandos para HER3 y HER4. La familia de heregulina incluye heregulinas alfa, beta y gamma (Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992); patente de Estados Unidos Nº 5.641.869; y Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)); factores de diferenciación neu (NDF), factores de crecimiento de la glía (GGF); receptor de acetilcolina que induce actividad (ARIA); y el factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF). Para una revisión, véase Groenen et al. *Growth Factors* 11:235-257 (1994); Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247-262 (1996) y Lee et al. *Pharm. Rev.* 47:51-85 (1995). Recientemente se identificaron tres ligandos adicionales de HER; neuregulina-2 (NRG-2) de la que se informó que se une a HER3 o HER4 HER4 (Chang et al. *Nature* 387 509-512 (1997); y Carraway et al. *Nature* 387:512-516 (1997)); neuregulina-3 que se une a HER4 (Zhang et al. *PNAS (USA)* 94(18):9562-7 (1997)); y neuregulina-4 que se une a HER4 (Harari et al. *Oncogene* 18:2681-89 (1999)). HB-EGF, betacelulina y epiregulina también se unen a HER4.

Aunque EGF y TGF α no se unen a HER2, EGF estimula EGFR y HER2 para formar un heterodímero, que activa EGFR y provoca la transfosforilización de HER2 en el heterodímero. La dimerización y/o transfosforilización parece activar la tirosina quinasa HER2. Véase Earp et al., *supra*. Así mismo, cuando HER3 se co-expresa con HER2, se forma un complejo de señalización activo y los anticuerpos dirigidos contra HER2 son capaces de alterar este complejo (Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994)). Adicionalmente, la afinidad de HER3 por heregulina (HRG) se aumenta a un estado de mayor afinidad cuando se co-expresa con HER2. Véase también, Levi et al., *Journal of Neuroscience* 15:1329-1340 (1995); Morrissey et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1431-1435 (1995); y Lewis et al., *Cancer Res.*, 56:1457-1465 (1996) con respecto al complejo proteico HER2-HER3. HER4, como HER3, forma un complejo de señalización activo con HER2 (Carraway y Cantley, *Cell* 78:5-8 (1994)).

Las publicaciones de patente relacionadas con anticuerpos contra HER incluyen: US 5.677.171, US 5.720.937, US 5.720.954, US 5.725.856, US 5.770.195, US 5.772.997, US 6.165.464, US 6.387.371, US 6.399.063, US2002/0192211A1, US 6.015.567, US 6.333.169, US 4.968.603, US 5.821.337, US 6.054.297, US 6.407.213, US 6.719.971, US 6.800.738, US2004/0236078A1, US 5.648.237, US 6.267.958, US 6.685.940, US 6.821.515, WO98/17797, US 6.127.526, US 6.333.398, US 6.797.814, US 6.339.142, US 6.417.335, US 6.489.447, WO99/31140, US2003/0147884A1, US2003/0170234A1, US2005/0002928A1, US 6.573.043, US2003/0152987A1, WO99/48527, US2002/0141993A1, WO01/00245, US2003/0086924, US2004/0013667A1, WO00/69460, WO01/00238, WO01/15730, US 6.627.196B1, US6.632.979B1, WO01/00244, US2002/0090662A1, WO01/89566,

US2002/0064785, US2003/0134344, WO 04/24866, US2004/0082047, US2003/0175845A1, WO03/087131, US2003/0228663, WO2004/008099A2, US2004/0106161, WO2004/048525, US2004/0258685A1, US 5.985.553, US 5.747.261, US 4.935.341, US 5.401.638, US 5.604.107, WO 87/07646, WO 89/10412, WO 91/05264, EP 412.116 B1, EP 494.135 B1, US 5.824.311, EP 444.181 B1, EP 1.006.194 A2, US 2002/0155527A1, WO 91/02062, US 5.571.894, US 5.939.531, EP 502.812 B1, WO 93/03741, EP 554.441 B1, EP 656.367 A1, US 5.288.477, US 5.514.554, US 5.587.458, WO 93/12220, WO 93/16185, US 5.877.305, WO 93/21319, WO 93/21232, US 5.856.089, WO 94/22478, US 5.910.486, US 6.028.059, WO 96/07321, US 5.804.396, US 5.846.749, EP 711.565, WO 96/16673, US 5.783.404, US 5.977.322, US 6.512.097, WO 97/00271, US 6.270.765, US 6.395.272, US 5.837.243, WO 96/40789, US 5.783.186, US 6.458.356, WO 97/20858, WO 97/38731, US 6.214.388, US 5.925.519, WO 98/02463, US 5.922.845, WO 98/18489, WO 98/33914, US 5.994.071, WO 98/45479, US 6.358.682 B1, US 2003/0059790, WO 99/55367, WO 01/20033, US 2002/0076695 A1, WO 00/78347, WO 01/09187, WO 01/21192, WO 01/32155, WO 01/53354, WO 01/56604, WO 01/76630, WO02/05791, WO 02/11677, US 6.582.919, US2002/0192652A1, US 2003/0211530A1, WO 02/44413, US 2002/0142328, US 6.602.670 B2, WO 02/45653, WO 02/055106, US 2003/0152572, US 2003/0165840, WO 02/087619, WO 03/006509, WO03/012072, WO 03/028638, US 2003/0068318, WO 03/041736, EP 1.357.132, US 2003/0202973, US 2004/0138160, US 5.705.157, US 6.123.939, EP 616.812 B1, US 2003/0103973, US 2003/0108545, US 6.403.630 B1, WO 00/61145, WO 00/61185, US 6.333.348 B1, WO 01/05425, WO 01/64246, US 2003/0022918, US 2002/0051785 A1, US 6.767.541, WO 01/76586, US 2003/0144252, WO 01/87336, US 2002/0031515 A1, WO 01/87334, WO 02/05791, WO 02/09754, US 2003/0157097, US 2002/0076408, WO 02/055106, WO 02/070008, WO 02/089842 y WO 03/86467.

Diagnóstico

Se seleccionan pacientes tratados con el anticuerpo contra HER2 trastuzumab para terapia basada en sobreexpresión/amplificación de HER2. Véase, por ejemplo, el documento WO99/31140 (Paton et al.), documento US2003/0170234A1 (Hellmann, S.), y documento US2003/0147884 (Paton et al.); así como los documentos WO01/89566, US2002/0064785, y US2003/0134344 (Mass et al.). Véase, también, el documento US2003/0152987, Cohen et al., respecto a inmunohistoquímica (IHC) e hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) para detectar sobreexpresión y amplificación de HER2.

Los documentos WO2004/053497 y US2004/024815A1 (Bacus et al.), así como el documento US 2003/0190689 (Crosby y Smith), se refieren a la determinación o predicción de la respuesta a terapia con trastuzumab. El documento US2004/013297A1 (Bacus et al.) se refiere a la determinación o predicción de la respuesta a terapia con anticuerpo ABX0303 contra EGFR. El documento WO2004/000094 (Bacus et al.) se refiere a la determinación de la respuesta a GW572016, una molécula pequeña, inhibidora de la tirosina quinasa EGFR-HER2. El documento WO2004/063709, Amler et al., se refiere a biomarcadores y métodos para determinar la sensibilidad al inhibidor de EGFR, erlotinib HCl. El documento US2004/0209290, Cobleigh et al., se refiere a marcadores de expresión génica para el pronóstico de cáncer de mama. Los pacientes tratados con pertuzumab pueden seleccionarse para terapia basada en activación o dimerización de HER. Las publicaciones de patente referentes a pertuzumab y selección de pacientes para terapia con el mismo incluyen: WO01/00245 (Adams et al.); US2003/0086924 (Sliwkowski, M.); US2004/0013667A1 (Sliwkowski, M.); así como WO2004/008099A2, y US2004/0106161 (Bossenmaier et al.).

Cronin et al. Am. J. Path. 164(1): 35-42 (2004) describe la medición de la expresión génica en tejidos embebidos en parafina archivados. Ma et al. Cancer Cell 5:607-616 (2004) describe el perfilado génico por microserie de oligonucleótidos génicos usando ARN aislado de secciones de tejido tumoral tomadas de biopsias primarias archivadas.

El pertuzumab (también conocido como anticuerpo monoclonal humano recombinante 2C4; OMNITARG™, Genentech, Inc., South San Francisco) representa el primero en una nueva clase de agentes conocidos como inhibidores de dimerización de HER (HDI) y funciona inhibiendo la capacidad de HER2 para formar heterodímeros activos con otros receptores de HER (tales como EGFR/HER1, HER3 y HER4) y es activo independientemente de los niveles de expresión de HER2. Véase, por ejemplo, Harari y Yarden Oncogene 19:6102-14 (2000); Yarden y Sliwkowski. Nat Rev Mol Cell Biol 2:127-37 (2001); Sliwkowski Nat Struct Biol 10:158-9 (2003); Cho et al. Nature 421:756-60 (2003); y Malik et al. Pro Am Soc Cancer Res 44:176-7 (2003).

El bloqueo por pertuzumab de la formación de heterodímeros HER2-HER3 en células tumorales ha demostrado inhibir la señalización celular crítica, que provoca una proliferación y supervivencia tumoral reducidas (Agus et al. Cancer Cell 2:127-37 (2002)).

El pertuzumab ha experimentado ensayo como agente único en clínica con un ensayo en fase I en pacientes con cánceres avanzados y ensayos en fase II en pacientes con cáncer de ovario y cáncer de mama así como cáncer de pulmón y próstata. En un estudio en fase I, se trataron pacientes con tumores sólidos incurables, localmente avanzados, recurrentes o metastásicos que habían progresado durante y después de terapia convencional con pertuzumab administrado por vía intravenosa cada 3 semanas. El pertuzumab generalmente se toleró bien. La regresión tumoral se consiguió en 3 de 20 pacientes evaluables para la respuesta. Dos pacientes tuvieron respuestas parciales confirmadas. Se observó enfermedad estable con una duración de más de 2,5 meses en 6 de 21 pacientes (Agus et al. Pro Am Soc Clin. Oncol 22:192 (2003)). A dosis de 2,0-15 mg/kg, la farmacocinética de

pertuzumab fue lineal, y la eliminación media varió de 2,69 a 3,74 ml/día/kg y la semivida de eliminación terminal media varió de 15,3 a 27,6 días. No se detectaron anticuerpos contra pertuzumab (Allison et al. Pro Am Soc Clin Oncol 22:197 (2003)).

5 Sumario de la invención

La presente divulgación proporciona los datos clínicos de pacientes de cáncer humano tratados con un inhibidor de dimerización de HER, pertuzumab. Los pacientes se evaluaron para la activación de HER, determinada usando un bioensayo fosfo-ELISA. Se observó beneficio clínico, medido por tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y supervivencia, en pacientes que presentaban activación de HER.

Por consiguientes, la invención se refiere al uso de un inhibidor de dimerización de HER para prolongar el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) o supervivencia en un paciente con cáncer donde se administra un inhibidor de dimerización de HER al paciente en una cantidad que prolonga la TTP o la supervivencia en el paciente, donde el cáncer del paciente presenta activación de HER.

La invención también se refiere al uso de pertuzumab para prolongar el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) o la supervivencia en un paciente con cáncer de ovario, peritoneal, o de trompas de Falopio donde se administra pertuzumab al paciente en una cantidad que prolonga el TTP o la supervivencia del paciente, donde el cáncer del paciente presenta activación de HER2.

La presente invención proporciona pertuzumab para su uso en un método para prolongar el tiempo hasta la progresión de la enfermedad o la supervivencia en un paciente con cáncer, como se define en las reivindicaciones.

25 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona un esquema de la estructura proteica de HER2, y secuencias de aminoácidos para los Dominios I-IV (SEC ID N° 19-22, respectivamente) del dominio extracelular de la misma.

Las Figuras 2A y 2B representan alineaciones de las secuencias de aminoácidos de los dominios ligero variable (V_L) (Fig. 2A) y pesado variable (V_H) (Fig. 2B) del anticuerpo monoclonal murino 2C4 (SEC ID N° 1 y 2, respectivamente); los dominios V_L y V_H de la variante 574/pertuzumab (SEC ID N° 3 y 4, respectivamente), y las regiones flanqueantes consenso V_L y V_H humanas (hum κ1, subgrupo I de kappa ligera; humIII, subgrupo III pesada) (SEC ID N° 5 y 6, respectivamente). Los asteriscos identifican diferencias entre los dominios variables de pertuzumab y el anticuerpo monoclonal murino 2C4 o entre los dominios variables de pertuzumab y la región flanqueante humana. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) están entre corchetes.

Las Figuras 3A y 3B muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de pertuzumab (Fig. 3A; SEC ID N° 13) y la cadena pesada (Fig. 3B; SEC ID N° 14). Las CDR se muestran en negrita. La masa molecular calculada de la cadena ligera y la cadena pesada son 23.526,22 Da y 49.216,56 Da (cisteínas en forma reducida). El resto carbohidrato está unido a ASN 299 de la cadena pesada.

La Figura 4 representa, de forma esquemática, la unión de 2C4 al sitio de unión heterodimérico de HER2, evitando de este modo la heterodimerización con EGFR o HER3 activado.

La Figura 5 representa el acoplamiento de HER2/HER3 a las vías MAPK y Akt.

La Figura 6 compara diversas actividades de trastuzumab y pertuzumab.

Las Figuras 7A y 7B muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de trastuzumab (Fig. 7A; SEC ID N° 15) y la cadena pesada (Fig. 7B; SEC ID N° 16), respectivamente.

Las Figuras 8A y 8B representan una secuencia de cadena ligera de pertuzumab variante (Fig. 8A; SEC ID N° 17) y una secuencia de cadena pesada de pertuzumab variante (Fig. 8B; SEC ID N° 18), respectivamente.

La Fig. 9 proporciona la demográfica basal de pacientes tratados en el Ejemplo 1.

La Fig. 10 muestra todos los acontecimientos adversos de grado 3-4 (independientemente de la relación con el tratamiento).

La Fig. 11 muestra los acontecimientos adversos graves (independientemente de la relación con el tratamiento).

La Fig. 12 resume los acontecimientos adversos graves juzgados como relacionados con el fármaco del estudio por los investigadores.

La Fig. 13 proporciona información sobre los acontecimientos adversos seleccionados.

La Fig. 14 representa los acontecimientos adversos graves cardiacos y los acontecimientos adversos que requieren informes inmediatos.

La Fig. 15 resumen los resultados de eficacia para el estudio en fase II de pertuzumab en el Ejemplo 1.

La Fig. 16 muestra la eficacia del tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) para sujetos evaluables con cáncer de ovario tratados con una dosis baja (420 mg) o dosis alta (1050 mg) de pertuzumab.

La Fig. 17 muestra la eficacia de supervivencia global para sujetos evaluables con cáncer de ovario tratados con dosis baja (420 mg) o dosis alta (1050 mg) de pertuzumab. La supervivencia media histórica para sujetos con cáncer de ovario tratados con topotecán fue 43 semanas, y para doxorubicina liposómica fue de 36 semanas.

La Fig. 18 proporciona respuestas CA-125 para sujetos con cáncer de ovario tratados con 420 mg o 1050 mg de pertuzumab.

La Fig. 19 proporciona el estado de fosfo-HER2 (pHER2), determinado por ELISA, para sujetos con cáncer de ovario tratados con 420 mg de pertuzumab.

La Fig. 20 proporciona los resultados de eficacia clínica mediante el estado pHER2, determinado por ELISS, para sujetos con cáncer de ovario tratados con 420 mg de pertuzumab.

La Fig. 21 proporciona el estado pHER2, determinado por ELISA, para pacientes con cáncer de ovario tratados con 420 mg de pertuzumab que muestran evidencia de actividad (respuesta parcial, PR, o enfermedad estable, SD, durante más de 18 semanas). BSLD se refiere a la suma en la línea basal del diámetro más largo.

La Fig. 22 muestra la eficacia de TTP mediante el estado pHER2. Los sujetos con cáncer de ovario se trataron con 420 mg de pertuzumab. El TTP global fue de 6,6 semanas; el TTP en sujetos pHER positivos fue de 20,9 semanas; el TTP en sujetos pHER2 negativos fue de 6,0 semanas; y el TTP en sujetos con estado pHER2 desconocido fue de 9,1 semanas.

La Fig. 23 representa la supervivencia global mediante el estado pHER2. Los sujetos con cáncer de ovario se trataron con 420 mg de pertuzumab. La supervivencia media histórica para sujetos con cáncer de ovario tratados con topotecán fue de 43 semanas, y para doxorubicina liposómica fue de 36 semanas.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

En este documento "tiempo hasta la progresión de la enfermedad" o "TTP" se refiere al tiempo, generalmente medido en semanas o meses, desde el momento de tratamiento inicial (por ejemplo, con un inhibidor de dimerización de HER, tal como pertuzumab), hasta que el cáncer progresa o empeora. Dicha progresión puede evaluarse por el médico especialista. En el caso de cáncer de ovario, por ejemplo, la progresión puede evaluarse por RECIST (véase, por ejemplo, Therasse et al., J. Nat. Cancer Inst. 92(3): 205-216 (2000)).

Por "prolongación del TTP" se entiende el aumento del tiempo hasta la progresión de la enfermedad en el paciente tratado con relación a un paciente no tratado (es decir, con relación a un paciente no tratado con el inhibidor de dimerización de HER, tal como pertuzumab), o con relación a un paciente que no presenta activación de HER, y/o con relación a un paciente tratado con un agente antitumoral aprobado (tal como topotecán o doxorubicina liposómica, donde el cáncer es cáncer de ovario).

"Supervivencia" se refiere al paciente que permanece vivo, e incluye la supervivencia global así como la supervivencia sin progresión.

"Supervivencia global" se refiere al paciente que permanece durante un periodo de tiempo definido, tal como 1 año, 5 años, etc. desde el momento del diagnóstico o tratamiento.

"Supervivencia sin progresión" se refiere al paciente que permanece vivo, sin progresión del cáncer o empeorar.

Por "prolongación de la supervivencia" se entiende aumentar la supervivencia global o sin progresión en un paciente tratado con relación a un paciente no tratado (es decir, con relación a un paciente no tratado con un inhibidor de dimerización de HER, tal como pertuzumab), o con relación a un paciente que no presenta activación de HER, y/o con relación a un paciente tratado con un agente antitumoral aprobado (tal como topotecán o doxorubicina liposómica, donde el cáncer es cáncer de ovario).

Una "respuesta objetiva" se refiere a una respuesta medible, incluyendo respuesta completa (CR) o respuesta parcial (PR).

Por "respuesta completa" o "CR" se entiende la desaparición de todos los signos de cáncer en respuesta al tratamiento. Esto no siempre significa que el cáncer se halla curado.

"Respuesta parcial" o "PR" se refiere a una disminución en el tamaño de uno o más tumores o lesiones, o el grado del cáncer en el organismo, en respuesta al tratamiento.

Un "receptor HER" es un receptor de proteína tirosina quinasa que pertenece a la familia de receptores HER e incluye receptores EGFR, HER2, HER3 y HER4. El receptor HER generalmente comprenderá un dominio extracelular, que puede unirse a un ligando HER y/o dimerizar con otra molécula receptora HER; un dominio transmembrana lipófilo; un dominio tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxilo terminal que alberga varios restos de tirosina que pueden fosforilarse. El receptor HER puede ser un receptor HER de "secuencia nativa" o una "variante de secuencia de aminoácidos" del mismo. Preferiblemente, el receptor HER es un receptor HER humano de secuencia nativa.

Las expresiones "ErbB1", "HER1", "receptor del factor de crecimiento epidérmico" y "EGFR" se usan de forma intercambiable en este documento y se refieren a EGFR como se desvela, por ejemplo, en Carpenter et al. Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987), incluyendo formas mutantes de origen natural del mismo (por ejemplo, un EGFR mutante de delección como en Humphrey et al. PNAS (USA) 87:4207-4211 (1990)). *erbB1* se refiere a un gen que codifica el producto proteico EGFR.

Las expresiones "ErbB2" y "HER2" se usan de forma intercambiable en este documento y se refieren a la proteína HER2 humana descrita, por ejemplo, en Semba et al., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985) y Yamamoto et al. Nature 319:230-234 (1986) (Número de acceso a Genbank X03363). El término "*erbB2*" se refiere al gen que codifica ErbB2 humano y "*neu*" se refiere al gen que codifica p185^{neu} de rata. El HER2 preferido es HER2 humano de secuencia nativa.

En este documento, "dominio extracelular de HER2" o "ECD de HER2" se refieren a un dominio de HER2 que está fuera de una célula, anclado a una membrana celular, o en circulación, incluyendo fragmentos del mismo. En una realización, el dominio extracelular de HER2 puede comprender cuatro dominios: "Dominio I" (restos aminoacídicos de aproximadamente 1-195; SEC ID N° 19), "Dominio II" (restos aminoacídicos de aproximadamente 196-319; SEC ID N° 20), "Dominio III" (restos aminoacídicos de aproximadamente 320-488; SEC ID N° 21), y "Dominio IV" (restos aminoacídicos de aproximadamente 489-630; SEC ID N° 22) (la numeración de los restos es sin péptidos señal). Véase Garrett et al. Mol. Cell. 11: 495- 505 (2003), Cho et al. Nature 421: 756- 760 (2003), Franklin et al. Cancer Cell 5: 317- 328 (2004), y Plowman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 1746- 1750 (1993), así como la Fig. 1 en este documento.

"ErbB3" y "HER3" se refieren al polipéptido receptor desvelado, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N° 5.183.884 y 5.480.968 así como en Kraus et al. PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989).

Los términos "ErbB4" y "HER4" se refieren en este documento al polipéptido receptor desvelado, por ejemplo, en la solicitud de patente EP N° 599.274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750 (1993); y Plowman et al., Nature, 366: 473-475 (1993), incluyendo isoformas de los mismos, por ejemplo, como se desvela en el documento WO99/19488, publicado el 22 de abril de 1999.

Por "ligando de HER" se entiende un polipéptido que se une a y/o activa un receptor HER. El ligando de HER de particular interés en este documento es un ligando de HER humano de secuencia nativa tal como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Savage et al., J. Biol. Chem. 247:7612-7621 (1972)); el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) (Marquardt et al., Science 223:1079-1082 (1984)); anfiregulina también conocido como schwannoma o factor de crecimiento autocrino de queratinocitos (Shoyab et al. Science 243:1074-1076 (1989); Kimura et al. Nature 348:257-260 (1990); y Cook et al. Mol. Cell. Biol. 11:2547-2557 (1991)); betacelulina (Shing et al., Science 259:1604-1607 (1993); y Sasada et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173 (1993)); factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) (Higashiyama et al., Science 251:936-939 (1991)); epiregulina (Toyoda et al., J. Biol. Chem. 270:7495-7500 (1995); y Komurasaki et al. Oncogene 15:2841-2848 (1997)); una heregulina (véase a continuación); neuregulina-2 (NRG-2) (Carraway et al., Nature 387:512-516 (1997)); neuregulina-3 (NRG-3) (Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:9562-9567 (1997)); neuregulina-4 (NRG-4) (Harari et al. Oncogene 18: 2681-89 (1999)); y cripto (CR-1) (Kannan et al. J. Biol. Chem. 272 (6):3330-3335 (1997)). Los ligandos de HER que se unen a EGFR incluyen EGF, TGF- α , anfiregulina, betacelulina, HB-EGF y epiregulina. Los ligandos de HER que se unen a HER3 incluyen heregulinas. Los ligandos de HER capaces de unirse a HER4 incluyen betacelulina, epiregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4, y heregulinas.

"Heregulina" (HRG) cuando se usa en este documento se refiere a un polipéptido codificado por producto génico de heregulina desvelado en la patente de Estados Unidos N° 5.641.869, o en Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993). Ejemplos de heregulinas incluyen heregulina-a, heregulina-p1, heregulina-p2 y heregulina-p3 (Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); y la patente de Estados Unidos N° 5.641.869); el factor de diferenciación *neu* (NDF) (Peles et al. Cell 69:205-216 (1992)); el receptor de acetilcolina que induce actividad (ARIA) (Falls et al. Cell 72:801-815 (1993)); factores de crecimiento de la glia (GGF) (Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993)); el factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho et al. J. Biol. Chem. 270:14523-14532 (1995)); γ -heregulina (Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997)).

Un "dímero de HER" en este documento es un dímero asociado de forma no covalente que comprende al menos dos receptores HER. Dichos complejos pueden formarse cuando una célula que expresa dos o más receptores HER se expone a un ligando de HER y puede aislarse por inmunoprecipitación y analizarse por SDS-PAGE como se describe en Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994), por ejemplo. Otras proteínas, tales como una subunidad del receptor de citoquinas (por ejemplo, gp130) pueden asociarse con el dímero. Preferiblemente, el dímero de HER comprende HER2.

Un "heterodímero de HER" en este documento es un heterodímero asociado de forma no covalente que comprende al menos dos receptores HER diferentes, tales como heterodímeros EGFR-HER2, HER2-HER3 o HER2-HER4.

Un "inhibidor de HER" es un agente que interfiere con la activación o función de HER. Ejemplos de inhibidores de HER incluyen anticuerpos contra HER (por ejemplo, anticuerpos contra EGFR, HER2, HER3, o HER4); fármacos dirigidos a EGFR; antagonistas de HER de molécula pequeña; inhibidores de tirosina quinasa de HER; inhibidores duales de tirosina quinasa de HER2 y EGFR tales como lapatinib/GW572016; moléculas antisentido (véase, por ejemplo, el documento WO2004/87207); y/o agentes que se unen a, o interfieren con la función de, moléculas de señalización corriente abajo, tales como MAPK o Akt (véase la Fig. 5). Preferiblemente, el inhibidor de HER es un anticuerpo o molécula pequeña que se une a un receptor HER.

Un "inhibidor de la dimerización de HER" es un agente que inhibe la formación de un dímero de HER o heterodímero de HER. Preferiblemente, el inhibidor de la dimerización de HER es un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo que se une a HER2 en el sitio de unión heterodimérico del mismo. El inhibidor de dimerización de HER más preferido en este documento es pertuzumab o MAb 2C4. La unión de 2C4 al sitio de unión heterodimérico de HER2 se ilustra en la Fig. 4. Otros ejemplos de inhibidores de la dimerización de HER incluyen anticuerpos que se unen a EGFR e inhiben la dimerización del mismo con uno o más receptores HER diferentes (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal contra EGFR 806, MAb 806, que se une a EGFR activado o "desvinculado"; véase Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)); anticuerpos que se unen a HER3 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más receptores HER diferentes; anticuerpos que se unen a HER4 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más receptores HER diferentes; inhibidores de dimerización peptídicos (patente de Estados Unidos N° 6.417.168); inhibidores de dimerización antisentido; etc.

Un "inhibidor de la dimerización de HER2" es un agente que inhibe la formación de un dímero o heterodímero que comprende HER2.

Un "anticuerpo contra HER" es un anticuerpo que se une a un receptor HER. Opcionalmente, el anticuerpo contra HER interfiere adicionalmente con la activación o función de HER. Preferiblemente, el anticuerpo contra HER se une al receptor HER2. Un anticuerpo contra HER2 de particular interés en este documento es pertuzumab. Otro ejemplo de un anticuerpo contra HER2 es trastuzumab. Ejemplos de anticuerpos contra EGFR incluyen cetuximab y ABX0303.

"Activación de HER" se refiere a la activación, o fosforilación, de uno cualquiera o más receptores HER. Generalmente, la activación de HER provoca la transducción de señales (por ejemplo, la causada por un dominio quinasa intracelular de un receptor HER que fosforila restos de tirosina en el receptor HER o un polipéptido sustrato. La activación de HER puede estar mediada por la unión del ligando de HER a un dímero de HER que comprende el receptor HER de interés. El ligando de HER que se une a un dímero HER puede activar un dominio quinasa de uno o más de los receptores HER en el dímero y provocar de este modo la fosforilación de los restos de tirosina en uno o más de los receptores HER y/o la fosforilación de los restos de tirosina en polipéptidos sustrato adicionales, tales como las quinasas intracelulares Akt o MAPK, véase, la Fig. 5, por ejemplo.

"Fosforilación" se refiere a la adición de uno o más grupos fosfato a una proteína, tal como un receptor HER, o sustrato del mismo.

Un anticuerpo que "inhibe la dimerización de HER" es un anticuerpo que inhibe, o interfiere con, la formación de un dímero de HER. Preferiblemente, dicho anticuerpo se une a HER2 en el sitio de unión heterodimérico del mismo. El anticuerpo inhibidor de la dimerización más preferido en este documento es pertuzumab o MAb 2C4. La unión de 2C4 al sitio de unión heterodimérico de HER2 se ilustra en la Fig. 4. Otros ejemplos de anticuerpos que inhiben la dimerización de HER incluyen anticuerpos que se unen a EGFR e inhiben la dimerización del mismo con uno o más receptores HER diferentes (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal contra EGFR 806, MAb 806, que se une a EGFR activado o "desvinculado"; véase Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)); anticuerpos que se unen a HER3 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más receptores HER diferentes; y anticuerpos que se unen a HER4 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más receptores HER diferentes.

Un anticuerpo que "bloquea la activación por ligando de un receptor HER de forma más eficaz que trastuzumab" es uno que reduce o elimina la activación por ligando de HER del receptor o receptores HER o dímero o dímeros de HER de forma más eficaz (por ejemplo al menos aproximadamente 2 veces más eficaz) que trastuzumab. Preferiblemente, dicho anticuerpo bloquea la activación por ligando de HER de un receptor HER al menos aproximadamente de forma tan eficaz como el anticuerpo monoclonal murino 2C4 o un fragmento Fab del mismo, o como pertuzumab o un fragmento Fab del mismo. Puede evaluarse la capacidad de un anticuerpo de bloquear la activación por ligando de un receptor HER estudiando directamente dímeros de HER, o evaluando la activación de HER, o la señalización corriente abajo, que resulta de la dimerización de HER, y/o evaluando el sitio de unión de HER2 a anticuerpo, etc. Los ensayos para explorar anticuerpos con la capacidad de inhibir la activación por ligando de un receptor HER de forma más eficaz que trastuzumab se describen en Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002) y el documento WO01/00245 (Adams et al.). A modo de ejemplo solamente, se puede ensayar: la inhibición de la formación del dímero de HER (véase, por ejemplo, las Figs. 1A-B de Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002); y el documento WO01/00245); la reducción en la activación por ligando de HER de células que expresan dímeros de HER (documento WO01/00245 y las Figs. 2A-B de Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002), por ejemplo); el bloqueo de la unión del ligando de HER a células que expresan dímeros de HER (documento WO01/00245, y Fig. 2E de Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002), por ejemplo); la inhibición del crecimiento celular de células cancerosas (por ejemplo, células MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D) que expresan dímeros de HER en presencia (o ausencia) de ligando de HER (documento WO01/00245 y Figs. 3A-D de Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002), por ejemplo); la inhibición de la señalización corriente abajo (por ejemplo, la inhibición de la fosforilación de Akt dependiente de HRG o la inhibición de la fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF- α) (véase, el documento WO01/00245, y las Figs. 2C-D de Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002), por ejemplo). También puede evaluarse si el anticuerpo inhibe la dimerización de HER estudiando el sitio de unión de HER2 al anticuerpo, por ejemplo, evaluando una estructura o modelo, tal como una estructura cristalina, del anticuerpo unido

a HER2 (véase, por ejemplo, Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)).

Un "sitio de unión heterodimérico" en HER2, se refiere a una región en el dominio extracelular de HER2 que contacta, o interactúa con, una región en el dominio extracelular de EGFR, HER3 o HER4 tras la formación de un dímero con el mismo. La región se halla en el Dominio II de HER2. Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004).

El anticuerpo contra HER2 puede "inhibir la fosforilación de AKT dependiente de HRG" y/o inhibir "la fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF- α " de forma más eficaz (por ejemplo, al menos 2 veces más eficaz) que trastuzumab (véase Agus et al. Cancer Cell 2:127-137 (2002) y el documento WO01/00245, a modo de ejemplo).

El anticuerpo contra HER2 puede ser uno que, como pertuzumab, "no inhiba la escisión del ectodominio de HER2" (Molina et al. Cancer Res. 61:4744-4749 (2001)). Trastuzumab, por otro lado, puede inhibir la escisión del ectodominio de HER2.

Un anticuerpo contra HER2 que "se une a un sitio de unión heterodimérico" de HER2, se une a restos en el Dominio II (y opcionalmente también se une a restos en otro de los dominios del dominio extracelular de HER2, tal como los dominios I y III), y puede impedir estéricamente, al menos en algún grado, la formación de un heterodímero HER2-EGFR, HER2-HER3, o HER2-HER4. Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004) caracteriza la estructura cristalina HER2-pertuzumab, depositada en el Banco de Datos de Proteínas RCSB (Código ID IS78), que ilustra un anticuerpo ejemplar que se une al sitio de unión heterodimérico de HER2.

Un anticuerpo que "se une al dominio II" de HER2 se une a restos en el dominio II y opcionalmente a restos en otros dominios de HER2, tal como los dominios I y III. Preferiblemente, el anticuerpo que se une al dominio II se une a la unión entre los dominios I, II y III de HER2.

La "expresión" proteica se refiere a la conversión de la información codificada en un gen en ARN mensajero (ARNm) y después en la proteína.

En este documento, una muestra o célula que "expresa" una proteína de interés (tal como un receptor HER o ligando de HER) es una en la cual el ARNm que codifica la proteína, o la proteína, incluyendo fragmentos de la misma, se determina que está presente en la muestra o célula.

La técnica de "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" como se usa en este documento se refiere en líneas generales a un procedimiento donde se amplifican cantidades mínimas de un trozo específico de ácido nucleico, ARN y/o ADN, como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 4.683.195, expedida el 28 de julio de 1987. Generalmente, la información de secuencia desde los extremos de la región de interés o más allá tiene que estar disponible, de modo que puedan diseñarse cebadores oligonucleotídicos; estos cebadores serán idénticos o similares en secuencia a las hebras opuestas del molde a amplificar. Los nucleótidos 5' terminales de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR puede usarse para amplificar secuencias específicas de ARN, secuencias específicas de ADN procedentes del ADN genómico total, y ADN transcrito a partir de un ARN celular total, secuencias de bacteriófagos o plásmidos, etc. Véase en líneas generales Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989). Como se usa en este documento, la PCR se considera uno, pero no el único, ejemplo de un método de reacción de la polimerasa de ácidos nucleicos para amplificar una muestra de ensayo de ácido nucleico, que comprende el uso de un ácido nucleico conocido (ADN o ARN) como cebador y utiliza una polimerasa de ácido nucleico para amplificar o generar un trozo específico de ácido nucleico o para amplificar o generar un trozo específico de ácido nucleico que es complementario a un ácido nucleico particular.

"Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa" o "qRT-PCR" se refiere a una forma de PCR donde la cantidad de producto de PCR se mide en cada etapa en una reacción de PCR. Esta técnica se ha descrito en diversas publicaciones incluyendo Cronin et al., Am. J. Pathol. 164(1):35-42 (2004); y Ma et al., Cancer Cell 5:607-616 (2004).

El término "microserie" se refiere a una disposición ordenada de elementos de serie hibridables, preferiblemente sondas polinucleotídicas, en un sustrato.

El término "polinucleótido", cuando se usa en singular o plural, se refiere en líneas generales a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por tanto, por ejemplo, los polinucleótidos definidos en este documento incluyen, sin limitación, ADN mono y bicatenario, ADN que incluye regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario, y ARN que incluye regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más normalmente, bicatenarias o que incluye regiones mono y bicatenarias. Además, el término "polinucleótido" como se usa en este documento se refiere a regiones de tres hebras que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las hebras en dichas regiones pueden ser de la misma molécula o de diferentes moléculas. Las regiones pueden incluir la totalidad de una o más de las moléculas, pero más normalmente, implican solamente una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región de triple hélice a menudo es un oligonucleótido. El término

"polinucleótido" incluye específicamente ADNc. El término incluye ADN (incluyendo ADNc) y ARN que contienen una o más bases modificadas. Por tanto, los ADN o ARN con esqueletos modificados para la estabilidad o por otras razones son "polinucleótidos" según se entiende este término en este documento. Además, se incluyen ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases triadas, dentro del término "polinucleótidos" como se define en este documento. En general, el término "polinucleótido", abarca todas las formas modificadas química, enzimática y/o metabólicamente de polinucleótidos no modificados, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo células simples y complejas.

El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido relativamente corto incluyendo, sin limitación, desoxirribonucleótidos monocatenarios, ribonucleótidos mono o bicatenarios, híbridos ARN: ADN y ADN bicatenarios. Los oligonucleótidos, tales como oligonucleótidos de sonda de ADN monocatenarios, a menudo se sintetizan por métodos químicos, por ejemplo usando sintetizadores automatizados de oligonucleótidos que están disponibles en el mercado. Sin embargo, los oligonucleótidos pueden crearse mediante diversos métodos diferentes, incluyendo técnicas in vitro mediadas por ADN recombinante y por expresión de ADN en células y organismos.

La expresión "amplificación génica" se refiere a un proceso por el cual se forman múltiples copias de un gen o fragmento génico en una célula o línea celular particular. La región duplicada (un tramo de ADN amplificado) a menudo se menciona como "amplicón". Habitualmente, la cantidad del ARN mensajero (ARNm) producido también aumenta en la proporción de la cantidad de copias creadas del gen particular expresado.

La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación puede determinarla fácilmente un especialista en la técnica, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, el tiempo de lavado, y la concentración salina. En general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación apropiada, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas inferiores. La hibridación generalmente depende de la capacidad del ADN desnaturizado de hibridar con hebras complementarias que están presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas más elevadas tenderían a crear las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas inferiores las menos rigurosas. Para detalles adicionales y una explicación de la rigurosidad en las reacciones de hibridación, véase Cronin et al., *Am. J. Pathol.* 164(1):35-42 (2004); y Ma et al., *Cancer Cell* 5:607-616 (2004).

"Condiciones rigurosas" o "condiciones de elevada rigurosidad", como se definen en este documento, normalmente: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1 % a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con albúmina sérica bovina al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) emplean formamida al 50 %, 5xSSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1 %, solución de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmón sonicado (50 &ggr;g/ml), SDS al 0,1 %, y sulfato de dextrano al 10 % a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2xSSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50 % a 55°C, seguido por un lavado de alta rigurosidad consistente en 0,1xSSC que contiene EDTA a 55°C.

Las "condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse como se describe por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es incubación durante una noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20 %, 5xSSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturizado extraído, seguido por lavado de los filtros en 1xSSC a aproximadamente 37-50°C. Los especialistas en la técnica reconocerán el modo de ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

Un polipéptido "de secuencia nativa" es uno que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (por ejemplo, receptor HER o ligando de HER) obtenido de la naturaleza, incluyendo variantes de origen natural o alélicas. Dichos polipéptidos de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos. Por tanto, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de un polipéptido humano de origen natural, polipéptido murino, o polipéptido de cualquier otra especie de mamífero.

El término "anticuerpo" en este documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multi-específicos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren la actividad biológica deseada.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo o epítopos, excepto por posibles variantes que pueden surgir durante la

producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes generalmente dichas variantes en cantidades minoritarias. Dicho anticuerpo monoclonal normalmente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, donde la secuencia polipeptídica de unión a la diana se obtuvo por un proceso que incluye la selección de una secuencia polipeptídica de unión a una única diana a partir de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon a partir de una pluralidad de clones, tal como una combinación de clones de hibridoma, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que la secuencia de unión a la diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multi-específico, etc., y que el anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada también es un anticuerpo monoclonal. En contraste con las preparaciones de anticuerpos monoclonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas porque normalmente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe entenderse como que requiera la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden crearse mediante diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); y Lee et al. *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o de tipo humano en animales que tienen partes de o todos los loci o genes de inmunoglobulina humana que codifican las secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); las patentes de Estados Unidos Nº 5.545.806; 5.569.825; 5.591.669 (todas de GenPharm); la patente de Estados Unidos Nº 5.545.807; el documento WO 1997/17852; las patentes de Estados Unidos Nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368:812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14:826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995)).

Los anticuerpos monoclonales en este documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas a u homólogas a secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en este documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable obtenidas de un primate no humano (por ejemplo, primates catarrinos, simio, etc.) y secuencias de la región constante humana, así como anticuerpos "humanizados".

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima obtenida de una inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan restos de la región flanqueante (FR) de la inmunoglobulina no humana por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se hallan en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en que la totalidad o sustancialmente la totalidad de los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Los anticuerpos humanizados contra HER2 incluyen huMAB4D5-1, huMAB4D5-2, huMAB4D5-3, huMAB4D5-4, huMAB4D5-5, huMAB4D5-6, huMAB4D5-7 y huMAB4D5-8 o trastuzumab (HERCEPTIN®) como se describe en la Tabla 3 de la patente de Estados Unidos Nº 5.821.337; 520C9 humanizado (documento WO93/21319); y anticuerpos 2C4 humanizados tales como pertuzumab como se describe en este documento.

Para los propósitos de este documento, "trastuzumab," "HERCEPTIN®," y "huMAb4D5-8" se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada de las SEC ID N° 15 y 16, respectivamente.

5 En este documento, "pertuzumab" y "OMNITARG™" se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada de las SEC ID N° 13 y 14, respectivamente.

Las diferencias entre las funciones de trastuzumab y pertuzumab se ilustran en la Fig. 6.

10 Un "anticuerpo intacto" en este documento es uno que comprende dos regiones de unión a antígeno, y una región Fc. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una región Fc funcional.

15 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente que comprenda la región de unión a antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multi-específicos formados a partir de uno o más fragmentos de anticuerpo.

20 Los "anticuerpos nativos" son habitualmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, aunque la cantidad de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios especiados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos aminoacídicos particulares forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

30 El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida de forma uniforme en todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones flanqueantes (FR). Los dominios variables de cadenas nativas pesada y ligera comprenden cada una cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina-β, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina-β. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en cercana proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

45 La expresión "región hipervariable" cuando se usa en este documento se refiere a los restos aminoacídicos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable generalmente comprende restos aminoacídicos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Los restos de la "región flanqueante" o "FR" son aquellos restos del dominio variable diferentes a los restos de la región hipervariable como se define en este documento.

55 La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno único, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de unión a antígeno y aún es capaz de entrecruzar un antígeno.

60 "Fv" es el fragmento mínimo de un anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento a antígeno y unión a antígeno completo. Esta región consta de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan definiendo un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para

un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unir un antígeno, aunque a una afinidad inferior que el sitio de unión completo.

5 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi-terminal del dominio CH1 de cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en este documento para Fab' en que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes albergan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo f(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros
10 acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos de cualquier especie vertebrada puede asignarse de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.
15

La expresión "región Fc" en este documento se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana habitualmente está definida como abarcando de un resto aminoacídico en la posición Cys226, o de Pro230, hasta el carboxilo terminal de la misma. La lisina C-terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede retirarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o por modificación recombinante por ingeniería del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 retirados, poblaciones de anticuerpos sin restos K447 retirados, y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla
20 de anticuerpos con y sin el resto K447.
25

Salvo que se indique de otro modo, en este documento la numeración de los restos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU, como en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de restos del anticuerpo EU IgG1 humano.
30

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una secuencia Fc de secuencia nativa. "Funciones efectoras" ejemplares incluyen la unión de C1q; la citotoxicidad dependiente del complemento; la unión al receptor Fc; la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC); la fagocitosis; la regulación negativa de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc.. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y puede evaluarse usando diversos ensayos como se desvela en este documento, por ejemplo.
35

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc hallada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos no A y A); la región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; la región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y la región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa así como variantes de origen natural de las mismas.
40

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido, preferiblemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido precursor, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferiblemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido precursor. La región Fc variante en este documento preferiblemente poseerá al menos aproximadamente un 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido precursor, y más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 % de homología con la misma, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95 % de homología con la misma.
45
50
55

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden asignarse a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.
60

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células citolíticas naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células principales para mediar la ADCC, células NK, expresan Fc γ R111
65

solamente, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 y en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de Estados Unidos N° 5.500.362 ó 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citolíticas naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos Fc γ RIII y realizan la función efectora ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células citolíticas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; siendo preferidas las PBMC y las células NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMC como se describe en este documento.

Las expresiones "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y ajuste alternativo de estos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un "receptor activador") y Fc γ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias similares de aminoácidos que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de las mismas. El receptor activador Fc γ RIIA contiene un motivo de activación basado en inmunorreceptor de tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición basado en inmunorreceptor de tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase la revisión M. en Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo aquellos a identificar en el futuro, están incluidos por el término "FcR" en este documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), y regula la homeostasis de las inmunoglobulinas.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula de lisar una diana en presencia del complemento. La vía de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) en complejo con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión de scFv véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, pág. 269-315 (1994). Fragmentos scFv del anticuerpo contra HER2 se describen en el documento WO93/16185; la patente de Estados Unidos N° 5.571.894; y la patente de Estados Unidos N° 5.587.458.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio pesado variable (V_H) conectado a un dominio ligero variable (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo que no está conjugado a una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico o radiomarcador.

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

una etapa de purificación.

Un anticuerpo "de afinidad madurada" es uno con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables del mismo que provocan una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo precursor que no posee esa o esas alteraciones. Los anticuerpos preferidos de afinidad madurada tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen por procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración de afinidad por arrastre del dominio V_H y V_L. La mutagénesis aleatoria de CDR y/o restos flanqueantes se describe por: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

La expresión "anticuerpo de especie principal" en este documento se refiere a la estructura del anticuerpo en una composición que es la molécula de anticuerpo cuantitativamente predominante en la composición. En una realización, el anticuerpo de especie principal es un anticuerpo contra HER2, tal como un anticuerpo que se une al Dominio II de HER2, un anticuerpo que se une a la dimerización de HER de forma más eficaz que trastuzumab, y/o un anticuerpo que se une a un sitio de unión heterodimérico de HER2. La realización preferida en este documento del anticuerpo de especie principal es uno que comprende las secuencias de aminoácidos variable ligera y variable pesada de las SEC ID N° 3 y 4, y más preferiblemente que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada de las SEC ID N° 13 y 14, (pertuzumab).

Un anticuerpo "variante de secuencia de aminoácidos" en este documento es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos que difiere de un anticuerpo de especie principal. Habitualmente, las variantes de secuencia de aminoácidos poseen al menos aproximadamente un 70 % de homología con el anticuerpo de especie principal y, preferiblemente, serán al menos aproximadamente un 80 %, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 % homólogas con el anticuerpo de especie principal. Las variantes de secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones, y/o adiciones en ciertas posiciones dentro o adyacentes a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de especie principal. Ejemplos de variantes de secuencia de aminoácidos en este documento incluyen una variante ácida (por ejemplo, variante de anticuerpo desamidada), una variante básica, un anticuerpo con una extensión líder amino-terminal (por ejemplo, VHS-) en una o dos cadenas ligeras del mismo, un anticuerpo con un resto de lisina C-terminal en una o dos cadenas pesadas del mismo, etc., e incluye combinaciones de variaciones en las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y/o ligera. La variante de anticuerpo de interés particular en este documento es el anticuerpo que comprenden una extensión líder amino-terminal en una o dos cadenas ligeras del mismo, opcionalmente comprendiendo adicionalmente otras diferencias de secuencia de aminoácidos y/o glucosilación con relación al anticuerpo de especie principal.

Un anticuerpo "variante de glucosilación" en este documento es un anticuerpo con uno o más restos de carbohidrato unidos al mismo que difieren de uno o más restos de carbohidrato unidos a un anticuerpo de especie principal. Ejemplos de variantes de glucosilación en este documento incluyen un anticuerpo con una estructura oligosacárida G1 o G2, en lugar de una estructura oligosacárida G0, unida a una región Fc del mismo, un anticuerpo con uno o dos restos carbohidrato unidos a una o dos cadenas ligeras del mismo, un anticuerpo sin carbohidrato unido a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, etc., y combinaciones de alteraciones de glucosilación.

Cuando el anticuerpo tiene una región Fc, puede unirse una estructura oligosacárida a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, por ejemplo, en el resto 299 (298, numeración EU de restos). Para pertuzumab, G0 era la estructura oligosacárida predominante, hallándose otras estructuras oligosacáridas tales como G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) y G2 en cantidades inferiores en la composición de pertuzumab.

Salvo que se indique de otro modo, una "estructura oligosacárida G1" en este documento incluye estructuras G-1, G1-1, G1(1-6) y G1(1-3).

Una "extensión líder amino-terminal" en este documento se refiere a uno o más restos aminoacídicos de la secuencia líder amino-terminal que están presentes en el extremo amino-terminal de una cualquiera o más cadenas pesadas o ligeras de un anticuerpo. Una extensión líder amino-terminal ejemplar comprende o consta de tres restos aminoacídicos, VHS, presentes en una o ambas cadenas ligeras de un anticuerpo variante.

Un anticuerpo "desamidado" es uno en que uno o más restos de asparagina del mismo se han derivatizado, por ejemplo, en ácido aspártico, succinimida, o ácido iso-aspártico.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen el estado fisiológico en mamíferos que está normalmente caracterizado por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma (incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma, y cáncer de células de los islotes), mesotelioma, schwannoma (incluyendo neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma, y leucemia o neoplasias linfoides. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer

- pulmonar incluyendo cáncer pulmonar microcítico (SCLC), cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama metastásico),
- 5 cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de el endometrio o útero, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores del tracto biliar, así como cáncer de cabeza y cuello.
- 10 Un cáncer "avanzado" es uno que se ha propagado fuera del sitio u órgano de origen, por invasión local o metástasis.
- Un cáncer "refractario" es uno que progresa incluso aunque se esté administrando un agente antitumoral, tal como un agente quimioterapéutico, al paciente con cáncer. Un ejemplo de un cáncer refractario es uno que es refractario a
- 15 platino.
- Un cáncer "recurrente" es uno que ha vuelto a crecer, en el sitio inicial o en un sitio distante, después de una respuesta a la terapia inicial.
- 20 En este documento, un "paciente" es un paciente humano. El paciente puede ser un "paciente con cáncer", es decir, uno que padece o está en riesgo de padecer uno o más síntomas de cáncer.
- Una "muestra tumoral" en este documento es una muestra obtenida de, o que comprende células tumorales del tumor de un paciente. Ejemplos de muestras tumorales en este documento incluyen, aunque sin limitación, biopsias
- 25 tumorales, células tumorales en circulación, proteínas plasmáticas en circulación, fluido ascítico, cultivos celulares primarios o líneas celulares obtenidas de tumores o que muestran propiedades tipo tumoral, así como muestras tumorales conservadas, tales como fijadas en formalina, muestras tumorales embebidas en parafina o muestras tumorales congeladas.
- 30 Una muestra tumoral "fijada" es una que se ha conservado histológicamente usando un agente de fijación.
- Una muestra tumoral "fijada en formalina" es una que se ha conservado usando formaldehído como agente de fijación.
- 35 Una muestra tumoral "embebida" es una rodeada por un medio estable y generalmente duro tal como parafina, cera, celoidina, o una resina. La incrustación hace posible el corte de secciones delgadas para examen microscópico o para la generación de microseries tisulares (TMA).
- 40 Una muestra tumoral "embebida en parafina" es una rodeada por una mezcla purificada de hidrocarburos sólidos derivados del petróleo.
- En este documento, una muestra tumoral "congelada" se refiere a una muestra tumoral que está, o se ha, congelado.
- 45 Un cáncer o muestra biológica que "presenta expresión, amplificación o activación de HER" es una que, en un ensayo diagnóstico, expresa (incluyendo sobreexpresión) un receptor HER, tiene el gen HER amplificado, y/o demuestra de otro modo activación o fosforilación de un receptor HER.
- Un cáncer o muestra biológica que "presenta activación de HER" es una que, en un ensayo diagnóstico, demuestra
- 50 activación o fosforilación de un receptor HER. Dicha activación puede determinarse directamente (por ejemplo, midiendo la fosforilación de HER por ELISA) o indirectamente (por ejemplo, mediante perfilado de expresión génica o detectando heterodímeros de HER, como se describe en este documento).
- En este documento, "perfilado de la expresión génica" se refiere a una evaluación de la expresión de uno o más
- 55 genes como sustituto para determinar la fosforilación de HER directamente.
- Un "ensayo fosfo-ELISA" en este documento es un ensayo en que se evalúa la fosforilación de uno o más receptores HER, especialmente HER2, en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando un
- 60 reactivo, habitualmente un anticuerpo, para detectar el receptor HER fosforilado, el sustrato, o la molécula de señalización corriente abajo. Preferiblemente, se usa un anticuerpo que detecta HER2 fosforilado. El ensayo puede realizarse sobre lisados celulares, preferiblemente a partir de muestras biológicas recientes o congeladas.
- Una célula cancerosa con "sobre-expresión o amplificación del receptor HER" es una que tiene niveles
- 65 significativamente superiores de una proteína o gen del receptor HER en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo tisular. Dicha sobre-expresión puede estar causada por amplificación génica o por transcripción o traducción aumentada. La sobre-expresión o amplificación del receptor HER puede determinarse en un ensayo de

diagnóstico o pronóstico evaluando niveles aumentados de la proteína HER presente en la superficie de una célula (por ejemplo, mediante un ensayo inmunohistoquímico; IHC). Como alternativa, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica HER en la célula, por ejemplo mediante técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia de southern, o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR a tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). También se puede estudiar la sobre-expresión o amplificación del receptor HER midiendo el antígeno desprendido (por ejemplo, el dominio extracelular de HER) en un fluido biológico tal como suero (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.933.294 expedida el 12 de junio de 1990; el documento WO91/05264 publicado el 18 de abril de 1991; la patente de Estados Unidos 5.401.638 expedida el 28 de marzo de 1995; y Sias et al. J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, están disponibles diversos ensayos *in vivo* para los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden exponerse células dentro del organismo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y puede evaluarse la unión del anticuerpo a las células en el paciente, por ejemplo por escaneo externo para la radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

A la inversa, un cáncer que "no sobre-expresa o amplifica el receptor HER" es uno que no tiene niveles superiores a los normales de la proteína o gen del receptor HER en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo tisular. Pueden usarse anticuerpos que inhiben la dimerización de HER, tales como pertuzumab, para tratar un cáncer que no sobre-expresa o amplifica el receptor HER2.

En este documento, un "agente anti-tumoral" se refiere a un fármaco usado para tratar el cáncer. Ejemplos no limitantes de agentes anti-tumorales en este documento incluyen agentes quimioterapéuticos, inhibidores de la dimerización de HER, anticuerpos contra HER, anticuerpos dirigidos contra antígenos asociados a tumores, compuestos anti-hormonales, citoquinas, fármacos dirigidos a EGFR, agentes anti-angiogénicos, inhibidores de tirosina quinasa, agentes inhibidores del crecimiento y anticuerpos, agentes citotóxicos, anticuerpos que inducen apoptosis, inhibidores de COX, inhibidores de la farnesil transferasa, anticuerpos que se unen a la proteína oncofetal CA 125, vacunas contra GER2, inhibidores de Raf o ras, doxorubicina liposómica, topotecán, taxano, inhibidores duales de tirosina quinasa, TLK286, EMD-7200, pertuzumab, trastuzumab, erlotinib, y bevacizumab.

Un "agente anti-tumoral aprobado" es un fármaco usado para tratar el cáncer para el cual la autoridad reguladora ha concedido la aprobación para su comercialización, tal como la Food and Drug Administration (FDA) o un equivalente extranjero de la misma.

Cuando se administra un inhibidor de la dimerización de HER como "único agente anti-tumoral" éste es el único agente anti-tumoral administrado para tratar el cáncer, es decir, no se administra en combinación con otro agente anti-tumoral, tal como quimioterapia.

Por "opción asistencial convencional" en este documento se entiende el agente o agentes anti-tumorales que se usan de forma rutinaria para tratar una forma particular de cáncer. Por ejemplo, para cáncer de ovario resistente a platino, la opción asistencial convencional es topotecán o doxorubicina liposómica.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa HER *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células que expresan HER en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio diferente a la fase S), tal como agentes que inducen la detención en G1 y la detención en fase M. Los bloqueantes en fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirrubicina, daunorrubicina, etopósido, y bleomicina. Aquellos agentes que detienen en G1 también afectan a la detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse información adicional en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami et al. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la pág. 13.

Ejemplos de anticuerpos "inhibidores del crecimiento" son aquellos que se unen a HER2 e inhiben el crecimiento de las células cancerosas que sobre-expresan HER2. Los anticuerpos preferidos contra HER2 inhibidores del crecimiento inhiben el crecimiento de células tumorales de mama SK-BR-3 en cultivo celular en más del 20 %, y preferiblemente más del 50 % (por ejemplo, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 %) a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml, donde la inhibición del crecimiento se determina seis días después de la exposición de las células SK-BR-3 al anticuerpo (véase la patente de Estados Unidos N° 5.677.171 expedida el 14 de octubre de 1997). El ensayo de inhibición del crecimiento de células SK-BR-3 se describe en más detalle en esa patente y a continuación en este documento. El anticuerpo preferido inhibidor del crecimiento es una variante humanizada del anticuerpo monoclonal murino 4D5, por ejemplo, trastuzumab.

Un anticuerpo que "induce apoptosis" es uno que induce la muerte celular programada determinada por la unión de anexina V, la fragmentación del ADN, la disminución del volumen celular, la dilatación del retículo endoplasmático, la

fragmentación celular, y/o la formación de vesículas de membrana (llamadas cuerpos apoptóticos). La célula es habitualmente una que sobre-expresa el receptor HER2. Preferiblemente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas o vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SK- BR- 3, BT474, Calu 3, MDA- MB- 453, MDA- MB-361 o SKOV3. Están disponibles diversos métodos para evaluar los acontecimientos celulares asociados con apoptosis. Por ejemplo, la traslocación de fosfatidil serina (PS) puede medirse mediante la unión de anexina; la fragmentación del ADN puede evaluarse a través de la formación de ADN escalonado; y la condensación nuclear/de la cromatina junto con la fragmentación del ADN puede evaluarse mediante cualquier aumento en células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo que induce apoptosis es uno que provoca de aproximadamente 2 a 50 veces, preferiblemente de aproximadamente 5 a 50 veces, y mucho más preferiblemente de aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de unión de anexina en relación a células no tratadas en un ensayo de unión a anexina usando células BT474 (véase a continuación). Ejemplos de anticuerpos contra HER2 que inducen apoptosis son 7C2 y 7F3.

El "epítipo 2C4" es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que el anticuerpo 2C4 se une. Para explorar anticuerpos que se unan al epítipo 2C4, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Preferiblemente, el anticuerpo bloquea la unión de 2C4 a HER2 en aproximadamente el 50 % o más. Como alternativa, puede realizarse un mapeado de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 2C4 de HER2. El epítipo 2C4 comprende restos del dominio II en el dominio extracelular de HER2. 2C4 y pertuzumab se unen al dominio extracelular de HER2 en la unión de los dominios I, II y III. Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

El "epítipo 4D5" es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y trastuzumab se unen. Este epítipo está cerca del dominio transmembrana de HER2, y dentro del dominio IV de HER2. Para explorar anticuerpos que se unan al epítipo 4D5, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse un mapeado de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 4D5 de HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más restos en la región desde aproximadamente el resto 529 hasta aproximadamente el resto 625, inclusive del ECD de HER2, incluyendo la numeración de los restos del péptido señal).

El "epítipo 7C2/7F3" es la región en el extremo N terminal, dentro del dominio I, del dominio extracelular de HER2 a la que los anticuerpos 7C2 y/o 7F3 (cada uno depositado en la ATCC, véase a continuación) se unen. Para explorar anticuerpos que se unan al epítipo 7C2/7F3, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse un mapeado de epítipos para establecer si el anticuerpo se une al epítipo 7C2/7F3 en HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más restos en la región desde aproximadamente el resto 22 hasta aproximadamente el resto 53 del ECD de HER2, incluyendo la numeración de los restos del péptido señal).

"Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya tienen cáncer así como aquellos en que tiene que prevenirse la aparición del cáncer. Por tanto, el paciente a tratar en este documento puede haber sido diagnosticado como que tiene cáncer o puede estar predispuesto o ser susceptible al cáncer.

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar el cáncer en el paciente. La cantidad eficaz del fármaco puede reducir la cantidad de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferiblemente detener) la infiltración de las células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en algún grado, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en algún grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. El grado en que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o eliminar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La cantidad eficaz puede prolongar la supervivencia libre de progresión (por ejemplo, medida por los Criterios de Evaluación de Respuesta para Tumores Sólidos, RECIST, o cambios en CA-125), provocar una respuesta objetiva (incluyendo una respuesta parcial, PR, o respuesta completa, CR), aumentar el tiempo global de supervivencia, y/o mejorar uno o más síntomas del cáncer (por ejemplo, evaluados por FOSI).

La expresión "agente citotóxico" como se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Se entiende que el término incluye isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuaona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; TLK 286 (TELCYTA™); acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido

betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatrina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato del óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; bisfosfonatos, tales como clodronato; antibióticos tales como antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 11 y caliqueamicina omega 11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)) y antraciclina tales como annamicina, AD 32, alcarrubicina, daunorrubicina, dexrazoxano, DX-52-1, epirubicina, GPX-100, idarrubicina, KRN5500, menogarilo, dinemicina, incluyendo dinemicina A, una esperamicina, cromóforo de neocarzinostatin y cromóforos relacionados de antibióticos de cromoproteína enediina, aclacinomisinas, actinomycin, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomycin, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomycin, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, doxorubicina liposómica, y desoxidoxorrubicina), esorrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, y zorrubicina; análogos de ácido fólico tales como denopterina, pteropterina, y trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, y tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, encitabina, y floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, y testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, y trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido polínico (leucovorina); aceglatona; agentes anti-neoplásicos anti-folato tales como ALIMTA®, LY231514 pemetrexed, inhibidores de la dihidrofolato reductasa tales como metotrexato, anti-metabolitos tales como 5-fluorouracilo (5-FU) y sus profármacos tales como UFT, S-1 y capecitabina, e inhibidores de la timidilato sintasa e inhibidores de la ribonucleótido formiltransferasa de glicinamida tales como raltitrexed (TOMUDEX^{RM}, TDX); inhibidores de la dihidropirimidina deshidrogenasa tales como eniluracilo; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epitolona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides y taxanos, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANETM libre de cremofor, formulación nanoparticulada modificada con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y docetaxel TAXOTERE® (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; platino; análogos de platino o análogos basados en platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); alcaloide de la vinca; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales farmacéuticamente aceptables, ácido o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado con 5-FU y leucovorina.

También se incluyen en esta definición agente anti-hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre los tumores tales como anti-estrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM) incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno FARESTON®; inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4-(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®; y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolano del nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®, rmRH ABARELIX®; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. Un "agente quimioterapéutico antimetabolito" es un agente que es estructuralmente similar a un metabolito, pero que no puede usarse por el organismo de un modo productivo. Muchos agentes quimioterapéuticos antimetabolitos interfieren con la producción de los ácidos nucleicos, ARN y ADN. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos antimetabolitos incluyen gemcitabina (GEMZAR®), 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina (XELODATM), 6-mercaptopurina, metotrexato, 6-tioguanina, pemetrexed,

raltitrexed, arabino-silcitosina ARA-C citarabina (CYTOSAR-U®), dacarbazina (DTIC-DOME®), azocitosina, desoxicitosina, pirimidina, fludarabina (FLUDARA®), cladribina, 2-deseoxi-D-glucosa etc. El agente quimioterapéutico antimetabolito preferido es gemcitabina.

5 La "gemcitabina" o "monoclorhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero b)" es un análogo nucleosídico que muestra actividad antitumoral. La fórmula empírica para gemcitabina HCl es C₉H₁₁F₂N₃O₄·HCl. La gemcitabina HCl está comercializada por Eli Lilly con la marca registrada GEMZAR®.

10 Un "agente quimioterapéutico basado en platino" comprende un compuesto orgánico que contiene platino como parte integral de la molécula. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos basados en platino incluyen carboplatino, cisplatino, y oxaliplatino.

Por "quimioterapia basada en platino" se entiende terapia con uno o más agentes quimioterapéuticos basados en platino, opcionalmente en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos diferentes.

15 Por cáncer "resistente a quimioterapia" se entiende que el paciente con cáncer ha progresado mientras recibía un régimen de quimioterapia (es decir, el paciente es "refractario a quimioterapia"), o el paciente ha progresado en 12 meses (por ejemplo, en 6 meses) después de completar un régimen de quimioterapia.

20 Por cáncer "resistente a platino" se entiende que el paciente con cáncer ha progresado mientras recibía quimioterapia basada en platino (es decir el paciente es "refractario a platino"), o el paciente ha progresado en 12 meses (por ejemplo, en 6 meses) después de completar un régimen de quimioterapia basada en platino.

25 Un "agente anti-angiogénico" se refiere a un compuesto que bloquea, o interfiere en algún grado, con el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor anti-angiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o anticuerpo que se une a un factor de crecimiento a un receptor de factor de crecimiento implicado en la promoción de la angiogénesis. El factor anti-angiogénico preferido en este documento es un anticuerpo que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), tal como bevacizumab (AVASTIN®).

30 El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas del crecimiento tales como la hormona del crecimiento humana, la hormona del crecimiento humana con N-metiliónilo, y la hormona del crecimiento bovina; la hormona paratiroide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; pro-relaxina; hormonas glucoproteicas tales como la hormona foliculo-estimulante (FSH), la hormona estimuladora de tiroides (TSH), y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; el lactógeno placentario; el factor de necrosis tumoral- α y - β ; la sustancia inhibidora mulleriana; el péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento del endotelio vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- β ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; el factor de crecimiento-I y -II de tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón- α , - β , y - γ ; factores estimuladores de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y el ligando kit (KL). Como se usa en este documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

Como se usa en este documento, la expresión "fármaco dirigido a EGFR" se refiere a un agente terapéutico que se une a EGFR y, opcionalmente, inhibe la activación de EGFR. Ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, la patente de Estados Unidos N° 4.943.533, Mendelsohn et al.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano reconformado (H225) (véase, el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo dirigido a EGFR completamente humano (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (patente de Estados Unidos N° 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF (véase el documento WO98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A: 636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo humanizado para EGFR dirigido contra EGFR que compete tanto con EGF como con TGF-alfa por la unión a EGFR; y mAb 806 o mAb humanizado 806 (Johns et al., J. Biol. Chem. 279 (29): 30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR puede conjugarse con un agente citotóxico, generando de este modo un inmunoc conjugado (véase, por ejemplo, EP659, 439A2, Merck Patent GmbH). Ejemplos de moléculas pequeñas que se unen a EGFR incluyen ZD1839 o Gefitinib (IRESSA™; Astra Zeneca); CP-358774 o Erlotinib (TARCEVA™; Genentech/OSI); y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen); EMD-7200.

65 Un "inhibidor de tirosina quinasa" es una molécula que inhibe la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa tal

como un receptor HER. Ejemplos de dichos inhibidores incluyen los fármacos dirigidos a EGFR indicados en el párrafo precedente; el inhibidor de tirosina quinasa HER2 de molécula pequeña tal como TAK165 disponible en Takeda; CP-724.714, un inhibidor selectivo oral del receptor tirosina quinasa ErbB2 (Pfizer y OSI); inhibidores duales de HER tales como EKB-569 (disponible en Wyeth) que se une de forma preferente a EGFR pero inhibe a células que sobre-expresan tanto HER2 como EGFR; GW572016 (disponible en Glaxo) un inhibidor oral de tirosina quinasa HER2 y EGFR; PKI-166 (disponible en Novartis); inhibidores pan-HER tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de Raf-1 tales como el agente antisentido ISIS-5132 disponible en ISIS Pharmaceuticals que inhibe la señalización de Raf-1; inhibidores de TK no dirigido a HER tales como mesilato de Imatinib (Gleevac™) disponible en Glaxo; el inhibidor de la quinasa I regulado por MAPK extracelular CI-1040 (disponible en Pharmacia); quinazolininas, tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino)quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d] pirimidinas; curcumina (diferuloilmetano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen restos de nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (por ejemplo, aquellas que se unen a ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (patente de Estados Unidos Nº 5.804.396); trifostinas (patente de Estados Unidos Nº 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores pan-HER tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de Imatinib (Gleevac; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: patente de Estados Unidos Nº 5.804.396; WO99/09016 (American Cyanamid); WO98/43960 (American Cyanamid); WO97/38983 (Warner Lambert); WO99/06378 (Warner Lambert); WO99/06396 (Warner Lambert); WO96/30347 (Pfizer, Inc); WO96/33978 (Zeneca); WO96/3397 (Zeneca); y WO96/33980 (Zeneca).

Una dosis "fija" o "plana" de un agente terapéutico en este documento se refiere a una dosis que se administra a un paciente humano independientemente del peso (WT) o área de superficie corporal (BSA) del paciente. La dosis fija o plana por lo tanto no se proporciona como una dosis de mg/kg o una dosis de mg/m², sino que en su lugar es una cantidad absoluta del agente terapéutico.

Una dosis "de carga" en este documento generalmente comprende una dosis inicial de un agente terapéutico administrada a un paciente, y está seguida de una o más dosis de mantenimiento del mismo. Generalmente, se administra una única dosis de carga, pero se contemplan múltiples dosis de carga en este documento. Habitualmente, la cantidad de dosis de carga administrada excede la cantidad de dosis de mantenimiento administrada y/o la dosis o las dosis de carga se administran de forma más frecuente que la dosis o las dosis de mantenimiento, para conseguir la concentración estacionaria deseada del agente terapéutico antes de cuando puede conseguirse con la dosis o las dosis de mantenimiento.

Una dosis "de mantenimiento" en este documento se refiere a una o más dosis de un agente terapéutico administradas al paciente durante un periodo de tratamiento. Habitualmente, las dosis de mantenimiento se administran a intervalos de tratamiento espaciados, tal como aproximadamente cada semana, aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente cada 3 semanas, o aproximadamente cada 4 semanas.

40

II. Producción de anticuerpos

Como, preferiblemente, el inhibidor de la dimerización de HER es un anticuerpo, a continuación se proporciona una descripción en cuanto a técnicas ejemplares para la producción de anticuerpos contra HER. El antígeno HER a usar para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de un receptor HER o una parte del mismo, que contiene el epítipo deseado. Como alternativa, pueden usarse células que expresan HER en su superficie celular (por ejemplo, células NIH-3T3 transformadas para sobreexpresar HER2; o una línea celular de carcinoma tal como células SK-BR-3, véase Stancovski et al. PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991)) para generar anticuerpos. Otras formas de receptor HER útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los especialistas en la técnica.

50

(i) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales preferiblemente se crean en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que sea inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o de derivatización, por ejemplo, éster de sulfosuccinimida de maleimidobenzóilo (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂, o R¹N=C=NR, donde R y R¹ son diferentes grupos alquilo.

60

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados combinando, por ejemplo, 100 µg o 5 µg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. De 7 a 14 días después los animales se exanguinan y se ensaya el suero

65

para el título de anticuerpo. Los animales se refuerzan hasta que el título alcanza un nivel estable. Preferiblemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo diferente de reticulación. Los conjugados también pueden prepararse en cultivo de células recombinantes en forma de fusiones proteicas. Además, se usan adecuadamente agentes de agregación tales como alumbre para potenciar la respuesta inmune.

(ii) *Anticuerpos monoclonales*

Están disponibles diversos métodos en la técnica para preparar anticuerpos monoclonales de este documento. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden crearse usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), por métodos de ADN recombinante (patente de Estados Unidos N° 4.816.567).

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

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

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de forma eficaz, soportan una producción estable a alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. También se han descritos líneas celulares de mieloma humanas y de heteromioma de ratón-humanas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); y Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Decker, Inc., New York, 1987)).

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

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

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

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

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

En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348:552-

554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Posteriores publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por arrastre de cadena (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

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

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

(iii) Anticuerpos humanizados

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos se han descrito en la técnica. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoacídicos introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. Estos restos aminoacídicos no humanos a menudo se conocen como restos "importados", que se cogen normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos N° 4.816.567) donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no human. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

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

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

El documento WO01/00245 describe la producción de anticuerpos ejemplares contra HER2 humanizados que se unen a HER2 y bloquean la activación por ligando de un receptor HER. El anticuerpo humanizado de particular interés en este documento bloquea la activación mediada por EGF, TGF- α y/o HRG de MAPK esencialmente de forma tan eficaz como el anticuerpo monoclonal murino 2C4 (o un fragmento Fab del mismo) y/o se une a HER2 esencialmente de forma tan eficaz como el anticuerpo monoclonal murino 2C4 (o un fragmento Fab del mismo). El anticuerpo humanizado de este documento puede comprender, por ejemplo, restos no humanos de la región hipervariable incorporados en un dominio pesado variable humano y puede comprender adicionalmente una

sustitución de la región flanqueante (FR) en una posición seleccionada entre el grupo que consiste en 69H, 71H y 73H utilizando el sistema de numeración de dominios variables expuesto en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones en FR en dos o todas las posiciones 69H, 71H y 73H.

Un anticuerpo humanizado ejemplar de interés de este documento comprende los restos determinantes de complementariedad del dominio pesado variable residuos GFTFTDYTMX, donde X es preferiblemente D o S (SEC ID N°: 7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEC ID N°: 8); y/o NLGPSFYFDY (SEC ID N°: 9), que comprenden opcionalmente modificaciones aminoacídicas en los restos CDR, por ejemplo, donde las modificaciones mantienen esencialmente o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo variante de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias CDR pesadas variables anteriores. Dichos anticuerpos variantes pueden prepararse por maduración de afinidad, por ejemplo, como se describe a continuación. El anticuerpo humanizado más preferido comprende la secuencia de aminoácidos del dominio pesada variable de la SEC ID N° 4.

El anticuerpo humanizado puede comprender restos determinantes de complementariedad del dominio ligero variable KASQDVSIGVA (SEC ID N°: 10); SASYX¹X²X³, donde X¹ es preferiblemente R o L, X² es preferiblemente Y o E, y X³ es preferiblemente T o S (SEC ID N°: 11); y/o QQYYIYPYT (SEC ID N°: 12), por ejemplo, además de los restos CDR del dominio pesado variable en el párrafo precedente. Dichos anticuerpos humanizados opcionalmente comprenden modificaciones de aminoácidos de los restos CDR anteriores, por ejemplo, donde las modificaciones esencialmente mantienen o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo variante de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias anteriores de CDR ligera variable. Dichos anticuerpos variantes pueden prepararse por maduración de afinidad, por ejemplo, como se describe a continuación. El anticuerpo humanizado más preferido comprende la secuencia de aminoácidos del dominio ligero variable de la SEC ID N° 3.

La presente solicitud también comprende anticuerpos de afinidad madurada que se unen a HER2 y bloquean la activación por ligando de un receptor HER. El anticuerpo precursor puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, por ejemplo, uno que comprende las secuencias ligera variable y/o pesada variable de las SEC ID N° 3 y 4, respectivamente (es decir, que comprende el VL y/o VH de pertuzumab). El anticuerpo de afinidad madurada preferiblemente se une al receptor HER2 con una afinidad superior a la de 2C4 murino o pertuzumab (por ejemplo, afinidad mejorada de aproximadamente dos a aproximadamente cuatro veces, a aproximadamente 100 veces o aproximadamente 1000 veces, por ejemplo, como se evalúa usando un ELISA del dominio extracelular (ECD) de HER2). Los restos CDR pesados variables ejemplares para sustitución incluyen H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, o combinaciones de dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o siete de estos restos). Ejemplos de restos CDR ligeros variables para alteración incluyen L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 o combinaciones de dos o más (por ejemplo, dos a tres, cuatro, cinco o hasta aproximadamente diez de estos restos).

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado o anticuerpo de afinidad madurada. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o anticuerpo de afinidad madurada puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos para generar un inmunoconjugado. Como alternativa, el anticuerpo humanizado o anticuerpo de afinidad madurada puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto. El anticuerpo IgG1 intacto preferido comprende la secuencia de cadena ligera de la SEC ID N° 13 y secuencia de cadena pesada de la SEC ID N° 14.

(iv) Anticuerpos humanos

Como alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que una delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal provoca la inhibición completa de producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la serie génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal provocará la producción de anticuerpos humanos tras exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y las patentes de Estados Unidos N° 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807. Como alternativa, puede usarse tecnología de presentación en fagos (McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios del gen dominio variable de inmunoglobulina (V) de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en fase en un gen de proteína de envuelta principal o minoritario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presenta como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula fágica. Como la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también provocarán la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fago puede realizarse en diversos formatos; para su

revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de gen V para presentación en fagos. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) aislaron una serie diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados puede construirse y pueden aislarse los anticuerpos contra una serie diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), o Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Véanse, también, las patentes de Estados Unidos N° 5.565.332 y 5.573.905.

10 Como se ha analizado anteriormente, también pueden generarse anticuerpos humanos por células B activadas *in vitro* (véanse las patentes de Estados Unidos N° 5.567.610 y 5.229.275).

Los anticuerpos contra HER2 humano se describen en la patente de Estados Unidos N° 5.772.997 expedida el 30 de junio de 1998 y el documento WO 97/00271 publicado el 3 de enero de 1997.

15 (v) *Fragmentos de anticuerpo*

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo que comprenden una o más regiones de unión a antígeno. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtienen mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); y Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse fragmentos F(ab')₂ directamente de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para los expertos en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la patente de Estados Unidos N° 5.571.894; y la patente de Estados Unidos N° 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) *Anticuerpos biespecíficos*

35 Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítomos diferentes. Anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítomos diferentes de la proteína HER2. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a HER2 con uno o más sitios de unión para EGFR, HER3 y/o HER4. Como alternativa, puede combinarse un brazo HER2 con un brazo que se une a una molécula activadora en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular contra la célula que expresa HER2. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos para células que expresan HER2. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a HER2 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, la cadena A del alcaloide de la vinca ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico HER2/FcγRIII y la patente de Estados Unidos N° 5.837.234 desvela un anticuerpo biespecífico HER2/FcγRI IDM1 (Osidem). Se muestra un anticuerpo biespecífico HER2/Fcα en el documento WO98/02463. La patente de Estados Unidos N° 5.821.337 muestra un anticuerpo biespecífico HER2/CD3. MDX-210 es un Ab biespecífico HER2-FcγRIII.

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la co-expresión de dos pares cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). A causa de la redistribución aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas diferentes de anticuerpo, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se hace por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Trauneker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

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

(CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, esté presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina, y se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se inserten en vectores de expresión diferentes, y se introduzcan por co-transfección en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en que proporciones no iguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionen rendimientos óptimos. Es decir, sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales provoquen rendimientos mayores o cuando las proporciones son de significado no particular.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones no deseadas de cadena de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales en la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la patente de Estados Unidos N° 5.731.168, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recupera de cultivo de células recombinantes. La superficie de contacto preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se reemplaza una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácido grande con los más pequeños (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

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

También se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlaces químicos. Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985) describen un procedimiento donde anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de formación de complejos ditiol arsenito sódico para estabilizar los ditiolos cercanos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados después se convierten en derivados tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB después se reconvierte en el Fab' tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los progresos recientes han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizada. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse a células que sobre-expresaban el receptor HER2 y células T humanas normales, así como de activar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y después se re-oxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la

misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a aparearse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha presentado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

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

(vii) *Otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos*

10 Se contemplan una o más modificaciones de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en este documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se prepararan introduciendo cambios apropiados de nucleótidos en el ácido nucleico del anticuerpo, o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución se hace para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos post-traduccionales del anticuerpo, tal como el cambio en la cantidad o posición de los sitios de glucosilación.

20 Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis se llama "mutagénesis por exploración de alanina" como se describe por Cunningham y Wells Science, 244:1081-1085 (1989). Aquí, un resto o grupo de restos diana se identifican (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lis, y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácido que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones entonces se refinan introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no tiene que predeterminarse. Por ejemplo, para analizar el funcionamiento de una mutación en un sitio dado, se realiza mutagénesis por exploración de alanina o aleatoria en el codón o región diana y se exploran las variantes de anticuerpo expresadas para la actividad deseada.

35 Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de uno o múltiples restos aminoácídicos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen el anticuerpo con un resto metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C-terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

40 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un resto aminoácídico en la molécula de anticuerpo reemplazado por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 1 bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones provocan un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, y se exploran los productos.

Tabla 1

Resto Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; De	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg

Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se consiguen seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, en forma de una conformación de lámina o helicoide, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., pág. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His(H)

Como alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basados en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el entrecruzamiento aberrante. A la inversa, pueden añadirse uno o más enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con relación al anticuerpo precursor a partir del cual se han generado. Un modo conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica la maduración de afinidad usando presentación en fagos. En resumen, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos variantes generados de este modo se presentan de un modo monovalente a partir de partículas fágicas filamentosas como fusiones con el producto del gen III M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fago después se exploran para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como desvela en este documento. Para identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para modificación, puede realizarse mutagénesis por exploración con alanina para identificar los restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y HER2 humano. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en este documento. Una vez se han generado dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración como se describe en este documento y pueden seleccionarse los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón original de glucosilación del anticuerpo. Por alteración se entiende delecionar uno o más restos de carbohidrato hallados en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de los anticuerpos esta normalmente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-

serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crean un sitio potencial de glucosilación. La glucosilación O ligada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a la misma puede alterarse. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura madura de carbohidrato que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos N° US 2003/0157108 A1, Presta, L. Véase también el documento US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina biseccionada (GlcNAc) en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo se menciona en el documento WO03/011878, Jean-Mairet et al. y la patente de Estados Unidos N° 6.602.684, Umana *et al.* Los anticuerpos al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se presentan en el documento WO97/30087, Patel et al. Véase también, el documento WO98/58964 (Raju, S.) y el documento WO99/22764 (Raju, S.) que se refieren a anticuerpos con carbohidrato alterado unido a la región Fc de los mismos.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, puede introducirse uno o más restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener capacidad mejorada de internalización y/o un aumento en la eliminación celular mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Véase Caron et al., *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada también pueden prepararse usando agentes de entrecruzamiento bifuncionales como se describe en Wolff et al. *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Como alternativa, puede modificarse por ingeniería un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y de este modo pueden obtenerse capacidades potenciadas de lisis mediada por el complemento y ADCC. Véase, Stevenson et al. *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

El documento WO00/42072 (Presta, L.) describe anticuerpos con función ADCC mejorada en presencia de células efectoras humanas, donde los anticuerpos comprenden sustituciones de aminoácidos en la región Fc de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo con ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de los restos). Preferiblemente, la región Fc alterada es una región Fc de IgG1 humana que comprende o consiste en sustituciones de una, dos o tres de estas posiciones. Dichas sustituciones se combinan opcionalmente con una o más sustituciones que aumenten la unión a C1q y/o CDC.

Se describen anticuerpos con unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas en el documento WO99/51642, la patente de Estados Unidos N° 6.194.551B1, la patente de Estados Unidos N° 6.242.195B1, la patente de Estados Unidos N° 6.528.624B1 y la patente de Estados Unidos N° 6.538.124 (Idusogie et al.). Los anticuerpos comprenden una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones aminoacídicas 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de la región Fc de los mismos (numeración Eu de los restos).

Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en este documento, el término "epítipo de unión a receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula IgG.

Se describen anticuerpos con unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), y semividas aumentadas, en el documento WO00/42072 (Presta, L.) y el documento US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en los mismos que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Por ejemplo, la región Fc puede tener sustituciones en una o más de las posiciones 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 ó 434 (numeración Eu de los restos). El anticuerpo variante que comprende la región Fc preferido con unión a FcRn mejorada comprende sustituciones de aminoácidos en una, dos o tres de las posiciones 307, 380 y 434 de la región Fc del mismo (numeración Eu de los restos).

También se contemplan anticuerpos modificados por ingeniería con tres o más (preferiblemente cuatro) sitios de unión a antígeno funcionales (solicitud de Estados Unidos N° US2002/0004587 A1, Miller et al.).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se prepararan por diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, aunque sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis con casete de una variante preparada previamente o una versión no variante del anticuerpo.

(viii) Exploración en busca de anticuerpos con las propiedades deseadas

Las técnicas para generar anticuerpos se han descrito anteriormente. Adicionalmente pueden seleccionarse anticuerpos con ciertas características biológicas, según se desee.

Para identificar un anticuerpo que bloquee la activación por ligando de un receptor HER, puede determinarse la capacidad del anticuerpo de bloquear la unión del ligando de HER a células que expresan el receptor HER (por ejemplo, en conjugación con otro receptor HER con que el receptor HER de interés forma un hetero-oligómero HER). Por ejemplo, pueden incubarse células que expresan de forma natural, o transfectadas para expresar, receptores HER del hetero-oligómero HER con el anticuerpo y después exponerse al ligando de HER marcado. La capacidad del anticuerpo de bloquear la unión del ligando al receptor HER en el hetero-oligómero HER puede evaluarse después.

Por ejemplo, la inhibición de la unión de HRG a líneas celulares de tumor de mama MCF7 por anticuerpos contra HER2 puede realizarse usando cultivos en monocapa de MCF7 en hielo en un forma de placa de 24 pocillos esencialmente como se describe en el documento WO01/00245. Pueden añadirse los anticuerpos monoclonales contra HER2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos. Después puede añadirse rHRGβ₁₁₇₇₋₂₂₄ marcado con ¹²⁵I (25 pM), y puede continuarse la incubación durante 4 a 16 horas. Pueden prepararse curvas de respuesta a dosis y puede calcularse un valor de CI₅₀ para el anticuerpo de interés. En una realización, el anticuerpo que bloquea la activación por ligando de un receptor HER tendrá una CI₅₀ para inhibir la unión de HRG a células MCF7 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferiblemente de 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, la CI₅₀ para inhibir la unión de HRG a células MCF7 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menos, más preferiblemente de 50 nM o menos.

Como alternativa, o adicionalmente, puede ensayarse la capacidad de un anticuerpo de bloquear la fosforilación de tirosina estimulada por el ligando de HER de un receptor HER presente en un hetero-oligómero de HER. Por ejemplo, pueden incubarse células que expresan de forma endógena los receptores HER o transfectadas para expresarlos con el anticuerpo y después ensayarse para la actividad de fosforilación de tirosina dependiente del ligando de HER usando un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (que está opcionalmente conjugado con un marcador detectable). El ensayo de activación del receptor quinasa descrito en la patente de Estados Unidos N° 5.766.863 también está disponible para determinar la activación del receptor HER y el bloqueo de esa actividad por un anticuerpo.

En una realización, se puede explorar en busca de un anticuerpo que inhiba la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina p180 en células MCF7 esencialmente como se describe en el documento WO01/00245. Por ejemplo, las células MCF7 pueden sembrarse en placas de 24 pocillos y pueden añadirse anticuerpos monoclonales contra HER2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente; después puede añadirse rHRGβ₁₁₇₇₋₂₄₄ a cada pocillo a una concentración final de 0,2 nM, y puede continuarse la incubación durante 8 minutos. Pueden aspirarse los medios de cada pocillo, y pueden detenerse las reacciones mediante la adición de 100 µl de tampón de muestra SDS (SDS al 5 %, DTT 25 mM, y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25 µl) puede someterse a electroforesis en un gel de gradiente del 4-12 % (Novex) y después transferirse electroforéticamente a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Pueden revelarse inmunotransferencias antifosfotirosina (a 1 µg/ml), y puede cuantificarse la intensidad de la banda reactiva predominante a M, -180.000 por densitometría de reflectancia. El anticuerpo seleccionado inhibirá preferiblemente de forma significativa la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina p180 a aproximadamente el 0-35 % del control en este ensayo. Puede prepararse una curva de respuesta a dosis para la inhibición de la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina p180 determinada por densitometría de reflectancia y puede calcularse una CI₅₀ para el anticuerpo de interés. En una realización, el anticuerpo que bloquea la activación por ligando de un receptor HER tendrá una CI₅₀ para inhibir la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina p180 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferiblemente de 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, la CI₅₀ para inhibir la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina p180 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menos, más preferiblemente de 50 nM o menos.

También pueden evaluarse los efectos inhibidores del crecimiento del anticuerpo sobre células MDA-MB-175, por ejemplo, esencialmente como se describe en Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997). De acuerdo con este ensayo, pueden tratarse células MDA-MB-175 con un anticuerpo monoclonal contra HER2 (10 µg/ml) durante 4 días y teñirse con cristal violeta. La incubación con un anticuerpo contra HER2 puede mostrar un efecto inhibidor del crecimiento sobre esta línea celular similar al presentado por el anticuerpo monoclonal 2C4. En una realización

adicional, la HRG exógena no revertirá de forma significativa esta inhibición. Preferiblemente, el anticuerpo será capaz de inhibir la proliferación celular de células MDA-MB-175 a un grado mayor que el anticuerpo monoclonal 4D5 (y opcionalmente a un grado mayor que el anticuerpo monoclonal 7F3), tanto en presencia como en ausencia de HRG exógena.

5 En una realización, el anticuerpo contra HER2 de interés puede bloquear la asociación dependiente de heregulina de HER2 con HER3 en células tanto MCF7 como SK-BR-3 como se determina en un experimento de co-inmunoprecipitación tal como el descrito en el documento WO01/00245 de forma sustancialmente más eficaz que el anticuerpo monoclonal 4D5, y preferiblemente de forma sustancialmente más eficaz que el anticuerpo monoclonal 7F3.

15 Para identificar anticuerpos contra HER2 inhibidores del crecimiento, se puede explorar en busca de anticuerpos que inhiban el crecimiento de células cancerosas que sobre-expresan HER2. En una realización, el anticuerpo inhibidor del crecimiento de elección es capaz de inhibir el crecimiento de células SK-BR-3 en cultivo celular en aproximadamente el 20-100 % y preferiblemente en aproximadamente el 50-100 % a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. Para identificar estos anticuerpos, puede realizarse el ensayo de SK-BR-3 descrito en la patente de Estados Unidos N° 5.677.171. De acuerdo con este ensayo, se cultivan células SK-BR-3 en una mezcla 1:1 de medio F12 y DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina y penicilina estreptomycin. Las células SK-BR-3 se siembran a 20.000 células en una placa de cultivo celular de 35 mm (2 ml/placa de 35 mm). Se añaden de 0,5 a 30 µg/ml del anticuerpo contra HER2 por placa. Después de seis días, se cuenta la cantidad de células, en comparación con las células no tratadas usando un contador celular COULTER™ electrónico. Aquellos anticuerpos que inhiben el crecimiento de las células SK-BR-3 en aproximadamente el 20-100 % o aproximadamente el 50-100 % pueden seleccionarse como anticuerpos inhibidores del crecimiento. Véase la patente de Estados Unidos N° 5.677.171 para ensayos para explorar en busca de anticuerpos inhibidores del crecimiento, tales como 4D5 y 3E8.

30 Para seleccionar anticuerpos que inducen la apoptosis, está disponible un ensayo de unión a anexina usando células BT474. Las células BT474 se cultivan y siembran en placas como se ha analizado en el párrafo precedente. El medio después se retira y se reemplaza con medio fresco solamente o medio que contiene 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal. Después de un periodo de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se desprenden por tratamiento con tripsina. Las células después se centrifugan, se resuspenden en tampón de unión a Ca²⁺ y se dividen en alícuotas en tubos como se ha analizado anteriormente para un ensayo de muerte celular. Los tubos después reciben anexina marcada (por ejemplo, anexina V-FTIC) (1 µg/ml). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y el software FACSCONVERT™ de CellQuest (Becton Dickinson). Aquellos anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión de anexina respecto al control se seleccionan como anticuerpos inductores de apoptosis. Además del ensayo de unión a anexina, está disponible un ensayo de tinción de ADN usando células BT474. Para realizar este ensayo, se incuban células BT474 que se han tratado con el anticuerpo de interés como se ha descrito en los dos párrafos precedentes con 9 µg/ml de HOECHST 33342™ durante 2 h a 37°C, después se analizan en un citómetro de flujo EPICS ELITE™ (Coulter Corporation) usando el software MODFIT LT™ (Verity Software House). Los anticuerpos que inducen un cambio en el porcentaje de células apoptóticas que es 2 veces o mayor (y preferiblemente 3 veces o mayor) que el de las células no tratadas (hasta el 100 % de células apoptóticas) pueden seleccionarse como anticuerpos pro-apoptóticos usando este ensayo. Véase el documento WO98/17797 para ensayos para explorar en busca de anticuerpos que inducen la apoptosis, tales como 7C2 y 7F3.

45 Para explorar en busca de anticuerpos que se unan a un epítipo sobre HER2 unido por un anticuerpo de interés, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988), para evaluar si el anticuerpo bloquea de forma cruzada la unión de un anticuerpo, tal como 2C4 o pertuzumab, a HER2. Como alternativa, o adicionalmente, puede realizarse un mapeado de epítipos mediante métodos conocidos en la técnica y/o se puede estudiar la estructura anticuerpo-HER2 (Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)) para ver cual o cuales de los dominios de HER2 están unidos por el anticuerpo.

55 *(ix) Composiciones de pertuzumab*

60 En una realización de una composición de anticuerpos contra HER2, la composición comprende una mezcla de un anticuerpo pertuzumab de especie principal y una o más variantes del mismo. La realización preferida en este documento de un anticuerpo pertuzumab de especie principal es uno que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera variable y pesada variable de las SEC ID N° 3 y 4, y más preferiblemente que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada entre las SEC ID N° 13 y 17, y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada entre las SEC ID N° 14 y 18 (incluyendo variantes desamidadas y/o oxidadas de esas secuencias). En una realización, la composición comprende una mezcla del anticuerpo pertuzumab de especie principal y una secuencia de aminoácidos variante del mismo que comprende una extensión líder amino-terminal. Preferiblemente, la extensión líder amino-terminal está en una cadena ligera del anticuerpo variante (por ejemplo, en una o dos cadenas ligeras del anticuerpo variante). El anticuerpo contra HER2

de especie principal o el anticuerpo variante puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos Fab o F(ab')₂), pero preferiblemente ambos son anticuerpos de longitud completa. El anticuerpo variante en este documento puede comprender una extensión líder amino-terminal en una cualquiera o más de las cadenas pesada o ligera del mismo. Preferiblemente, la extensión líder amino-terminal está en una o dos cadenas ligeras del anticuerpo. La extensión líder amino-terminal preferiblemente comprende o consta de VHS-. La presencia de la extensión líder amino-terminal en la composición puede detectarse mediante diversas técnicas analíticas incluyendo, aunque sin limitación, análisis de secuencia N-terminal, ensayo para la heterogeneidad de carga (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico o electroforesis zonal capilar), espectrometría de masas, etc. La cantidad del anticuerpo variante en la composición generalmente varía de una cantidad que constituye el límite de detección de cualquier ensayo (preferiblemente análisis de secuencia N-terminal) usado para detectar la variante hasta una cantidad menor que la cantidad del anticuerpo de especie principal. Generalmente, aproximadamente el 20 % o menos (por ejemplo, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 15 %, por ejemplo del 5 % a aproximadamente el 15 %) de las moléculas de anticuerpo en la composición comprenden una extensión líder amino-terminal. Dichas cantidades porcentuales se determinan preferiblemente usando análisis cuantitativo de secuencia N-terminal o análisis de intercambio catiónico (preferiblemente usando una columna de alta resolución, de intercambio catiónico débil, tal como una columna de intercambio catiónico PROPAC WCX-10™). Aparte de la variante de extensión líder amino-terminal, se contemplan alteraciones adicionales de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de especie principal y/o variante, incluyendo aunque sin limitación un anticuerpo que comprende un resto de lisina C-terminal en una o ambas cadenas pesadas del mismo, un anticuerpo variante desamidado, etc.

Además, el anticuerpo de especie principal o variante puede comprender adicionalmente variaciones de glucosilación, ejemplos no limitantes de las cuales incluyen un anticuerpo que comprende una estructura de oligosacárido G1 o G2 unida a la región Fc del mismo, un anticuerpo que comprende un resto de carbohidrato unido a una cadena ligera del mismo (por ejemplo, uno o dos restos de carbohidrato, tal como glucosa o galactosa, unidos a una o dos cadenas ligeras del anticuerpo, por ejemplo unidos a uno o más restos de lisina), un anticuerpo que comprende una o dos cadenas pesadas no glucosiladas, o un anticuerpo que comprende un oligosacárido sialilado unido a una o dos cadenas pesadas del mismo, etc.

La composición puede recuperarse de una línea celular modificada por ingeniería genética, por ejemplo una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) que expresa el anticuerpo contra HER2, o puede prepararse por síntesis peptídica.

(x) Inmunoconjugados

La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina de molécula pequeña o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como un caliqueamicina, una maitansina (patente de Estados Unidos N° 5.208.020), un tricoteno, y CC1065 también se contemplan en este documento.

En una realización preferida, el anticuerpo se conjuga con una o más moléculas de maitansina (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina puede convertirse, por ejemplo, en May-SS-Me que puede reducirse a May-SH3 y hacerse reaccionar con un anticuerpo modificado (Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 (1992)) para generar un inmunoconjugado de maitansinoide-anticuerpo.

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas en ADN bicatenario a concentraciones sub-picomolares. Los análogos estructurales de caliqueamicina que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ^1_1 (Hinman et al. Cancer Research 53: 3336-3342 (1993) y Lode et al. Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)). Véanse, también, las patentes de Estados Unidos N° 5.714.586; 5.712.374; 5.264.586; y 5.773.001.

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla adicionalmente un inmunocombinado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

- 5 Está disponible diversos isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados contra HER2. Ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu.

Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico pueden prepararse usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (TT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutarealdehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al. Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilite la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador inestable en ácido, enlazador sensible a peptidasa, enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 (1992)).

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprenda el anticuerpo y el agente citotóxico, por ejemplo por técnicas recombinantes o síntesis peptídicas.

- 25 Se contemplan otros inmunocombinados en este documento. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a uno de diversos polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Los anticuerpos desvelados en este documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); las patentes de Estados Unidos N° 4,485.045 y 4.544.545; y el documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con tiempo potenciado en circulación se desvelan en la patente de Estados Unidos N° 5.013.556.

40 Pueden generarse liposomas particularmente útiles por el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina PEG-derivatizada (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Pueden conjugarse fragmentos Fab' del anticuerpo con los liposomas como se describe en Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente se introduce un agente quimioterapéutico dentro del liposoma. Véase Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989).

III. Selección de pacientes para terapia

- 50 El paciente en este documento se somete opcionalmente a un ensayo de diagnóstico antes de la terapia. Por ejemplo, el ensayo de diagnóstico puede evaluar la expresión (incluyendo la sobre-expresión), amplificación, y/o activación (incluyendo fosforilación o dimerización) de HER (por ejemplo, HER2 o EGFR).

55 Generalmente, si se realiza un ensayo de diagnóstico, puede obtenerse una muestra de un paciente en necesidad de terapia. Cuando el sujeto tiene cáncer, la muestra es generalmente una muestra tumoral. En la realización preferida, la muestra tumoral es una muestra tumoral de cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de mama metastásico (MBC), cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de próstata, o cáncer colorrectal.

- 60 La muestra biológica en este documento puede ser una muestra fijada, por ejemplo una muestra embebida en parafina fijada con formalina (FFPE), o una muestra congelada.

65 El paciente seleccionado para terapia puede tener un tumor que presenta activación de HER (y preferiblemente de HER2). En una realización, el grado de activación de HER (o HER2) en las células cancerosas excede significativamente el nivel de activación del receptor en células no cancerosas del mismo tipo tisular. Dicha activación excesiva puede resultar de la sobre-expresión del receptor HER y/o niveles superiores a los normales de

un ligando de HER disponible para activar el receptor HER en las células cancerosas. Dicha activación excesiva puede causar y/o estar causada por el estado neoplásico de una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el cáncer se someterá a ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si la amplificación y/o sobre-expresión de un receptor HER que está sucediendo provoca dicha activación excesiva del receptor HER. Como alternativa, o
 5 adicionalmente, el cáncer puede someterse a un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si la amplificación y/o sobre-expresión de un ligando de HER que está sucediendo en el cáncer se atribuye a la activación excesiva del receptor. En un subconjunto de dichos cánceres, la activación excesiva del receptor puede resultar de una vía estimuladora autocrina. Se describirán diversos ensayos para determinar la activación de HER en más detalle a continuación. Los métodos preferidos para determinar la activación de HER son: detectar la presencia de
 10 dímeros o heterodímeros de HER, evaluar la fosforilación de HER o HER2, y el perfilado de la expresión génica.

(i) *Dímeros de HER*

Las muestras tumorales pueden evaluarse para la presencia de dímeros de HER, que indica activación de HER o
 15 HER2. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para detectar dímeros de HER2, tales como EGFR-HER2, HER2-HER3, en tumores. A continuación se describen varios métodos preferidos. Estos métodos detectan interacciones no covalentes proteína-proteína o indican de otro modo la proximidad entre proteínas de interés.

Pueden usarse métodos basados en inmunoadinidad, tales como inmunoprecipitación o ELISA, para detectar
 20 dímeros de HER. En una realización, se usan anticuerpos contra HER2 para inmunoprecipitar complejos que comprenden HER2 de células tumorales, y el inmunoprecipitante resultante después se sondea para la presencia de EGFR o HER3 por inmunotransferencia. En otra realización, pueden usarse anticuerpos contra EGFR o HER3 para la etapa de inmunoprecipitación y el inmunoprecipitante después puede sondearse con anticuerpos contra HER2. En una realización adicional, pueden usarse ligandos de HER específicos para EGFR, HER3, complejos EGFR-HER2 o
 25 complejos HER2-HER3 para precipitar complejos, que después se sondean para la presencia de HER2. Por ejemplo, pueden conjugarse ligandos a avidina y purificarse los complejos en una columna de biotina.

En otras realizaciones, tales como ensayos ELISA o de tipo "sándwich" con anticuerpo, se inmovilizan anticuerpos
 30 contra HER2 en un soporte sólido, se ponen en contacto con células tumorales o lisado de células tumorales, se lavan, y después se exponen al anticuerpo contra EGFR o HER3. La unión del último anticuerpo, que puede detectarse directamente o mediante un anticuerpo secundario conjugado con un marcador detectable, indica la presencia de heterodímeros. En ciertas realizaciones, se inmoviliza un anticuerpo contra EGFR o HER3, y se usa el anticuerpo contra HER2 para la etapa de detección. En otras realizaciones pueden usarse ligandos de HER en lugar de, o en combinación con anticuerpos contra HER.

También puede usarse entrecruzamiento químico o por UV para unir covalentemente dímeros en la superficie de
 35 células vivas. Ejemplos de agentes químicos de entrecruzamiento incluyen ditiobis (succinimidil) propionato (DSP) y 3,3ditiobis (sulfosuccinimidil) propionato (DTSSP). En una realización, se analizan extractos celulares de células tumorales entrecruzadas por SDS-PAGE y se inmunotransfieren con anticuerpos contra EGFR y/o HER3. Una banda superdesplazada del tamaño molecular apropiado representa muy probablemente dímeros EGFR-HER2 o
 40 HER2-HER3, ya que HER2 es el compañero de dimerización preferido para EGFR y HER3. Este resultado puede confirmarse por posterior inmunotransferencia con anticuerpos contra HER2.

También puede usarse transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para detectar dímeros
 45 EGFR-HER2 o HER2-HER3. La FRET detecta cambios conformacionales en las proteínas e interacciones proteína-proteína in vivo e in vitro basándose en la transferencia de energía desde un fluoróforo donante hasta un fluoróforo aceptor. Selvin, Nat. Struct. Biol., 7:730-34 (2000). La transferencia de energía tiene lugar solamente si el fluoróforo donante está en suficiente proximidad al fluoróforo aceptor. En un experimento FRET típico, se marcan dos proteínas o dos sitios en una única proteína con diferentes sondas fluorescentes. Una de las sondas, la sonda donante, se excita a un estado de energía superior mediante luz incidente de una longitud de onda específica. La sonda donante entonces transmite su energía a la segunda sonda, la sonda aceptora, provocando una reducción en la intensidad de la fluorescencia del donante y un aumento en la emisión de fluorescencia del aceptor. Para medir el grado de transferencia de energía, la intensidad del donante en una muestra marcada con sondas donante y
 50 aceptora se compara con su intensidad en una muestra marcada con sonda donante solamente. Opcionalmente, la intensidad del aceptor se compara en muestras de donante/aceptor y de aceptor solamente. Las sondas adecuadas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, colorantes membrana permeables, tales como fluoresceína y rodamina, colorantes orgánicos, tales como los colorantes de cianina, y átomos lantánidos. Los métodos e instrumentación para la detección y medición de la transferencia de energía también son conocidos en la técnica.

Las técnicas basadas en FRET adecuadas para detectar y medir las interacciones proteína-proteína en células
 60 individuales también son conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede usarse microscopía por transferencia de energía de resonancia de fluorescencia fotoblanqueante donante (pbFRET) y microscopía de imágenes de vida útil de fluorescencia (FLIM) para detectar la dimerización de receptores de superficie celular. Gadella y Jovin, J. Cell Biol., 129: 1543- 58 (1995). En una realización, se usa pbFRET sobre células "en suspensión" o "*in situ*" para
 65 detectar y medir la formación de dímeros EGFR-HER2 o HER2-HER3, como se describe en Nagy et al., Cytometry, 32: 120-131 (1998). Estas técnicas miden la reducción en la vida útil de fluorescencia del donante debido a la

transferencia de energía. En una realización particular, puede usarse una técnica FRET de tipo citometría de flujo de Foerster (FCET) para investigar la dimerización EGFR-HER2 y HER2-HER3, como se describe en Nagy *et al.*, *supra*, y Brockhoff *et al.*, *Cytometry*, 44: 338-48 (2001).

5 Preferiblemente se usa FRET junto con técnicas convencionales de marcaje inmunohistoquímico. Kenworthy, *Methods*, 24:289-96 (2001). Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos conjugados con colorantes fluorescentes adecuados como sondas para el marcaje de dos proteínas diferentes. Si las proteínas están en proximidad entre sí, los colorantes fluorescentes actúan como donantes y aceptores para FRET. La transferencia de energía se detecta por medios convencionales. La transferencia de energía puede detectarse por medios citométricos de flujo o por
10 sistemas de microscopía digital, tales como microscopía confocal o microscopía de fluorescencia de campo amplio acoplados a una cámara con dispositivo de acoplamiento de carga (CCD).

En una realización, los anticuerpos contra y los anticuerpos contra EGFR o HER3 se marcan directamente con dos fluoróforos diferentes, por ejemplo como se describe en Nagy *et al.*, *supra*. Las células tumorales o los lisados de
15 células tumorales se ponen en contacto con los anticuerpos marcados de forma diferencial, que actúan como donantes y aceptores para FRET en presencia de dímeros EGFR-HER2 o HER2-HER3. Como alternativa, se usan anticuerpos no marcados contra HER2 y EGFR o HER3 junto con anticuerpos secundarios marcados de forma diferencial que sirven como donantes y aceptores. Véase, por ejemplo, Brockhoff *et al.*, *supra*. La transferencia de energía se detecta y se determina la presencia de dímeros si los marcadores se encuentran en cerca proximidad.

20 En otras realizaciones, los ligados del receptor HER que son específicos para HER2 y EGFR o HER3 se marcan de forma fluorescente y se usan para estudios de FRET.

En otras realizaciones más, la presencia de dímeros en la superficie de células tumorales se demuestra por co-localización de HER2 con EGFR o HER3 usando técnicas convencionales de inmunofluorescencia directa o indirecta y microscopía de exploración con láser confocal. Como alternativa, se usan imágenes de exploración con láser (LSI)
25 para detectar la unión de anticuerpo y la co-localización de HER2 con EGFR o HER3 en un formato de alto rendimiento, tal como una microplaca de pocillos, como se describe en Zuck *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:11122-27 (1999).

30 En otras realizaciones, la presencia de dímeros EGFR-HER2 y/o HER2-HER3 se determina identificando la actividad enzimática que es dependiente de la proximidad de los componentes del dímero. Se conjuga un anticuerpo contra HER2 con una enzima y se conjuga un anticuerpo contra EGFR o HER3 con una segunda enzima. Se añade un primer sustrato para la primera enzima y la reacción produce un segundo sustrato para la segunda enzima. Esto
35 conduce a una reacción con otra molécula para producir un compuesto detectable, tal como un colorante. La presencia de otro agente químico descompone el segundo sustrato, de modo que reacción con la segunda reacción se evita salvo que la primera y segunda enzimas, y por tanto los dos anticuerpos, estén en cercana proximidad. En una realización particular se ponen en contacto células tumorales o lisados celulares con un anticuerpo contra HER2 que está conjugado con glucosa oxidasa y un anticuerpo contra HER3 o EGFR que está conjugado con peroxidasa de rábano rusciano. Se añade glucosa a la reacción, junto con un precursor del colorante, tal como DAB, y catalasa. La presencia de dímeros se determina por el desarrollo de color tras la tinción para DAB.

Los dímeros también pueden detectarse usando métodos basados en el sistema de ensayo eTag™ (Aclara Bio Sciences, Mountain View, CA), como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos
45 2001/0049105, publicada el 6 de diciembre de 2001. Una eTag™, o marca "electroforética" comprende un resto indicador detectable, tal como un grupo fluorescente. También puede comprender un "modificador de movilidad", que consta esencialmente de un resto que tiene una movilidad electroforética única. Estos restos permiten la separación y detección de la eTag™ a partir de una mezcla compleja en condiciones electroforéticas definidas, tal como electroforesis capilar (CE). La parte de la eTag™ que contiene el resto indicador y, opcionalmente, el
50 modificador de movilidad se une a un primer resto de unión a diana mediante un grupo enlazador escindible para producir un primer compuesto de unión. El primer resto de unión a diana reconoce específicamente una primera diana particular, tal como un ácido nucleico o proteína. El primer resto de unión a diana no está limitado de ningún modo, y puede ser, por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido. Preferiblemente, el primer resto de unión a diana es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Como alternativa, el primer resto de unión a diana puede ser un ligando
55 del receptor HER o fragmento de unión competente del mismo.

El grupo enlazador preferiblemente comprende un resto escindible, tal como un sustrato enzimático, o cualquier enlace químico que pueda escindirse en condiciones definidas. Cuando el primer resto de unión a diana se une a su
60 diana, se introduce y/o activa el agente de escisión, y se escinde el grupo enlazador, liberando de este modo la parte de la eTag™ que contiene el resto indicador y el modificador de movilidad. Por tanto, la presencia de una eTag™ "libre" indica la unión del resto de unión a diana a su diana.

Preferiblemente, un segundo compuesto de unión comprende el agente de escisión y un segundo resto de unión a
65 diana que reconoce específicamente una segunda diana. El segundo resto de unión a diana tampoco está limitado de ningún modo y puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o un ligando del receptor HER o fragmento de ligando de unión competente. El agente de escisión es tal que solamente escindirá el grupo enlazador

en el primer compuesto de unión si el primer compuesto de unión y el segundo compuesto de unión están en cercana proximidad.

5 En una realización, un primer compuesto de unión comprende una eTag™ en que un anticuerpo contra HER2 sirve como el primer resto de unión a diana. Un segundo compuesto de unión comprende un anticuerpo contra EGFR o HER3 unido a un agente de escisión capaz de escindir el grupo enlazador de la eTag™. Preferiblemente el agente de escisión debe activarse para ser capaz de escindir el grupo enlazador. Las células tumorales o lisados de células tumorales se ponen en contacto con la eTag™, que se une a HER2, y con el anticuerpo modificado contra EGFR o HER3, que se une a EGFR o HER3 en la superficie celular. El compuesto de unión no unido preferiblemente se retira, y se activa el agente de escisión, si fuera necesario. Si están presentes dímeros EGFR-HER2 o HER2-HER3, el agente de escisión escindirá el grupo enlazador y liberará la eTag™ debido a la proximidad del agente de escisión al grupo enlazador. La eTag™ libre después puede detectarse mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como electroforesis capilar.

15 En una realización, el agente de escisión es una especie química activable que actúa sobre el grupo enlazador. Por ejemplo, el agente de escisión puede activarse por exposición de la muestra a la luz.

20 En otra realización, la eTag™ se construye usando un anticuerpo contra EGFR o HER3 como el primer resto de unión a diana, y el segundo compuesto de unión se construye a partir de un anticuerpo contra HER2.

En otra realización más, el dímero de HER se detecta usando un anticuerpo u otro reactivo que se une específicamente o preferentemente al dímero en comparación con la unión del mismo a cualquier receptor HER en el dímero.

25 *(ii) Fosforilación de HER2*

La fosforilación del receptor HER puede evaluarse por inmunoprecipitación de uno o más receptores HER, tal como el receptor HER2, y análisis del resto o restos de tirosina fosforilados en el receptor o receptores inmunoprecipitados. Por ejemplo, la positividad se determina mediante la presencia de una banda de fosfo-HER2 en el gel, usando un anticuerpo anti-fosfotirosina para detectar el resto o restos de tirosina fosforilados en el receptor o receptores HER inmunoprecipitados. Están disponibles en el mercado anticuerpos anti-fosfotirosina en PanVera (Madison, WI), una filial de Invitrogen, Chemicon International Inc. (Temecula, CA), o Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). La negatividad se determina mediante la ausencia de la banda. Se contemplan diversos formatos de ensayo para detectar proteínas fosforiladas incluyendo análisis de transferencia de Western, inmunohistoquímica, ELISA, etc.

35 En una realización, se evalúa la fosforilación del receptor HER2 (HER2) por inmunohistoquímica usando un anticuerpo contra HER2 fosfo-específico (clon PN2A; Thor et al., J. Clin. Oncol, 18 (18): 3230-3239 (2000)).

40 Otros métodos para detectar la fosforilación del receptor o receptores HER incluyen, aunque sin limitación, KIRA ELISA (patentes de Estados Unidos N° 5.766.863; 5.891.650; 5.914.237; 6.025.145; y 6.287.784), espectrometría de masas (que compara el tamaño de HER2 fosforilado y no fosforilado), y ensayo de proximidad de e-tag tanto con un anticuerpo contra HER (por ejemplo, HER2) como con anticuerpo fosfo-específico o específico para fosfo-tirosina (por ejemplo, usando el kit de ensayo eTag™ disponible en Aclara BioSciences (Mountain View, CA). Se han descrito detalles del ensayo eTag en este documento anteriormente.

45 También puede usarse anticuerpos fosfo-específicos en serie celular para detectar el estado de fosforilación en una muestra celular de proteína de transducción de señales (documento US2003/0190689).

50 El siguiente Ejemplo 2 describe un método preferido para determinar la fosforilación de HER2 por ELISA fosfo-HER2.

(iii) Perfilado de la expresión génica

55 En una realización, el perfilado de la expresión génica puede servir como sustituto para medir la fosforilación de HER directamente. Esto es particularmente útil cuando la muestra es una muestra fijada (por ejemplo, una muestra tumoral embebida en parafina, fijada con formalina) donde la fosforilación de HER puede ser difícil de cuantificar de forma fiable. Por ejemplo, se evalúa la expresión de dos o más receptores HER y uno o más ligandos de HER en una muestra, donde la expresión de los dos o más receptores HER y uno o más ligandos de HER indica activación positiva de HER en la muestra. Como alternativa o adicionalmente, puede medirse la expresión de betacelulina y/o anfiregulina en la muestra, donde la expresión de betacelulina y/o anfiregulina indica activación positiva de HER en la muestra.

65 De acuerdo con una realización preferida del perfilado de la expresión génica para evaluar la activación de HER2, se ensaya una muestra del paciente para la expresión de dos o más receptores HER (preferiblemente seleccionados entre EGFR, HER2, y HER3) y uno o más ligandos de HER (preferiblemente seleccionados entre betacelulina, anfiregulina, epiregulina, y TGF- α , más preferiblemente betacelulina o anfiregulina). Por ejemplo, los dos o más

receptores HER pueden ser EGFR y HER2, o HER2 y HER3, y el uno o más ligandos de HER pueden ser betacelulina o anfiregulina. Preferiblemente, se determina la expresión de HER2 y EGFR o HER3, así como betacelulina o anfiregulina. La muestra puede ensayarse para la expresión de betacelulina o anfiregulina en solitario, o en combinación con el ensayo para la expresión de dos o más receptores HER. La expresión positiva del gen o genes identificados indica que el paciente es un candidato para terapia con un inhibidor de la dimerización de HER, tal como pertuzumab. Además, la expresión positiva del gen o genes indica que es paciente tiene mayor probabilidad de responder favorablemente a terapia con el inhibidor de la dimerización de HER que un paciente no tenga dicha expresión positiva.

Diversos métodos para determinar la expresión de ARNm o proteína incluyen, aunque sin limitación, perfilado de la expresión génica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) incluyendo PCR a tiempo real cuantitativa (qRT-PCR), análisis de microseries, análisis en serie de expresión génica (SAGE), MassARRAY, análisis de expresión génica por secuenciación masivamente paralela de identificadores (MPSS), proteómica, inmunohistoquímica (IHC), etc. Preferiblemente se cuantifica el ARNm. Dicho análisis de ARNm se realiza preferiblemente usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o por análisis de microseries. Cuando se emplea PCR, una forma preferida de PCR es PCR a tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). En una realización, la expresión de uno o más de los genes indicados anteriormente se considera expresión positiva si está en la media o por encima, por ejemplo, en comparación con otras muestras del mismo tipo de tumor. El nivel medio de expresión puede determinarse de forma esencialmente contemporánea con la medición de la expresión génica, o puede haberse determinado previamente.

Las etapas de un protocolo representativo para el perfilado de la expresión génica usando tejidos fijados embebidos en parafina como fuente de ARN, incluyendo aislamiento de ARNm, purificación, extensión de cebadores y amplificación se proporcionan en diversos artículos científicos publicados (por ejemplo: Godfrey et al. J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 (2000); Specht et al., Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001)). En resumen, un proceso representativo comienza con el corte de secciones de aproximadamente 10 microgramos de grosor de muestras de tejido tumoral embebidas en parafina. Después se extrae el ARN, y se retiran las proteínas y el ADN. Después del análisis de la concentración de ARN, pueden incluirse etapas de reparación y/o amplificación del ARN, si fuera necesario, y se transcribe de forma inversa el ARN usando promotores específicos de gen seguido de PCR. Finalmente, se analizan los datos para identificar las mejores opciones de tratamiento disponibles para el paciente basándose en el patrón característico de expresión génica identificado en la muestra tumoral examinada.

El Ejemplo 3 en este documento describe métodos preferidos para determinar la activación de HER2 mediante perfilado de la expresión génica.

(iv) Expresión y amplificación de HER

Para determinar la expresión o amplificación de HER en el cáncer, están disponibles diversos ensayos de diagnóstico/pronóstico. En una realización, puede analizarse la sobre-expresión de HER por IHC, por ejemplo usando el HERCEPTEST® (Dako). Pueden someterse secciones tisulares embebidas en parafina de una biopsia tumoral al ensayo IHC y acordar una intensidad de tinción de la proteína HER2 según los siguientes criterios: Valor 0 no se observa tinción o se observa tinción de la membrana en menos del 10 % de las células tumorales. Valor 1+ se detecta una tinción de la membrana débil/apenas perceptible en más del 10 % de las células tumorales. Las células solamente se tiñen en parte de su membrana. Valor 2+ se observa una tinción completa de membrana de débil a moderada en más del 10 % de las células tumorales.

Valor 3+ se observa una tinción completa de membrana de moderada a fuerte en más del 10 % de las células tumorales.

Aquellos tumores con valores de 0 ó 1+ para la evaluación de sobre-expresión de HER2 pueden caracterizarse como sin sobre-expresión de HER2, mientras que aquellos tumores con valores de 2+ o 3+ puede caracterizarse como con sobre-expresión de HER2.

Los tumores que sobre-expresan HER2 pueden clasificarse por valores inmunohistoquímicos correspondientes a la cantidad de copias de moléculas HER2 expresadas por célula, y pueden determinarse bioquímicamente:

0 = 0-10.000 copias/célula,

1+ = al menos aproximadamente 200.000 copias/célula,

2+ = al menos aproximadamente 500.000 copias/célula,

3+ = al menos aproximadamente 2.000.000 copias/célula.

La sobre-expresión de HER2 al nivel 3+, que conduce a activación independiente de ligando de la tirosina quinasa (Hudziak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7159-7163 (1987)), sucede en aproximadamente el 30 % de los cánceres de mama, y en estos pacientes, la supervivencia sin recidiva y la supervivencia global están disminuidas (Slamon et al., Science, 244:707-712 (1989); Slamon et al., Science, 235:177-182 (1987)).

Como alternativa, o adicionalmente, pueden realizarse ensayos FISH tales como INFORM™ (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION™ (Vysis, Illinois) sobre tejido tumoral embebido en parafina, fijado con formalina para determinar el grado (si lo hay) de amplificación de HER2 en el tumor.

En una realización, el cáncer será uno que exprese (y puede sobre-expresar) EGFR, dicha expresión puede evaluarse por los métodos para evaluar la expresión HER2 indicados anteriormente.

También puede evaluarse la sobre-expresión o amplificación del receptor HER o ligando de HER usando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo administrando una molécula (tal como un anticuerpo) que se une a la molécula a detectar y está marcada con un marcador detectable (por ejemplo, un isótopo radiactivo) y explorando externamente al paciente para la localización del marcador.

IV. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los inhibidores de la dimerización de HER se preparan para su almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), generalmente en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. También se contemplan cristales de anticuerpo (véase la solicitud de patente de Estados Unidos 2002/0136719). Los vehículos, excipientes, o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraponos formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Se describen formulaciones de anticuerpos liofilizados en el documento WO 97/04801.

La formulación preferida de pertuzumab para uso terapéutico comprende 30 mg/ml de pertuzumab en acetato de histidina 20 mM, sacarosa 120 mM, polisorbato 20 al 0,02 %, a pH 6,0. Una formulación alternativa de pertuzumab comprende 25 mg/ml de pertuzumab, tampón histidina-HCl 10 mM, sacarosa 240 mM, polisorbato 20 al 0,02 %, pH 6,0.

La formulación en este documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten de forma adversa entre sí. Se describen diversos fármacos que pueden combinarse con el inhibidor de la dimerización de HER en la siguiente sección de métodos. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de Estados Unidos Nº 3. 773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

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

V. Tratamiento con inhibidores de la dimerización de HER

En este documento se desvela el uso de un inhibidor de la dimerización de HER para prolongar el TTP o la supervivencia en un paciente con cáncer, cuyo cáncer presenta activación de HER, donde el inhibidor de la dimerización de HER se administra al paciente en una cantidad que prolonga el TTP o la supervivencia del paciente. Preferiblemente, el inhibidor de la dimerización de HER es un inhibidor de la dimerización de HER2 y/o inhibe la heterodimerización de HER.

El cáncer del paciente puede presentar activación de HER2, incluyendo la fosforilación de HER2. Preferiblemente, la fosforilación de HER2 se evalúa usando un ensayo fosfo-ELISA. Como alternativa, la activación de HER2 puede evaluarse por el perfilado de la expresión génica o detectando dímeros o heterodímeros de HER.

5 Ejemplos de diversos cánceres que pueden tratarse con un inhibidor de la dimerización de HER se han enumerado en la sección anterior de definiciones. Las indicaciones cancerosas preferidas incluyen cáncer de ovario; cáncer peritoneal; cáncer de las trompas de Falopio; cáncer de mama, incluyendo cáncer de mama metastásico (MBC);
10 cáncer pulmonar, incluyendo cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC); cáncer de próstata; y cáncer colorrectal. En una realización, el cáncer que se trata es cáncer avanzado, refractario, recurrente, resistente a quimioterapia, y/o resistente a platino.

La terapia con el inhibidor de la dimerización de HER prolonga el TTP y/o la supervivencia. En una realización, la terapia con el inhibidor de la dimerización de HER prolonga el TTP o la supervivencia en al menos aproximadamente un 20 % más que la TTP o supervivencia conseguida mediante la administración de un agente anti-tumoral
15 aprobado, o la opción asistencial convencional, para el cáncer que se está tratando.

En este documento se desvela el uso de pertuzumab para prolongar el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) o la supervivencia en un paciente con cáncer de ovario, peritoneal, o trompas de Falopio, cuyo cáncer presenta activación de HER2, donde se administra pertuzumab al paciente en una cantidad que prolonga el TTP o la
20 supervivencia del paciente. El paciente puede tener cáncer avanzado, refractario, recurrente, resistente a quimioterapia, y/o resistente a platino de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio. La administración de pertuzumab al paciente puede, por ejemplo, prolongar el TTP o la supervivencia en al menos aproximadamente un 20 % más que el TTP o la supervivencia conseguida mediante la administración de topotecán o doxorubicina liposómica a dicho paciente.

25 El inhibidor de la dimerización de HER se administra a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, en forma de un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebromedular, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o de inhalación. Se prefiere la administración intravenosa del anticuerpo.

30 Para la prevención o tratamiento del cáncer, la dosis de inhibidor de la dimerización de HER dependerá del tipo de cáncer a tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y transcurso del cáncer, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico asistente.

35 En una realización, se administra una dosis fija de inhibidor de la dimerización de HER. La dosis fija puede administrarse adecuadamente al paciente en una vez o sobre una serie de tratamientos. Cuando se administra una dosis fija, preferiblemente está en el intervalo de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 2000 mg del inhibidor de la dimerización de HER. Por ejemplo, la dosis fija puede ser de aproximadamente 420 mg, aproximadamente 525
40 mg, aproximadamente 840 mg, o aproximadamente 1050 mg del inhibidor de la dimerización de HER, tal como pertuzumab.

45 Cuando se administra una serie de dosis, éstas pueden administrarse, por ejemplo, aproximadamente cada semana, aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente cada 3 semanas, o aproximadamente cada 4 semanas, pero preferiblemente aproximadamente cada 3 semanas. Las dosis fijas pueden, por ejemplo, continuar administrándose hasta la progresión de la enfermedad, un acontecimiento adverso, u otro momento determinado por el médico. Por ejemplo, puede administrarse de aproximadamente dos, tres, o cuatro, hasta aproximadamente 17 o más dosis fijas.

50 En una realización, se administra una o más dosis de carga del anticuerpo, seguidas de una o más dosis de mantenimiento del anticuerpo. En otra realización, se administra una pluralidad de la misma dosis al paciente.

De acuerdo con una realización preferida, se administra una dosis fija de inhibidor de la dimerización de HER (por ejemplo, pertuzumab) de aproximadamente 840 mg (dosis de carga), seguida de una o más dosis de
55 aproximadamente 420 mg (dosis de mantenimiento) del anticuerpo. Las dosis de mantenimiento se administran preferiblemente aproximadamente cada 3 semanas, para un total de al menos dos dosis, hasta 17 o más dosis.

60 De acuerdo con otra realización preferida, se administra una o más dosis fijas de aproximadamente 1050 mg del inhibidor de la dimerización de HER (por ejemplo, pertuzumab), por ejemplo cada 3 semanas. De acuerdo con esta realización, se administra una, dos o más de las dosis fijas, por ejemplo durante hasta un año (17 ciclos), y más tiempo según se desee.

65 En otra realización, se administra una dosis fija de aproximadamente 1050 mg del inhibidor de la dimerización de HER (por ejemplo, pertuzumab) como una dosis de carga, seguida de una o más dosis de mantenimiento de aproximadamente 525 mg. Pueden administrarse aproximadamente una, dos o más dosis de mantenimiento al paciente cada 3 semanas de acuerdo con esta realización.

Aunque el inhibidor de la dimerización de HER puede administrarse como único agente anti-tumoral, el paciente se trata opcionalmente con una combinación del inhibidor de la dimerización de HER, y uno o más agentes quimioterapéuticos. Preferiblemente, al menos uno de los agentes quimioterapéuticos es un agente quimioterapéutico antimetabolito tal como gemcitabina. La administración combinada incluye la coadministración o
 5 administración concurrente, usando formulaciones diferentes o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferiblemente existe un periodo de tiempo en que ambos (o todos) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Por tanto, el agente quimioterapéutico antimetabolito puede administrarse antes, o después de, la administración del inhibidor de la dimerización de HER. En esta realización, la cronología entre al menos una administración del agente quimioterapéutico antimetabolito y al
 10 menos una administración del inhibidor de la dimerización de HER es preferiblemente de aproximadamente 1 mes o menos, y más preferiblemente de aproximadamente 2 semanas o menos. Como alternativa, el agente quimioterapéutico antimetabolito y el inhibidor de la dimerización de HER se administran de forma concurrente al paciente, en una única formulación o en formulaciones diferentes. El tratamiento con la combinación del agente quimioterapéutico (por ejemplo, agente quimioterapéutico antimetabolito tal como gemcitabina) y el inhibidor de la dimerización de HER (por ejemplo, pertuzumab) puede provocar un beneficio terapéutico sinérgico, o mayor que
 15 aditivo, en el paciente.

Un agente quimioterapéutico antimetabolito, si se administra, habitualmente se administra a dosificaciones conocidas para el mismo, u opcionalmente disminuidas debido a la acción combinada de los fármacos o a los
 20 efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico antimetabolito. Pueden usarse preparaciones y programas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos de acuerdo con las instrucciones del fabricante o pueden determinarlas empíricamente los expertos en la técnica. Cuando el agente quimioterapéutico antimetabolito es gemcitabina, preferiblemente, se administra a una dosis entre aproximadamente 600 mg/m² a 1250 mg/m² (por ejemplo aproximadamente 1000 mg/m²), por ejemplo, en los días 1 y 8 de un ciclo de
 25 3 semanas.

Aparte del inhibidor de la dimerización de HER y el agente quimioterapéutico antimetabolito, pueden combinarse con los mismos otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, puede administrarse un segundo o más (tercero, cuarto, etc.)
 30 agentes quimioterapéuticos, donde el segundo agente quimioterapéutico es otro agente quimioterapéutico antimetabolito diferente, o un agente quimioterapéutico que no es un antimetabolito. Por ejemplo, el segundo agente quimioterapéutico puede ser un taxano (tal como paclitaxel o docetaxel), capecitabina, o agente quimioterapéutico basado en platino (tal como carboplatino, cisplatino, u oxaliplatino), antraciclina (tal como doxorubicina, incluyendo, doxorubicina liposómica), topotecán, pemetrexed, alcaloide de la vinca (tal como vinorelbina), y TLK 286. Pueden administrarse "cócteles" de diferentes agentes quimioterapéuticos.
 35

Otros agentes terapéuticos que pueden combinarse con el inhibidor de la dimerización de HER incluyen uno cualquiera o más de: un segundo inhibidor diferente de la dimerización de HER (por ejemplo, un anticuerpo inhibidor del crecimiento contra HER2 tal como trastuzumab, o un anticuerpo contra HER2 que induce apoptosis de una
 40 célula que sobre-expresa HER2, tal como 7C2, 7F3 o variantes humanizadas de los mismos); un anticuerpo dirigido contra un antígeno diferente asociado al tumor, tal como EGFR, HER3, HER4; un compuesto anti-hormonal, por ejemplo, un compuesto anti-estrogénico tal como tamoxifeno, o un inhibidor de aromatasa; un cardioprotector (para evitar o reducir cualquier disfunción del miocardio asociada con la terapia); una citoquina; un fármaco dirigido a EGFR (tal como TARCEVA®, IRESSA® o cetuximab); un agente anti-angiogénico (especialmente bevacizumab comercializado por Genentech con la marca registrada AVASTIN™); un inhibidor de tirosina quinasa; un inhibidor de
 45 COX (por ejemplo un inhibidor de COX-1 o COX-2); un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo, celecoxib (CELEBREX®); un inhibidor de la farnesil transferasa (por ejemplo, Tipifarnib/ZARNESTRA® R115777 disponible en Johnson and Johnson o Lonafarnib SCH66336 disponible en Schering-Plough); un anticuerpo que se une a la proteína oncofetal CA 125 tal como Oregovomab (MoAb B43,13); vacuna contra HER2 (tal como la vacuna AutoVac contra HER2 de Pharmexia, o la vacuna de proteína APC8024 de Dendreon, o la vacuna de péptido HER2 de
 50 GSK/Corixa); otra terapia dirigida a HER (por ejemplo, trastuzumab, cetuximab, ABX-EGF, EMD7200, gefitinib, erlotinib, CP724714, CI1033, GW572016, IMC-11F8, TAK165, etc.); un inhibidor de Raf y/o ras (véase, por ejemplo, el documento WO 2003/86467); inyección de liposomas de doxorubicina HCl (DOXIL®); un inhibidor de la topoisomerasa I tal como topotecán; taxano; un inhibidor dual de tirosina quinasa de HER2 y EGFR tal como lapatinib/GW572016; TLK286 (TELCYTA®); EMD-7200; un medicamento que trata las náuseas tal como antagonista
 55 de serotonina, un esteroide, o una benzodiazepina; un medicamento que evita o trata la erupción cutánea o terapias convencionales para el acné, incluyendo antibiótico tópico u oral; un medicamento que trata o previene la diarrea; un medicamento que reduce la temperatura corporal tal como acetaminofeno, difenhidramina, o meperidina; factor de crecimiento hematopoyético, etc.

Dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes anteriores coadministrados son aquellas actualmente
 60 usadas y puede disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el inhibidor de la dimerización de HER.

Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede someterse a eliminación quirúrgica de las
 65 células cancerosas y/o radioterapia.

Cuando el inhibidor es un anticuerpo, preferiblemente el anticuerpo administrado es un anticuerpo desnudo. Sin embargo, el inhibidor administrado puede conjugarse con un agente citotóxico. Preferiblemente, el inhibidor conjugado y/o el antígeno al que se une se internalizan por la célula, provocando una eficacia terapéutica aumentada del conjugado en la eliminación de la célula cancerosa a la que se une. En una realización preferida, el agente citotóxico aborda o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

La presente solicitud contempla la administración del inhibidor de la dimerización de HER por terapia génica. Véase, por ejemplo, el documento WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996 referente al uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Existen dos enfoques principales para hacer llegar ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) al interior de las células del paciente; *in vivo* y *ex vivo*. Para suministro *in vivo*, se inyecta el ácido nucleico directamente en el paciente, habitualmente en el mismo sitio donde se requiere el anticuerpo. Para tratamiento *ex vivo*, se retiran las células del paciente, se introduce el ácido nucleico en estas células aisladas y se administran las células modificadas al paciente directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véanse, por ejemplo las patentes de Estados Unidos N° 4.892.538 y 5.283.187). Existe diversas técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del hospedador pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico a células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato cálcico, etc. Un vector habitualmente usado para suministro *ex vivo* del gen es un retrovirus.

Las técnicas de transferencia de ácidos nucleicos *in vivo* actualmente preferidas incluyen transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus del herpes simple I, o virus adeno-asociado) y sistemas basados en lípidos (lípidos útiles para transferencia mediada por lípidos del gen son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). En algunas situaciones es deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente dirigido a las células diana, tal como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se emplean liposomas, pueden usarse proteínas que se unen a una proteína de membrana de superficie celular asociada con la endocitosis para abordar y/o facilitar la captación, por ejemplo proteínas de la cápsida o fragmentos de las mismas con tropismo por un tipo celular particular, anticuerpos contra proteínas que experimentan internalización en ciclo, y proteínas dirigidas a localizaciones intracelulares y que potencian la semi-vida intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor se describe, por ejemplo, por Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987); y Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos actualmente conocidos para marcar genes y terapia génica véase, Anderson et al., Science 256:808-813 (1992). Véase también el documento WO 93/25673 y las referencias citadas en ese documento.

VI. Depósito de materiales

Se han depositado las siguientes líneas celulares de hibridoma en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EEUU (ATCC):

Denominación del anticuerpo	Nº ATCC	Fecha de depósito
7C2	ATCC HB-12215	17 de octubre de 1996
7F3	ATCC HB-12216	17 de octubre de 1996
4D5	ATCC CRL 10463	24 de mayo de 1990
2C4	ATCC HB-12697	8 de abril de 1999

Se ilustran detalles adicionales de la invención mediante los siguientes Ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1

ACTIVIDAD CLÍNICA DE PERTUZUMAB EN CÁNCER AVANZADO, REFRACTARIO O RECURRENTE DE OVARIO Y EL PAPEL DEL ESTADO DE ACTIVACIÓN DE HER2

Este ejemplo se refiere a un ensayo clínico multicéntrico en fase II, de un solo brazo y etiqueta abierta de pacientes con cáncer de ovario. Los pacientes con cáncer avanzado, refractario o recurrente de ovario se trataron con pertuzumab, un anticuerpo humanizado contra HER2. El pertuzumab representa una nueva clase de agentes dirigidos llamados inhibidores de la dimerización de HER (HDI) que inhiben la dimerización de HER2 con EGFR, HER3 y HER4, e inhiben la señalización a través de MAP y P13 quinasa.

Se incluyeron 65 pacientes con cáncer de ovario reincidente, recibiendo 61 de ellos terapia con "baja dosis" del único agente pertuzumab; el pertuzumab se administró por vía intravenosa (IV) con una carga de 840 mg seguida de 420 mg cada 3 semanas.

Una segunda cohorte de pacientes se trató con "alta dosis" de pertuzumab; 1050 mg cada 3 semanas, administrado como único agente. En esta cohorte, se incluyeron 64 sujetos, de los cuales se trataron 62 sujetos.

Las evaluaciones de los tumores se obtuvieron después de 2, 4, 6, 8, 12 y 16 ciclos.

El criterio de valoración principal fue la tasa de respuesta (RR) por RECIST. Fueron obligatorias biopsias recientes del tumor para ensayar el estado de fosforilación de HER2 (pHER2) usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de pHER2 como se describe en el Ejemplo 2 a continuación. Se evaluó pHER2 para los sujetos de la cohorte 1. Adicionalmente se evaluaron la seguridad y la tolerabilidad.

Los criterios de valoración secundarios fueron TTP, duración de la respuesta response, duración de supervivencia, farmacocinética (PK), y FOSI (cohorte 2).

Resultados

La demográfica basal de los pacientes se proporciona en la Fig. 9. La edad media fue de 57 años (intervalo de 35-83) y el PS medio de ECOG fue 2. La cantidad media de regímenes de quimioterapia previos fue 5.

Las Fig. 10-14 representan cualquier acontecimiento adverso en los pacientes tratados. El pertuzumab fue bien tolerado. Se experimentó diarrea (grado 1-3) en el 61 % de los pacientes. El 5 % de los pacientes tuvo una bajada en la fracción de eyección hasta menos del 50 %.

Los resultados de eficacia se resumen en la Fig. 15. El 4 % de los pacientes tuvo una respuesta parcial (PR). El 39 % de los pacientes tuvo enfermedad estable (SD). Como se muestra en la Fig. 16, el TTP medio para pacientes tratados con 420 mg de pertuzumab fue de 7 semanas y, para pacientes tratados con 1050 mg de pertuzumab fue de 6,6 semanas. La Fig. 17 proporciona la supervivencia global para pacientes tratados con baja dosis o alta dosis de pertuzumab. La supervivencia media fue de 40 semanas. Las respuestas de CA-125 se proporcionan en la Fig. 18. El pertuzumab fue eficaz en reducir los niveles de CA-125. Dicha reducción es una indicación de la eficacia terapéutica en cáncer de ovario.

Se evaluó el estado de activación de HER2 de los pacientes de la cohorte 1, tratados con 420 mg de pertuzumab. Los resultados se muestran en las Fig. 19-23. Aproximadamente el 30 % de los sujetos con cáncer de ovario eran pHER2 positivos (más del 30 % de los tumores, ELISA realizado como se describe en el Ejemplo 2). De los sujetos evaluables para los datos de eficacia y pHER2, el 26 % fueron pHER2 positivos. Véase la Fig. 19.

El TTP medio para pacientes pHER2+ fue de 21 semanas, en comparación con las 6 semanas en pacientes pHER2- y 9 semanas en pacientes con estado pHER2 desconocido (Fig. 20 y 22).

Catorce de los 61 pacientes de la cohorte 1 mostraron evidencias de actividad de pertuzumab. El único paciente con una respuesta parcial (PR) era fosfo-HER2 positivos. Véase la Fig. 21.

También se evaluó la supervivencia global de los pacientes. Como se muestra en la Fig. 23, la supervivencia global de los pacientes pHER2 positivos tratados con pertuzumab parece superior a la supervivencia conseguida con topotecán (supervivencia media de 43 semanas) o doxorubicina liposómica (36 semanas).

Conclusiones

Como único agente, el pertuzumab es bien tolerado. La toxicidad y la eficacia del pertuzumab no parecer estar relacionadas con la dosis. El pertuzumab tiene actividad en cáncer avanzado, refractario o recurrente de ovario. Los sujetos con estado pHER2 positivo presentaron una eficacia potenciada del TTP y la supervivencia en comparación con los sujetos con estado pHER2 negativo. La eficacia, medida por el TTP o la supervivencia, del pertuzumab en pacientes que presentan activación de HER2 pareció superior a la conseguida usando topotecán o doxorubicina liposómica, los agentes actualmente usados para tratar a pacientes con cáncer avanzado, refractario o recurrente de ovario.

EJEMPLO 2

ELISA DE FOSFO-HER2 PARA DETERMINAR LA ACTIVACIÓN DE HER2

El Ejemplo 1 anterior describe el ensayo clínico que evaluaba la eficacia de pertuzumab en sujetos con cáncer avanzado, refractario o recurrente de ovario. Este ejemplo describe el desarrollo del ensayo usado para determinar la activación de HER2 en los pacientes tratados en el Ejemplo 1.

El ELISA de fosfo-HER2 se desarrolló para medir la concentración de fosforilación de tirosina asociada a HER2 (HER2/pTyr) en lisados de tejido tumoral de ovario humano. El ensayo utiliza placas de microtitulación de media área de 96 pocillos COSTAR™ a causa del volumen limitado de muestra. El anticuerpo de recubrimiento es uno de

cabra anti-ECD de HER2 purificado por afinidad y el anticuerpo secundario es uno monoclonal murino biotinilado (clon 4G10) específico para fosfotirosina. El patrón de referencia es un lisado celular SK-BR-3 con un intervalo de ensayo de 132 U/ml. Una unidad es igual a la cantidad de tirosina fosforilada medida en un lisado celular SK-BR-3 que contiene 277 pg de HER2 total determinado por el ELISA de HER2 total (ELISA de HER2 total). El ELISA usa AMDEX™ estreptavidina-HRP para la detección y TMB como sustrato.

Materiales

1. Material patrón, lisado celular SK-BR-3 1.056 U/ml de HER2/pTyr
2. Fuente de control, lisado celular SK-BR-3 1.056 U/ml
3. Anticuerpo de recubrimiento, de carba anti-ECD de HER2 9,6 mg/ml
4. Anticuerpo secundario, murino biotinilado anti-fosfotirosina, clon 4G10, 971 µg/ml (Upstate Biotech Cat. nº 16-103)
5. AMDEX™ Estreptavidina conjugado con HRP (SA-HRP) (Amersham Biosciences Catalog. nº RPN4401)
6. Sustrato, sustrato de peroxidada tetrametil bencidina (TMB) (Kirkegaard & Perry Labs [KPL] Catalog. nº 50-76-01)
7. Tampón de recubrimiento, tampón carbonato sódico 0,05 M, pH 9,6
8. Diluyente de ensayo, PBS/BSA al 0,5 %/Polisorbato 20 al 0,05 %/PROCLIN 300™ al 0,05 %, pH 7,4
9. Tampón de lisis: Tampón de lisis base (Tris-HCl 50 mM/NaCl 150 mM/EDTA 5 mM/TRITON X-100™ al 1 %)/cóctel inhibidor de proteasa 1:10/cóctel I inhibidor de fosfatasa 1:100/cóctel II inhibidor de fosfatasa 1:100/fluoruro sódico 50 mM/orto-vanadato sódico 2 mM, pH 8,1
10. Muestra, patrón, y diluyente de control: Tampón de lisis
11. MDA-468 (ATCC nº HTB-132). Nivel de expresión de HER2: Ninguno. Tejido: glándula mamaria humana, mama, adenocarcinoma
12. MCF-7 (ATCC nº HTB-22). Nivel de expresión de HER2: 0 (niveles normales de expresión de HER2). Tejido: glándula mamaria humana; mama; epitelial; sitio metastásico: adenocarcinoma de efusión pleural
13. SK-BR-3 (ATCC nº HTB-30, Manassas, VA). Nivel de expresión de HER2: 3 (elevado nivel de sobre-expresión de HER2). Tejido: glándula mamaria humana; mama; sitio metastásico: adenocarcinoma de efusión pleural
14. BT-474 (ATCC nº HTB-20, Manassas, VA). Nivel de expresión de HER2: 3 (elevado nivel de sobre-expresión de HER2) Tejido: glándula mamaria humana; mama; conducto; carcinoma ductal
15. Lisados tumorales BT-474. Se inoculó a los ratones BT-474. Después de 2 semanas se recogieron los tumores. Los tumores recogidos se homogeneizaron para producir lisados tumorales

Preparación de materiales

Material patrón/solución madre: La solución madre patrón de ELISA de fosfo HER2 es el material patrón puro. El material patrón se preparó recogiendo lisados de tres placas de cultivo celular de de 245x245 mm que contenían células SK-BR-3 (SKBR3), que eran del 80 % al 90 % confluyentes. Los lisados celulares se aclararon por centrifugación y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se usa como material patrón.

Al material patrón se le asignó una concentración de 1.056 U/ml de modo que la del calibrador más bajo en el ensayo que presentaba intervalo fuera de 1 U/ml. Una unidad se define como la cantidad de tirosina fosforilada medida en un lisado celular SK-BR-3 que contiene 277 pg de HER2 total determinado por el ELISA de HER2 total.

Controles de lisado celular: Los controles de lisado celular se prepararon a partir del material patrón. El material patrón se diluyó en tampón de lisis para obtener niveles de HER2/pTyr que representen los intervalos bajo, medio, y alto del la curva patrón del ensayo.

Controles de lisado tisular: Los controles de lisado tisular se prepararon a partir de los lisados tumorales BT474. Los lisados tumorales BT474 se diluyeron en tampón de lisis para obtener niveles de HER2/pTyr que representen el intervalo alto de la curva patrón del ensayo.

Fuente de recubrimiento: La solución madre I de cabra anti-ECD de HER2 se preparó diluyendo el material fuente (9,6 mg/ml) a 100 µg/ml en PBS.

Conjugado biotinilado: El anticuerpo murino biotinilado anti-fosfotirosina (1 µg/ml) se adquirió en Upstate Biotech. El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal IgG2b-kappa, biotinilado, purificado con proteína A, creado contra fosfotiramina acoplado a KLH. El anticuerpo monoclonal biotinilado antifosfotirosina (clon 4G10, Cat. n° 05-321) es específico para fosfotirosina y no reacciona de forma cruzada con fosfoserina o fosfotreonina.

Especificada del anticuerpo de cabra anti-ECD de HER2: La activación del receptor HER2 se inicia cuando sucede la dimerización del receptor con otros miembros de la familia. Salvo que la señalización se deba estrictamente a la homodimerización de HER2, EGFR, HER3, y/o HER4 deben expresarse dentro del tumor activo. Cada uno de estos receptores puede estar presente en muestras de lisado tisular de ovario y podría interferir en la medición precisa de la fosforilación de tirosina asociada a HER2 (HER2/pTyr) si estos receptores reaccionan de forma cruzada con el anticuerpo de recubrimiento.

La especificidad del anticuerpo de cabra anti-ECD de HER2 se determinó por análisis de resonancia de plasmón superficial (BIACORE 3000®, BIACORE® International AB, Neuchâtel, Suiza). El anticuerpo de cabra anti-ECD de HER2 se inmovilizó en un chip sensor CM5 usando química de acoplamiento amina. El chip sensor se bloqueó con etanolamina-HCl 1 M, pH 8,5, y se condicionó con HCl 10 mM. La especificidad se determinó inyectando EGFR recombinante soluble (sEGFR) (Research Diagnostics, Inc., Flanders, NJ) y proteínas de fusión de ECD de HER2 recombinante humano/Fc de IgG1 humana sobre el anticuerpo de cabra anti-HER2 inmovilizado. Las proteínas de fusión consistían en el ECD de HER2, HER3, o HER4 fusionado a la región Fc marcada con 6X histidina carboxi-terminal de IgG1 humana mediante un enlazador peptídico (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Las respuestas relativas con la referencia sustraída para sEGFR, HER3-Fc, y HER4-Fc fueron -41 RU, 0,3 RU, y 2,5 RU, respectivamente. La respuesta relativa negativa obtenida para sEGFR se debió a cambios en el índice de refracción entre la fase móvil (HBS-EP) y el excipiente de la muestra. La respuesta relativa para HER2-Fc fue 374 RU.

Métodos

El ELISA de fosfo HER2 utiliza placas de media área COSTAR™ (A/2) recubiertas con el anticuerpo de cabra anti-ECD de HER2 a 4 µg/ml en tampón carbonato sódico 0,5 M, pH 9,6, e incubadas 18-72 horas a 2°C-8°C. Los pocillos se bloquean con aproximadamente 150 µl/pocillo de diluyente de ensayo durante 1-2 horas y después se añaden 50 µl/pocillo de patrones, controles, y muestras. La dilución mínima para lisados tisulares de tumor de ovario es 1/40 en tampón de lisis. Los patrones, controles, y muestras se incuban 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Los pocillos se lavan con PBS/0,05 TWEEN 20™ y se añaden 250 ng/ml de anticuerpo biotinilado anti-fosfotirosina. Después de 2 horas, los pocillos se lavan y se añade AMDEX™ estreptavidina-HRP. AMDEX™ estreptavidina-HRP (SA-HRP) es un conjugado polimérico con múltiples marcadores enzimáticos unidos a la estreptavidina. Después de 15 minutos, los pocillos se lavan y se añade un sustrato tetrametil-bencidina (TMB) y se deja desarrollar durante 15 minutos antes de detenerse con ácido fosfórico 1 M. La absorbancia se mide usando un lector de placa SPECTRAMAX™ (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA) con un filtro de 450 nm y un filtro de referencia de 650 nm. Las concentraciones de muestra se calculan con relación a un ajuste lógico de cuatro parámetros, no lineal de una curva patrón de siete puntos (Marquardt, D. J. *Soc. Indust. Appl. Math.* 431-441 (1963)). El intervalo de ensayo del ELISA es de 1 a 32 U/ml. Las unidades son unidades arbitrarias, donde 1 U es igual a la cantidad de tirosina fosforilada medida en un lisado celular SK-BR-3 que contiene 277 pg de HER2 total. El límite inferior del ensayo se estableció a 1 U/ml y se definió por el límite inferior de detección.

La precisión del ELISA de fosfo HER2 se re-evaluó después de re-assignar la concentración del material patrón. Se evaluó la precisión intra- e inter-ensayo determinando el coeficiente de variación (CV) de HER2/pTyr en un lisado celular SKBR3 a tres niveles diferentes. El lisado celular SKBR3 se diluyó para obtener los niveles de HER2 que representan los intervalos bajo, medio, y alto de la curva patrón del ensayo. Después de re-assignar la concentración del material patrón, el control alto no estaba dentro del intervalo alto de la curva patrón del ensayo. Por lo tanto, se diluyó un control de lisado tisular BT474 para que estuviera dentro del intervalo alto. Los lisados, que se procesaron como controles de ensayo, se analizaron por duplicado durante 5 días. Los datos de control se importaron en STATVIEW para el análisis ANOVA™ para determinar la desviación típica intra- e inter-ensayo.

Los CV se calcularon del siguiente modo:

$$100 \times (\text{desviación típica}) / (\text{valor medio de control})$$

Los CV de la precisión intra-ensayo fueron del 4 %, 4 %, 3 %, y 11 % para los controles BT474, alto, medio, y bajo, respectivamente. Los CV de la precisión inter-ensayo fueron del 5 %, 6 %, 5 %, y 14 % para los controles de BT474, alto, medio, y bajo, respectivamente.

Durante el desarrollo del ELISA de fosfo HER2, se diluyó un lisado celular SKBR3 a 22,9, 6,39, y 1,71 U/ml en lisado celular MDA468 puro. Las muestras se diluyeron en tampón de lisis que contenía SKBR3 HER2/pTyr para mantener un nivel constante de HER2/pTyr en toda la serie de dilución completa mientras se reducían los efectos de matriz. La serie de dilución se analizó en el ELISA de fosfo HER2 y se comparó con SKBR3 HER2/pTyr son MDA468 para determinar la recuperación.

El porcentaje de recuperación se calculó del siguiente modo:

$$100 \times \frac{\text{SKBR3 HER2/pTyr diluido en MDA468}}{\text{SKBR3 HER2/pTyr diluido en tampón de lisis}}$$

Los resultados para la recuperación de SKBR3 HER2/pTyr a los tres niveles en presencia de lisado celular MDA468, revelaron que la matriz potencia significativamente la recuperación en diluciones de muestra entre puro y 1/16 al nivel de 1,71 U/ml, con recuperaciones de HER2/pTyr entre el 120 % y el 127 %. No se observó interferencia de la matriz a ningún otro nivel. Se demuestra recuperación entre el 80 % y el 120 % en cada nivel empezando a una dilución de muestra de 1/16 en tampón de lisis.

Los lisados de tumor de ovario y BT474 se diluyeron en serie dos veces en tampón de lisis y se analizaron en el ELISA de fosfo HER2. La dilución de partida para las muestras de BT474, que se analizaron durante el desarrollo, fue 1/20. Los lisados de ovario se analizaron después de re-asignar la concentración del material patrón. La dilución de partida para los lisados de ovario varió de acuerdo con las concentraciones esperadas de HER2/pTyr.

La diferencia porcentual para la serie de dilución, que es un indicador de la linealidad de la dilución de la muestra, se calculó del siguiente modo:

$$100 \times \frac{(\text{mayor valor de resultado corregido} - \text{menor valor de resultado corregido})}{(\text{promedio de los valores mayor y menor de resultado corregidos})}$$

Las diferencias porcentuales para lisado tisular de ovario HF8198 se calcularon partiendo a una dilución de 1/80, 1/160, o 1/320. Las diferencias porcentuales para lisado tisular de ovario HF7945 se calcularon partiendo a una dilución de 1/320, 1/640, o 1/1280. Las diferencias porcentuales para los lisados tisulares de ovario restantes se calcularon partiendo a una dilución de 1/20, o 1/40, para determinar la dilución mínima así como para evaluar la linealidad de la dilución.

Las diferencias para la serie de dilución de BT474 variaron del -9 % al 12 %. Las diferencias para la serie de dilución de HF7930 y HF7934 partiendo a una dilución 1/10 fueron del 43 % y 38 %, respectivamente. Las diferencias para HF8197 fueron del 2 %, 8 %, y 5 % para series de dilución partiendo a 1/320, 1/160, y 1/1280, respectivamente. Las diferencias para HF8198 fueron del 72 %, 34 %, y 3 %, para series de dilución partiendo a 1/80, 1/160, y 1/320, respectivamente.

Se analizaron dieciocho lisados tisulares de ovario diferentes en el ELISA de fosfo HER2 después de cambiar la concentración del material patrón. Las muestras se diluyeron dos veces partiendo de 1/20 a 1/160. Una muestra fue LTR a una dilución 1/20; 10 muestras fueron LTR a una dilución 1/40. Siete muestras tuvieron niveles medibles de HER2/pTyr a diluciones 1/20 y 1/40 y una muestra tuvo niveles medibles de HER2/pTyr hasta una dilución 1/80. Las diferencias para muestras que tenían niveles medibles de HER2/pTyr a diluciones 1/20 y 1/40 variaron del 16 % al 34 %, con tres de siete muestras con diferencias menores del 20 %. La única muestra que tuvo niveles medibles de HER2/pTyr hasta una dilución 1/80, la muestra HF7931, tuvo diferencias del 16 % y 4 % para series de dilución partiendo a 1/20 y 1/40, respectivamente.

Se analizaron pertuzumab y trastuzumab en el ELISA de fosfo HER2 para determinar si estos agentes terapéuticos interfieren. Los anticuerpos se diluyeron hasta concentraciones que variaban de 1,5 a 10.000 ng/ml en lisados de células MCF7 estimuladas con heregulina (MCF7+) que contenían 98,48 U/ml de HER2/pTyr.

Durante el desarrollo, los lisados celulares y tisulares se sometieron a cuatro ciclos de congelación y descongelación para determinar los efectos de los ciclos de temperatura. El lisado celular SKBR3 y los lisados tumorales BT474 congelados se descongelaron a temperatura ambiente. De cada lisado se retiraron 10 µl y se diluyeron en diluyente de ensayo. Los lisados restantes se congelaron rápidamente en una mezcla de hielo seco y metanol y se descongelaron de nuevo. Se retiraron una vez más muestras de ensayo y se diluyeron en diluyente de ensayo (primer ciclo de congelación/descongelación, 1x). El procedimiento de congelación rápida, descongelación y recogida de muestras se repitió dos veces para obtener muestras del segundo y tercer ciclos de congelación/descongelación (2x y 3x, respectivamente).

Las muestras diluidas se ensayaron en el ELISA de fosfo HER2 para determinar la recuperación de HER2/pTyr con respecto a la muestra "reciente". La muestra "reciente" es la muestra tomada de la descongelación inicial.

La recuperación de SKBR3 HER2/pTyr para las muestras 1x, 2x, y 3x fue del 104 %, 109 %, y 113 %, respectivamente. La recuperación de BT474 HER2/pTyr en la muestra 314A fue del 99 %, 103 %, y 99 %, para las muestras 1x, 2x, y 3x, respectivamente. La recuperación de BT474 HER2/pTyr en la muestra 365 fue del 111 %, 96 %, y 99 %, para las muestras 1x, 2x, y 3x, respectivamente.

El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se estableció como la concentración promedio del control bajo, 1,35 U/ml. Como el control bajo se incluye dentro de cada experimento, es un indicador fiable del límite inferior al que las muestras pueden medirse de forma precisa. Por lo tanto, la concentración mínima cuantificable en el ELISA de fosfo HER2 es el LLOQ multiplicado por la dilución mínima de la muestra (1/40), o 54 U/ml.

Conclusiones

Se desarrolló un ELISA sensible y preciso para medir la fosforilación de tirosina asociada a HER2 (HER2/pTyr) en lisados tisulares tumorales. El ELISA de fosfo HER2 demostró una sensibilidad por debajo de 1,35 U/ml con una concentración mínima cuantificable de 54 U/ml, donde 1 U es igual a la cantidad de tirosina fosforilada medida en un lisado celular SK-BR-3 que contiene 277 pg de HER2 total. El ELISA de fosfo-HER2 demostró una buena precisión a cuatro niveles. Los CV de precisión intra-ensayo fueron del 4 %, 3 %, 3 %, y 11 %, para el control de lisado tisular BT474 y los controles de lisado celular SKBR3 alto, medio y bajo, respectivamente. Los CV de precisión inter-ensayo fueron del 5 %, 6 %, 5 %, y 14 %, para el control de lisado tisular BT474 y los controles de lisado celular SKBR3 alto, medio y bajo, respectivamente.

El ELISA de fosfo HER2 demostró una buena recuperación de HER2/pTyr en presencia de lisado celular MDA468. Partiendo a una dilución 1/16, las recuperaciones variaron del 88 % al 120 %. El ELISA demostró alta especificidad ya que EGFR, HER3-IgG Fc, y HER4-IgG Fc no reaccionan de forma cruzada con el anticuerpo de recubrimiento del ensayo.

Se usaron lisados tisulares de tumor de ovario humano y tumor de xenoinjerto de ratón BT474 para analizar la linealidad de la dilución y la dilución mínima de la muestra. Las diferencias de los valores de dilución corregidos para los lisados tumorales BT474 variaban del -9 % al 12 %. De los siete lisados de ovario que tuvieron niveles medibles de HER2/pTyr a diluciones 1/20 y 1/40, solamente tres tuvieron diferencias menores del 20 %, mientras que seis de siete tuvieron diferencias menores de o iguales al 23 %. La única muestra que tuvo niveles medibles de HER2/pTyr hasta una dilución 1/80, la muestra HF7931, tuvo una diferencia del 4 % para la serie de dilución partiendo a 1/40. Todas las muestras anteriores no cumplieron los criterios de ≤ 20 % a una dilución mínima de 1/20, por lo tanto, la dilución mínima de la muestra será 1/40.

Los lisados tisulares BT474 y las muestras de lisado tisular de ovario humano HF8197 y HF8198 tuvieron elevados niveles medibles de HER2/pTyr y requirieron diluciones entre 1/80 a 1/320 para que estuvieran dentro del intervalo cuantitativo del ensayo. Las muestras BT474 y la muestra HF8197, que tuvieron la mayor concentración medida de HER2/pTyr dentro del subconjunto de tejido tumoral de ovario humano, se diluyeron de forma lineal en todo el intervalo de ensayo completo. En contraste, la muestra HF8198 se diluyó de forma no lineal ya que las concentraciones de HER2/pTyr de dilución corregida aumentaban de forma monótona en todo el intervalo del ensayo y parecían estancarse a una dilución 1/320.

Los lisados celulares SKBR3 sometidos a tres ciclos de congelación/descongelación demostraron muy buena recuperación. La recuperación de HER2/pTyr varió del 104 % al 113 % con respecto a la misma muestra recién descongelada.

Dos lisados tumorales BT474 también se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación. La recuperación de fosfo HER2 de BT474 varió del 99 % al 103 %. La recuperación de HER2/pTyr de BT474 varió del 96 % al 111 %. Por lo tanto, los ciclos de temperatura no parecen afectar a la actividad de fosfo HER2.

El ELISA de fosfo HER2 no muestra ninguna interferencia por parte de pertuzumab o trastuzumab.

EJEMPLO 3

PERFILADO DE EXPRESIÓN GÉNICA PARA DETERMINAR LA ACTIVACIÓN DE HER2

Este ejemplo muestra cómo puede evaluarse la activación de HER2 determinando los perfiles de expresión génica como alternativa a determinar la fosforilación de HER2 directamente. Este perfilado puede hacerse sobre muestras de tumor de ovario recientes, congeladas, o embebidas en parafina, fijadas con formalina, pero preferiblemente las últimas.

Se perfilaron muestras de cáncer de ovario tratadas con pertuzumab para su expresión génica usando análisis de microserie AFFYMETRIX® realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos de expresión de la microserie se analizaron para identificar los patrones génicos que se estarían asociados con el estado de fosforilación de HER2. De forma remarcable, surgió un patrón en que tumores con niveles relativamente elevados de

expresión de EGFR, HER2, HER3, y el ligado de HER betacelulina también eran positivos para la fosforilación de HER2. La correlación fue positiva en seis de los seis casos de fosforilación de HER2 positiva, y ninguno de los casos de fosforilación de HER2 negativa se predijo como positivo usando los datos de expresión de la microserie como base para el algoritmo.

5 En un segundo análisis, la predicción del estado de fosforilación de HER2 se consiguió usando un único gen solamente, concretamente betacelulina. Los seis tumores de fosforilación de HER2 positiva tuvieron una expresión de betacelulina por encima de la media, de nuevo usando los datos de expresión de la microserie.

10 Se usó un segundo método para cuantificar la expresión génica, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), para validarla, y se comparó con los datos de la microserie. La qRT-PCR sería un método preferido para medir la expresión génica en la muestra típica del paciente disponible en un entorno clínico. Las plataformas tecnológicas de diagnóstico ya están establecidas para este método. La qRT-PCR se realizó como se describe en Cronin et al., Am. J. Pathol. 164 (1): 35-42 (2004); y Ma et al., Cancer Cell 5: 607-616 (2004). Se extrajo el ARN de tumores de ovario congelados usando reactivos disponibles en el mercado en Qiagen, Valencia, California. Los cebadores y sondas para el análisis por qRT-PCR TAQMAN™ se diseñaron para dar longitudes de amplicón de aproximadamente 100 bases o menos. Los transcritos se cuantificaron por qRT-PCR usando un instrumento TAQMAN™ (Applied BioSystems), con niveles de expresión de los genes de ensayo normalizados a los de los genes de referencia. Se seleccionó el gen "de mantenimiento" GUS como gen de control a causa de su baja
20 varianza y elevada expresión.

Basándose en los experimentos indicados anteriormente se desarrolló un algoritmo basado en los datos de perfilado de la expresión génica de tumores con estado de fosforilación conocido de HER2 por ELISA. Un tumor se considera positivo para un perfil de expresión génica asociado con fosforilación de HER2 si tiene expresión de betacelulina o anfiregulina y HER2 en la media o por encima y/o expresión de EGFR y/o HER3 en la media o por encima. Como alternativa, puede medirse solamente la expresión de betacelulina o anfiregulina por qRT-PCR para identificar tumores con fosforilación prevista de HER2.
25

Listado de Secuencias

- 30 <110> GENENTECH, INC. DERYNCK, MIKA K. KELSEY, STEPHEN M.
- <120> Prolongación del tiempo hasta la progresión de la enfermedad o supervivencia en pacientes de cáncer
- 35 <130> P2206R1
- <150> US 60/655.277
- <151> 23-02-2005
- 40 <160> 22
- <210> 1
- <211> 107
- <212> PRT
- 45 <213> Mus musculus
- <400> 1

Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 95 100 105
 Ile Lys

5 <210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2

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

10 <210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> secuencia sintetizada
 20 <400> 3

Asp **Ile** **Gln** **Met** **Thr** **Gln** **Ser** **Pro** **Ser** **Ser** **Leu** **Ser** **Ala** **Ser** **Val**
1 **5** **10** **15**
Gly **Asp** **Arg** **Val** **Thr** **Ile** **Thr** **Cys** **Lys** **Ala** **Ser** **Gln** **Asp** **Val** **Ser**
20 **25** **30**
Ile **Gly** **Val** **Ala** **Trp** **Tyr** **Gln** **Gln** **Lys** **Pro** **Gly** **Lys** **Ala** **Pro** **Lys**
35 **40** **45**
Leu **Leu** **Ile** **Tyr** **Ser** **Ala** **Ser** **Tyr** **Arg** **Tyr** **Thr** **Gly** **Val** **Pro** **Ser**
50 **55** **60**
Arg **Phe** **Ser** **Gly** **Ser** **Gly** **Ser** **Gly** **Thr** **Asp** **Phe** **Thr** **Leu** **Thr** **Ile**
65 **70** **75**
Ser **Ser** **Leu** **Gln** **Pro** **Glu** **Asp** **Phe** **Ala** **Thr** **Tyr** **Tyr** **Cys** **Gln** **Gln**
80 **85** **90**
Tyr **Tyr** **Ile** **Tyr** **Pro** **Tyr** **Thr** **Phe** **Gly** **Gln** **Gly** **Thr** **Lys** **Val** **Glu**
95 **100** **105**
Ile **Lys**

5 <210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia sintetizada
 10 <400> 4

Glu **Val** **Gln** **Leu** **Val** **Glu** **Ser** **Gly** **Gly** **Gly** **Leu** **Val** **Gln** **Pro** **Gly**
1 **5** **10** **15**
Gly **Ser** **Leu** **Arg** **Leu** **Ser** **Cys** **Ala** **Ala** **Ser** **Gly** **Phe** **Thr** **Phe** **Thr**
20 **25** **30**
Asp **Tyr** **Thr** **Met** **Asp** **Trp** **Val** **Arg** **Gln** **Ala** **Pro** **Gly** **Lys** **Gly** **Leu**
35 **40** **45**
Glu **Trp** **Val** **Ala** **Asp** **Val** **Asn** **Pro** **Asn** **Ser** **Gly** **Gly** **Ser** **Ile** **Tyr**
50 **55** **60**
Asn **Gln** **Arg** **Phe** **Lys** **Gly** **Arg** **Phe** **Thr** **Leu** **Ser** **Val** **Asp** **Arg** **Ser**
65 **70** **75**
Lys **Asn** **Thr** **Leu** **Tyr** **Leu** **Gln** **Met** **Asn** **Ser** **Leu** **Arg** **Ala** **Glu** **Asp**
80 **85** **90**
Thr **Ala** **Val** **Tyr** **Tyr** **Cys** **Ala** **Arg** **Asn** **Leu** **Gly** **Pro** **Ser** **Phe** **Tyr**
95 **100** **105**
Phe **Asp** **Tyr** **Trp** **Gly** **Gln** **Gly** **Thr** **Leu** **Val** **Thr** **Val** **Ser** **Ser**
110 **115**

15 <210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> secuencia sintetizada
 <400> 5

Asp **Ile** **Gln** **Met** **Thr** **Gln** **Ser** **Pro** **Ser** **Ser** **Leu** **Ser** **Ala** **Ser** **Val**
1 **5** **10**
Gly **Asp** **Arg** **Val** **Thr** **Ile** **Thr** **Cys** **Arg** **Ala** **Ser** **Gln** **Ser** **Ile** **Ser**
20 **25** **30**
Asn **Tyr** **Leu** **Ala** **Trp** **Tyr** **Gln** **Gln** **Lys** **Pro** **Gly** **Lys** **Ala** **Pro** **Lys**
35 **40** **45**
Leu **Leu** **Ile** **Tyr** **Ala** **Ala** **Ser** **Ser** **Leu** **Glu** **Ser** **Gly** **Val** **Pro** **Ser**
50 **55** **60**
Arg **Phe** **Ser** **Gly** **Ser** **Gly** **Ser** **Gly** **Thr** **Asp** **Phe** **Thr** **Leu** **Thr** **Ile**
65 **70** **75**
Ser **Ser** **Leu** **Gln** **Pro** **Glu** **Asp** **Phe** **Ala** **Thr** **Tyr** **Tyr** **Cys** **Gln** **Gln**
80 **85** **90**
Tyr **Asn** **Ser** **Leu** **Pro** **Trp** **Thr** **Phe** **Gly** **Gln** **Gly** **Thr** **Lys** **Val** **Glu**
95 **100** **105**
Ile **Lys**

5 <210> 6
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia sintetizada
 <400> 6

Glu **Val** **Gln** **Leu** **Val** **Glu** **Ser** **Gly** **Gly** **Gly** **Leu** **Val** **Gln** **Pro** **Gly**
1 **5** **10**
Gly **Ser** **Leu** **Arg** **Leu** **Ser** **Cys** **Ala** **Ala** **Ser** **Gly** **Phe** **Thr** **Phe** **Ser**
20 **25** **30**
Ser **Tyr** **Ala** **Met** **Ser** **Trp** **Val** **Arg** **Gln** **Ala** **Pro** **Gly** **Lys** **Gly** **Leu**
35 **40** **45**
Glu **Trp** **Val** **Ala** **Val** **Ile** **Ser** **Gly** **Asp** **Gly** **Gly** **Ser** **Thr** **Tyr** **Tyr**
50 **55** **60**
Ala **Asp** **Ser** **Val** **Lys** **Gly** **Arg** **Phe** **Thr** **Ile** **Ser** **Arg** **Asp** **Asn** **Ser**
65 **70** **75**
Lys **Asn** **Thr** **Leu** **Tyr** **Leu** **Gln** **Met** **Asn** **Ser** **Leu** **Arg** **Ala** **Glu** **Asp**
80 **85** **90**
Thr **Ala** **Val** **Tyr** **Tyr** **Cys** **Ala** **Arg** **Gly** **Arg** **Val** **Gly** **Tyr** **Ser** **Leu**
95 **100** **105**
Tyr **Asp** **Tyr** **Trp** **Gly** **Gln** **Gly** **Thr** **Leu** **Val** **Thr** **Val** **Ser** **Ser**
110 **115**

15 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia sintetizada.
 <220>
 <221> xaa

ES 2 440 481 T3

<222> 6
<223> xaa es preferentemente Y o E

5 <220>
<221> Xaa
<222> 7
<223> xaa es preferentemente T o S

10 <400> 11

ser Ala ser Tyr Xaa Xaa Xaa
5

15 <210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia sintetizada.
<400> 12

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
5

25 <210> 13
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia sintetizada.
<400> 13

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

 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 185 190 195
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 200 205 210

 Arg Gly Glu Cys

<210> 14
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintetizada.

10

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val₅ Glu Ser Gly Gly Gly₁₀ Leu Val Gln Pro Gly₁₅
 Gly Ser Leu Arg Leu₂₀ Ser Cys Ala Ala Ser₂₅ Gly Phe Thr Phe Thr₃₀
 Asp Tyr Thr Met Asp₃₅ Trp Val Arg Gln Ala₄₀ Pro Gly Lys Gly Leu₄₅
 Glu Trp Val Ala Asp₅₀ Val Asn Pro Asn Ser₅₅ Gly Gly Ser Ile Tyr₆₀
 Asn Gln Arg Phe Lys₆₅ Gly Arg Phe Thr Leu₇₀ Ser Val Asp Arg Ser₇₅
 Lys Asn Thr Leu Tyr₈₀ Leu Gln Met Asn Ser₈₅ Leu Arg Ala Glu Asp₉₀
 Thr Ala Val Tyr Tyr₉₅ Cys Ala Arg Asn Leu₁₀₀ Gly Pro Ser Phe Tyr₁₀₅
 Phe Asp Tyr Trp Gly₁₁₀ Gln Gly Thr Leu Val₁₁₅ Thr Val Ser Ser Ala₁₂₀
 Ser Thr Lys Gly Pro₁₂₅ Ser Val Phe Pro Leu₁₃₀ Ala Pro Ser Ser Lys₁₃₅
 Ser Thr Ser Gly Gly₁₄₀ Thr Ala Ala Leu Gly₁₄₅ Cys Leu Val Lys Asp₁₅₀
 Tyr Phe Pro Glu Pro₁₅₅ Val Thr Val Ser Trp₁₆₀ Asn Ser Gly Ala Leu₁₆₅
 Thr Ser Gly Val His₁₇₀ Thr Phe Pro Ala Val₁₇₅ Leu Gln Ser Ser Gly₁₈₀
 Leu Tyr Ser Leu Ser₁₈₅ Ser Val Val Thr Val₁₉₀ Pro Ser Ser Ser Leu₁₉₅
 Gly Thr Gln Thr Tyr₂₀₀ Ile Cys Asn Val Asn₂₀₅ His Lys Pro Ser Asn₂₁₀

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 320 325 330
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 335 340 345
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 350 355 360
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 365 370 375
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 380 385 390
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 395 400 405
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 410 415 420
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 425 430 435
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445

<210> 15
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada.

<400> 15

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

				50						55				60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65					70					75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90
His	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
				110					115					120
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
				125					130					135
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
				140					145					150
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu
				155					160					165
Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr
				170					175					180
Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
				185					190					195
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
				200					205					210
Arg Gly Glu Cys														

<210> 16
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia sintetizada

10

<400> 16

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

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 125 130

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 140 145

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 155 160 165

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 170 175 180

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 185 190 195

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 200 205 210

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 215 220 225

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 320 325 330

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 335 340 345

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 350 355 360

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 365 370 375

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 380 385 390

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 395 400 405

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 410 415 420

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 425 430 435

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445

<210> 17
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada.

<400> 17

5

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln
 20 25 30
 Asp Val Ser Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly
 50 55 60
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 65 70 75
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 80 85 90
 Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 95 100 105
 Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
 110 115 120
 Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 125 130 135
 Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 140 145 150
 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
 155 160 165
 Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 170 175 180
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 185 190 195
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 200 205 210
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215

<210> 18

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia sintetizada.

<400> 18

15

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

				35					40					45
Glu	Trp	Val	Ala	Asp 50	Val	Asn	Pro	Asn	Ser 55	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr 60
Asn	Gln	Arg	Phe	Lys 65	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu 70	Ser	Val	Asp	Arg	Ser 75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr 80	Leu	Gln	Met	Asn	Ser 85	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp 90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu 100	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr 105
Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly 110	Gln	Gly	Thr	Leu	Val 115	Thr	Val	Ser	Ser	Ala 120
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro 125	Ser	Val	Phe	Pro	Leu 130	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys 135
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly 140	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly 145	Cys	Leu	Val	Lys	Asp 150
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro 155	Val	Thr	Val	Ser	Trp 160	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu 165
Thr	Ser	Gly	Val	His 170	Thr	Phe	Pro	Ala	Val 175	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly 180
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser 185	Ser	Val	Val	Thr	Val 190	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu 195
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr 200	Ile	Cys	Asn	Val	Asn 205	His	Lys	Pro	Ser	Asn 210
Thr	Lys	Val	Asp	Lys 215	Lys	Val	Glu	Pro	Lys 220	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr 225
His	Thr	Cys	Pro	Pro 230	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu 235	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro 240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe 245	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys 250	Asp	Thr	Leu	Met	Ile 255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu 260	Val	Thr	Cys	Val	Val 265	Val	Asp	Val	Ser	His 270
Glu	Asp	Pro	Glu	Val 275	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr 280	Val	Asp	Gly	Val	Glu 285
Val	His	Asn	Ala	Lys 290	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu 295	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser 300
Thr	Tyr	Arg	Val	Val 305	Ser	Val	Leu	Thr	Val 310	Leu	His	Gln	Asp	Trp 315
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu 320	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val 325	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu 330
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu 335	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys 340	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro 345
Arg	Glu	Pro	Gln	Val 350	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro 355	Ser	Arg	Glu	Glu	Met 360
Thr	Lys	Asn	Gln	Val 365	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu 370	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr 375

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 380 385 390
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 395 400 405
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 410 415 420
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 425 430 435
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 440 445

5
 <210> 19
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly
 20 25 30
 Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr
 35 40 45
 Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly
 50 55 60
 Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln
 65 70 75
 Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 80 85 90
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr
 95 100 105
 Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu
 110 115 120
 Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg
 125 130 135
 Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile
 140 145 150
 Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn
 155 160 165
 Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser
 170 175 180
 Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg
 185 190 195

10
 15
 <210> 20
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

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

<210> 21
 <211> 169
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

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

10

<210> 22
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 22

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

10

REIVINDICACIONES

1. Pertuzumab para su uso en un método para prolongar el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) o la supervivencia en un paciente con cáncer, comprendiendo el método administrar pertuzumab al paciente en una cantidad que prolonga el TTP o la supervivencia en el paciente, donde el cáncer del paciente es cáncer de ovario.
2. Pertuzumab para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el cáncer es cáncer de ovario avanzado, refractario o recurrente.
3. Pertuzumab para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el pertuzumab se administra en el método como único agente anti-tumoral.
4. Pertuzumab para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, comprendiendo el método administrar un segundo agente terapéutico al paciente.
5. Pertuzumab para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el segundo agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en agente quimioterapéutico, anticuerpo contra HER, anticuerpo dirigido contra un antígeno asociado a tumor, compuesto anti-hormonal, cardioprotector, citoquina, fármaco dirigido a EGFR, agente anti-angiogénico, inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de COX, fármaco anti-inflamatorio no esteroideo, inhibidor de farnesil transferasa, anticuerpo que se une a la proteína oncofetal CA 125, vacuna contra HER2, terapia dirigida a HER, inhibidor de Raf o ras, doxorubicina liposómica, topotecán, taxano, inhibidor dual de tirosina quinasa, TLK286, EMD-7200, un medicamento que trata las náuseas, un medicamento que previene o trata la erupción cutánea o terapia convencional para el acné, un medicamento que trata o previene la diarrea, un medicamento que reduce la temperatura corporal y un factor de crecimiento hematopoyético.
6. Pertuzumab para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.
7. Pertuzumab para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el agente quimioterapéutico es un agente quimioterapéutico antimetabolito.
8. Pertuzumab para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde el agente quimioterapéutico antimetabolito es gemcitabina.
9. Pertuzumab para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el segundo agente terapéutico es trastuzumab, erlotinib o bevacizumab.
10. Pertuzumab para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde se prolonga el TTP.
11. Pertuzumab para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde se prolonga la supervivencia.
12. Pertuzumab para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde en el método la administración de pertuzumab prolonga el TTP o la supervivencia al menos un 20 % más que el TTP o la supervivencia conseguida por la administración de un agente anti-tumoral aprobado al paciente con cáncer.
13. Pertuzumab para su uso en un método para prolongar el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) o la supervivencia en un paciente con cáncer de ovario, comprendiendo el método administrar pertuzumab al paciente en una cantidad que prolonga el TTP o la supervivencia en el paciente, donde el cáncer del paciente presenta activación de HER2.
14. Pertuzumab para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, donde el paciente tiene cáncer avanzado, refractario o recurrente.
15. Pertuzumab para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14, donde en el método la administración de pertuzumab al paciente prolonga el TTP o la supervivencia al menos un 20 % más que el TTP o la supervivencia conseguida por la administración de topotecán o doxorubicina liposómica al paciente.
16. Pertuzumab para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, comprendiendo adicionalmente el método administrar un agente quimioterapéutico al paciente.
17. Pertuzumab para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, donde el agente quimioterapéutico es un agente quimioterapéutico antimetabolito.

18. Pertuzumab para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, donde el agente quimioterapéutico antimetabolito es gemcitabina.

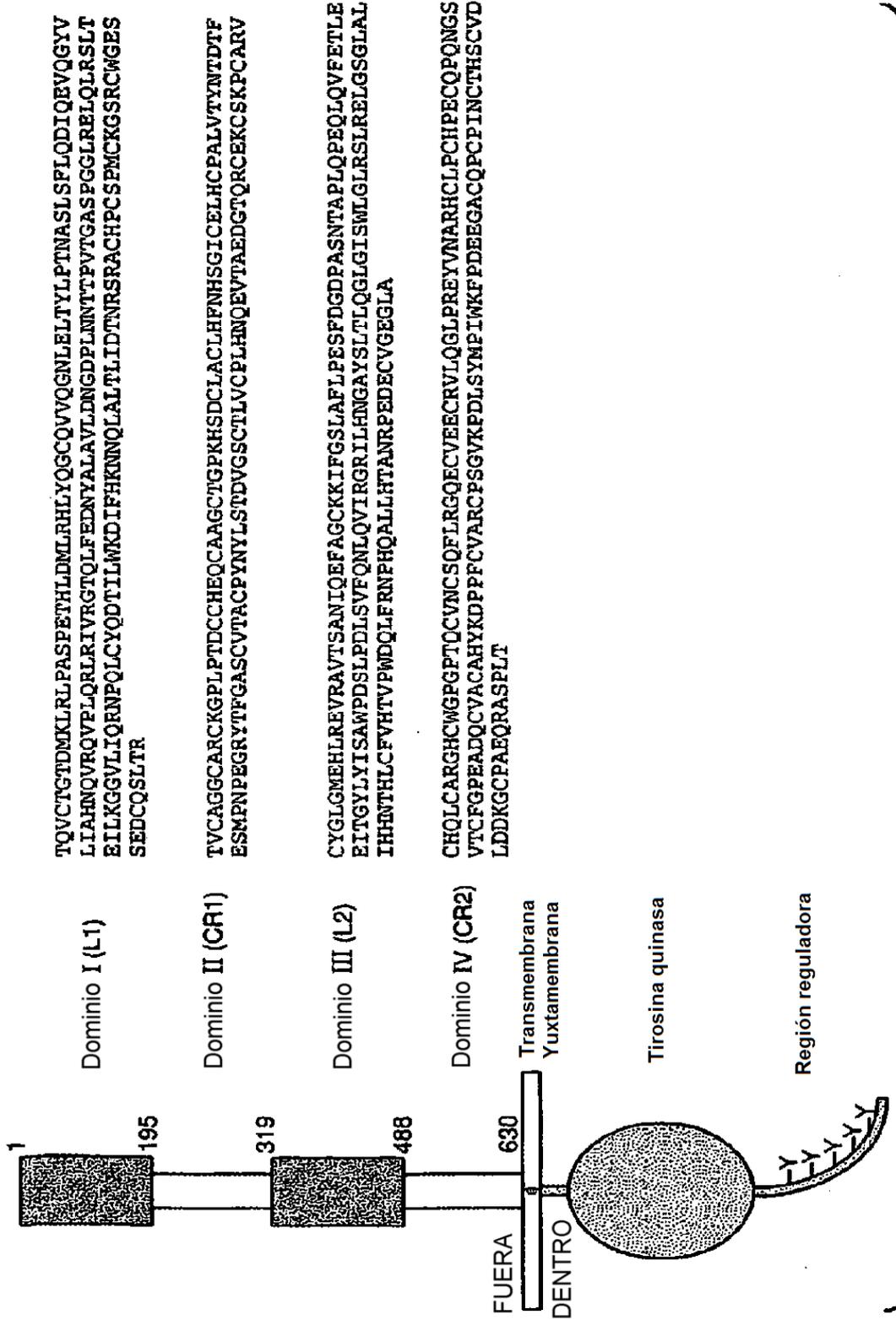


FIG. 1

Ligera variable

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQR	P
	** **** *	*		*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQK	P
		* ** ***		
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQK	P

	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA		
	** *	* *	* *	**
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFTGSGSGTDFTLTISLQ		P
	* *****			
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFTGSGSGTDFTLTISLQ		P

	90	100	
2C4	EDLAVYYC [QQYYIYPYT]	FGGGTKLEIK	(SEC ID N°: 1)
	* *	* *	
574	EDFATYYC [QQYYIYPYT]	FGQGTKVEIK	(SEC ID N°: 3)
	*** *		
hum κI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIK	(SEC ID N°: 5)

FIG. 2A

Pesada variable

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	** ** * * **** *			**
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		** * *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	

	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM		
	* * **	*** *	**** *	
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	***** ** * ****	* * *		
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL		

	abc	90	100ab	110	
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS		(SEC ID N°: 2)
	*** **		**		
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS		(SEC ID N°: 4)

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS		(SEC ID N°: 6)

FIG. 2B

Secuencia de aminoácidos para la cadena ligera de pertuzumab

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSIGVAWYQOKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS
70     80     90     100    110    120
|     |     |     |     |     |     |
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
130    140    150    160    170    180
|    |    |    |    |    |    |
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT
190    200    210
|    |    |
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

```

FIG. 3A

Secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de pertuzumab

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMHWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY
70     80     90     100    110    120
|     |     |     |     |     |     |
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSSA
130    140    150    160    170    180
|    |    |    |    |    |    |
STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
190    200    210    220    230    240
|    |    |    |    |    |    |
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGP
250    260    270    280    290    300
|    |    |    |    |    |    |
SVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
310    320    330    340    350    360
|    |    |    |    |    |    |
TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
370    380    390    400    410    420
|    |    |    |    |    |    |
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
430    440    448
|    |    |
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

```

FIG. 3B

EGFR activado por ligando heterodimeriza con HER2 2C4 se une en el sitio de unión heterodimérico

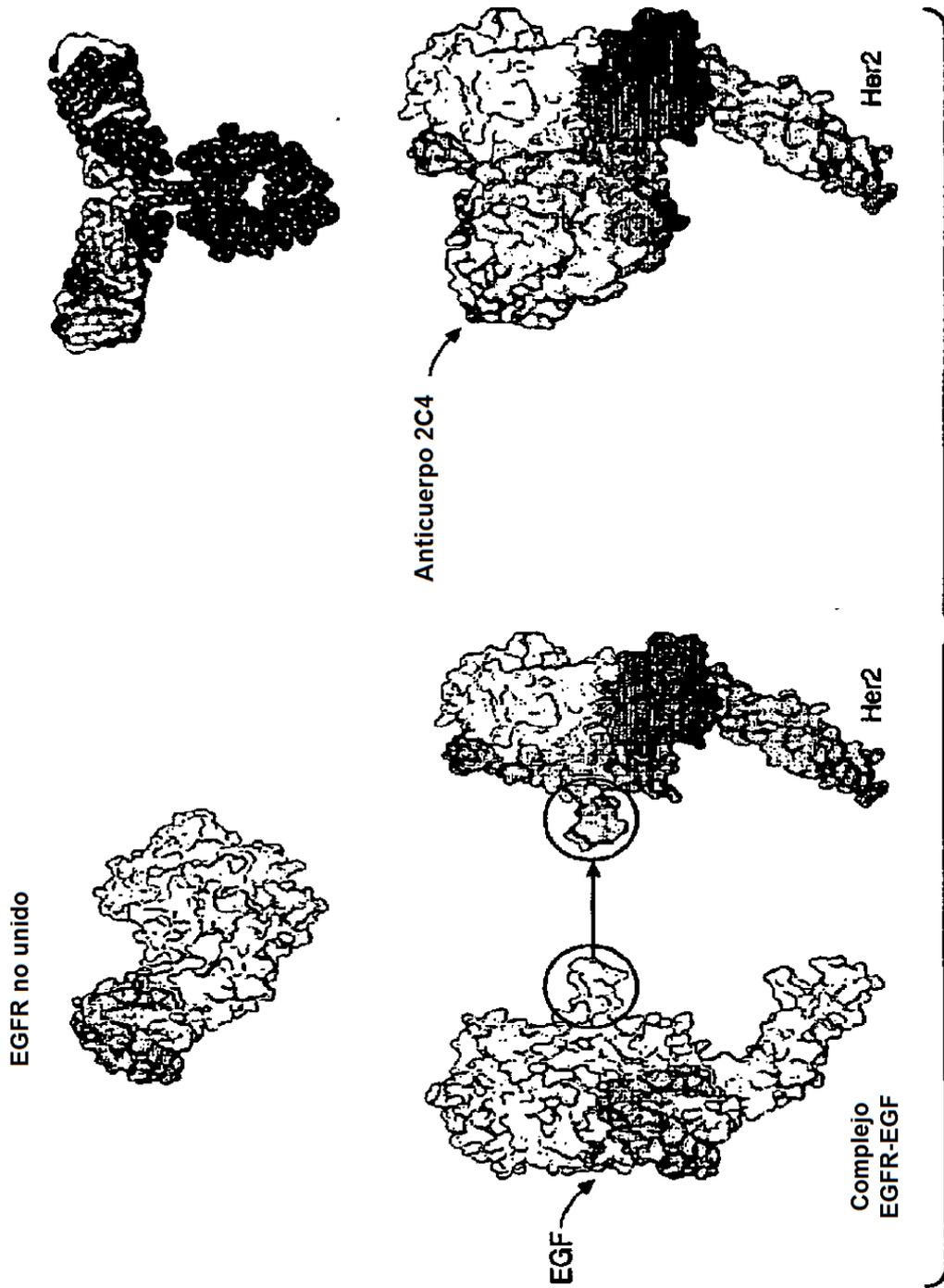


FIG. 4

Acoplamiento de HER2/3 a las vías de MAPK y Akt

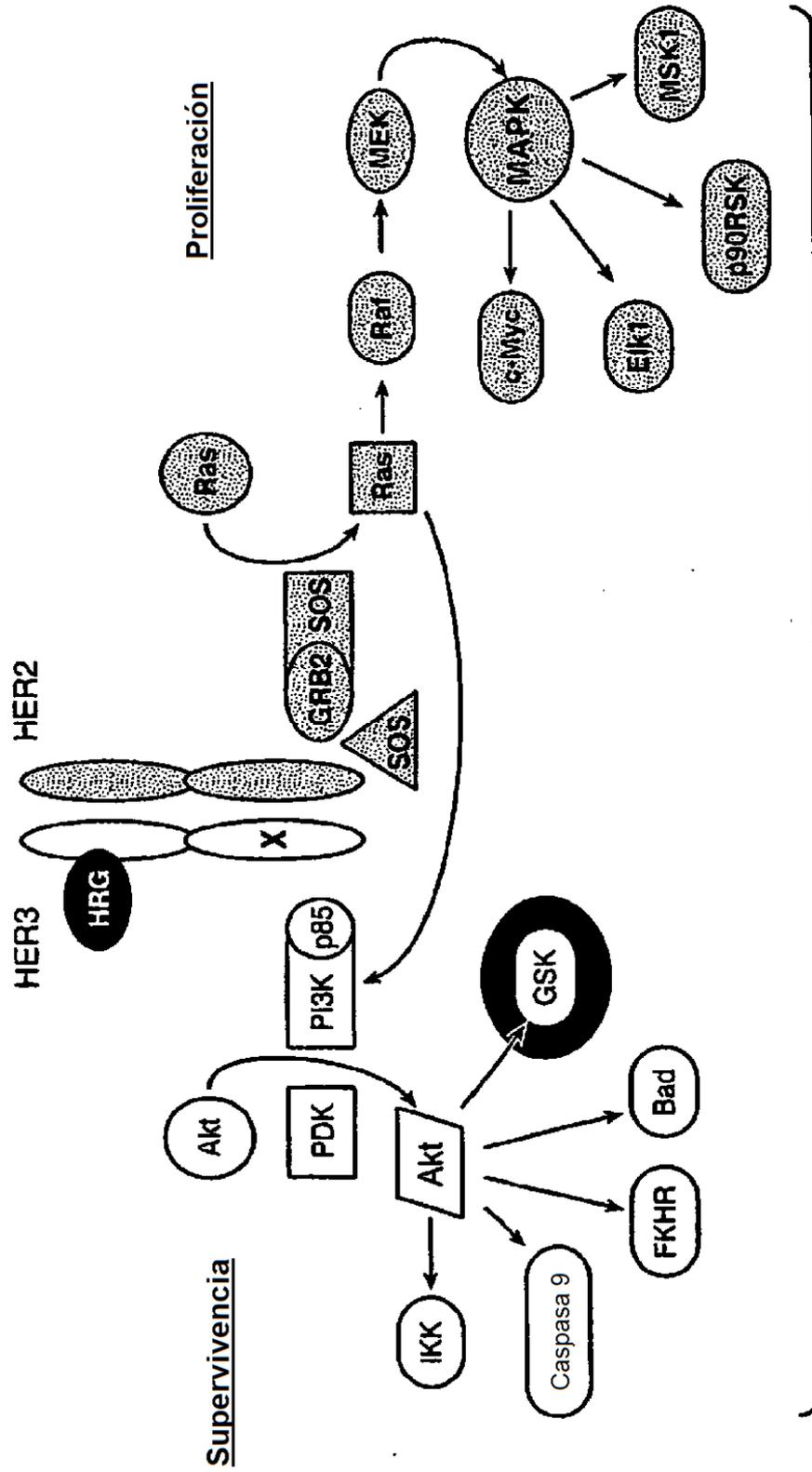
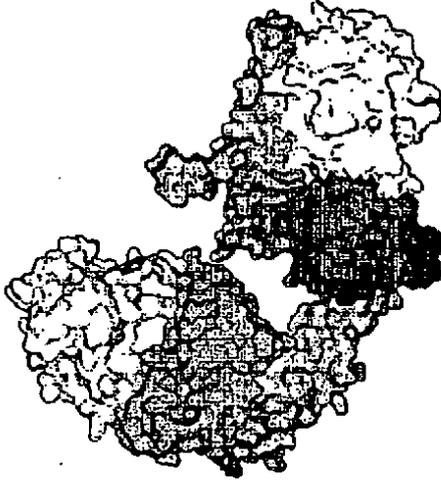


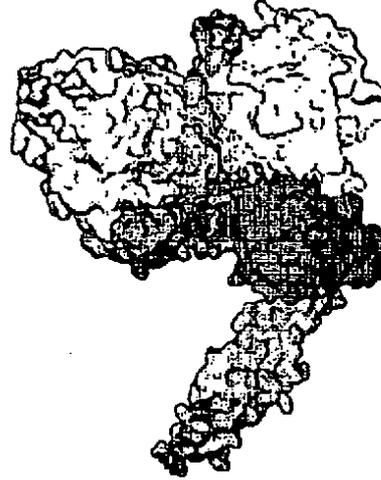
FIG. 5

**Trastuzumab
Herceptin**



- Se une en IV cerca de JM
- Protege contra el desprendimiento del receptor
- Afecta moderadamente a la modulación negativa del receptor
- Afecta ligeramente a HER2 en su papel como co-receptor

**Petruzumab
Omnitarg**



- Se une a II en la superficie de contacto de dimerización
- No evita el desprendimiento del receptor
- Afecta moderadamente a la regulación negativa del receptor
- Afecta especialmente a HER2 en su papel como co-receptor

FIG. 6

Cadena pesada

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDITYIHWVRRQAPGKGL 45
 30
 46 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSLRAED 90
 75
 91 TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFFLAPSS 135
 120
 136 KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALLTSGVHTFPAVLLQSS 180
 165
 181 GLYSSLSSVTVPSSSLGTTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPKSCDK 225
 210
 226 THTCPPCPAPELGGPSPVFLFPKPKD¹TL²MI³SRTPEVTCVVVDVS 270
 240
 271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY¹N²S³TYRVVSVLTVLHQD 315
 300
 316 WLVNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSREE 360
 330
 361 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK¹TT²PPVLDSDG 405
 390
 406 SFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSVMH¹EAL²HN³HYTQKSLSLSPG 449
 435

FIG. 7B

1 V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K 45
 46 A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y 90
 91 C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V 135
 136 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S 180
 181 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C 217

FIG. 8A

1 EVQLVESGGGLVQPFGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGL 45
 30
 46 EWVADVNPNSGGSIYNNQRFRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED 90
 75
 91 TAVYCARNLGPPSYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSSVFPPLAPSSK 135
 120
 136 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHFFPAVLQSSG 180
 165
 181 LYSLSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKKVDKKVEPKSCDKT 225
 210
 226 HTPPCPEAPPELLGGPSSVFLFPPKPKDITLMISRTPBEVTCVVVDVSH 270
 240
 271 EDPKFNWYVDGVEVHNAAKTKPRREEQYNSITYRVVSVLTVLHQDW 315
 285
 316 LNKKEYSKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPRREPQVYTLPPSREEM 360
 330
 361 TKNQVSLTCLVKGPYPSSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS 405
 375
 406 FFLYSKLTVDKSRWQQGQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSSLSPGK 449
 420

FIG. 8B

CARACTERÍSTICA	420 mg	1050 mg	TODOS
n	61	62	123
Edad media (años)	59 (35-78)	56,5 (35-83)	57 (35-83)
PS de ECOG 0/1/2-3	28/31/2	37/25/0	65/56/2
Enfermedad medible	53 (87 %)	59 (95 %)	112 (91 %)
Originalmente resistente a platino	33 (54 %)	33/61 (54 %)	66 (54 %)
Originalmente sensible a platino	28 (46 %)	28/61 (46 %)	56 (46 %)
Nº medio de regimenes de quimio	5,0(1-10)	4,5(0-13)	5,0 (0-13)
Duración media del cáncer de ovario (meses)	39,9 (3,3-146,7)	35,5 (10,5-443,7)	38,6 (3,3-443,7)

FIG. 9

SISTEMA ORGÁNICO	420 mg (n=61)	1050 mg (n=62)	TODOS (n=123)
- Cualquier acontecimiento adverso -	35 (57,4 %)	33 (53,2 %)	68 (55,3 %)
Gastrointestinal	27 (44,3 %)	16(25,8 %)	43 (35 %)
- Diarrea	-7(11,5 %)	-8(12,9 %)	-15(12,2 %)
- Obstrucción intestinal	-10(16,4 %)	-7(11,3 %)	-17(13,8 %)
Respiratorio	8(13,1 %)	9 (14,5 %)	17(13,8 %)
Fatiga, astenia	4 (6,6 %)	2 (3,2 %)	6 (4,9 %)
Deshidratación	4 (6,6 %)	2 (3,2 %)	6 (4,9 %)
Cardiaco	3 (4,9 %)	2 (3,2 %)	5(4,1 %)
Anorexia	2 (3,3 %)	2 (3,2 %)	4 (3,3 %)
Infecciones	3 (4,9 %)	0	3 (2,4 %)

FIG. 10

TÉRMINO PREFERIDO	420 mg (n=61)	1050 mg (n=62)	TODOS (n=123)
- Cualquier acontecimiento adverso -	26 (42,6 %)	18(29,0 %)	44 (35,8 %)
Gastrointestinal	15(24,6 %)	8(12,9 %)	23(18,7 %)
- Diarrea	-2 (3,3 %)	-0 (0,0 %)	-2(1,6 %)
- Obstrucción intestinal	-10(16,4 %)	-8(12,9 %)	-18 (14,6 %)
Respiratorio	4 (6,6 %)	3 (4,8 %)	7 (5,7 %)
Cardiaco	2 (3,3 %)	2 (3,2 %)	4 (3,3 %)
Renal y urinario	1 (1,6 %)	3 (4,8 %)	4 (3,3 %)
Deshidratación	1 (1,6 %)	2 (3,2 %)	3 (2,4 %)
Infecciones	3 (4,9 %)	0 (0,0 %)	3 (2,4 %)

FIG. 11

TÉRMINO PREFERIDO	420 mg (N=61)	1050 mg (n=62)	TODOS (n=123)
- Cualquier acontecimiento adverso -	4 (6,6 %)	2 (3,2 %)	6 (4,9 %)
Diarrea	1 (1,6 %)	0	1 (0,8 %)
Dolor abdominal	1 (1,6 %)	0	1 (0,8 %)
Disminución de LVEF	0	1 (1,6 %)	1 (0,8 %)
Fibrilación auricular	1 (1,6 %)	0	1 (0,8 %)
Efusión pericárdica	0	1 (1,6 %)	1 (0,8 %)
Neumonía	1 (1,6 %)	0	1 (0,8 %)

FIG. 12

ACONTECIMIENTO	420 mg (n=61)	1050 mg (n=62)	TODOS (n=123)
Diarrea (todos, grado 1-3)	35 (57,4 %)	40 (64,5 %)	75 (61 %)
- Grado 3	-7 (11,5 %)	-8 (12,9 %)	-15 (12,2 %)
Sarpullidos y trastornos cutáneos (todos, grado 1-2)	26 (42,6 %)	31 (50 %)	57 (46,3 %)
Bajada de LVEF \geq 10 % puntos (ninguna confirmada por lectura central hasta ahora)	10/49 (20,4 %)	13/50 (26,0 %)	23/99 (23 %)
Bajada de LVEF $<$ 50 % (ninguna confirmada por lectura central hasta ahora)	1/50 (2 %)	4/50 (8 %)	5/100 (5 %)

FIG. 13

TÉRMINO PREFERIDO	420 mg (n=61)	1050 mg (n=62)	TODOS (n=123)
- Cualquier acontecimiento adverso -	13 (21,3 %)	15 (24,2 %)	28 (22,8 %)
Disminución de la fracción de eyección ($>$ 10 % puntos desde la medida basal)	10 (16,4 %)	14 (22,6 %)	24 (19,5 %)
Disfunción ventricular	1 (1,6 %)	0	1 (0,8 %)
Fibrilación auricular	1 (1,6 %)	0	1 (0,8 %)
Endocarditis no infecciosa	1 (1,6 %)	0	1 (0,8 %)
Efusión pericárdica	0	1 (1,6 %)	1 (0,8 %)
Taponamiento cardiaco	0	1 (1,6 %)	1 (0,8 %)

FIG. 14

CRITERIO DE VALORACIÓN	420 mg	1050 mg	TOTAL
n	60	62	122
PR	2 (3,3 %)	3 (4,8 %)	5 (4,1 %)
SD	23 (38,3 %)	24 (38,7 %)	47 (38,5 %)
PD	27 (45,0 %)	29 (46,8 %)	56 (45,9 %)
Respuesta UTD	2 (3,3 %)	2 (3,2 %)	4 (3,3 %)
TTP medio (semanas)	7,0	6,6	6,6
Supervivencia media (semanas)	40,1	—	40,1

FIG. 15

RESPUESTA CA-125	420 mg	1050 mg	TODOS
Reducción >50 %	7 (1 PR, 4 SD, 2 PD)	5 (1 PR, 3 SD, 1 PD)	12 (2 PR, 7 SD, 3 PD)
Reducción >25 % pero <50 % en CA-125	3 (3SD)	5 (3 SD, 1 PD, 1 UE)	8 (6 SD, 1 PD, 1 UE)
Reducción <25 %	6 (1PR, 4SD, 1 PD)	10 (1 PR, 8 SD, 1 PD)	16 (2 PR, 12 SD, 2 PD)
Sin respuesta	37 (12 SD, 20 PD, 1 UE, 4 Ninguno)	36 (1PR, 10 SD, 24 PD, 1 Ninguno)	73 (1 PR, 22 SD, 44 PD, 1 UE, 5 Ninguno)
Total	53	56	109

FIG. 18

Pacientes tratados	61
Evaluable para la eficacia	54
	ELISA (>30 % tumores)
Datos de pHER2 (n=65 biopsias)	34
pHER2+	10
% pHER2+	29 %
Pacientes evaluables y datos de pHER2	31
pHER2+	8
% pHER2+	26 %

FIG. 19

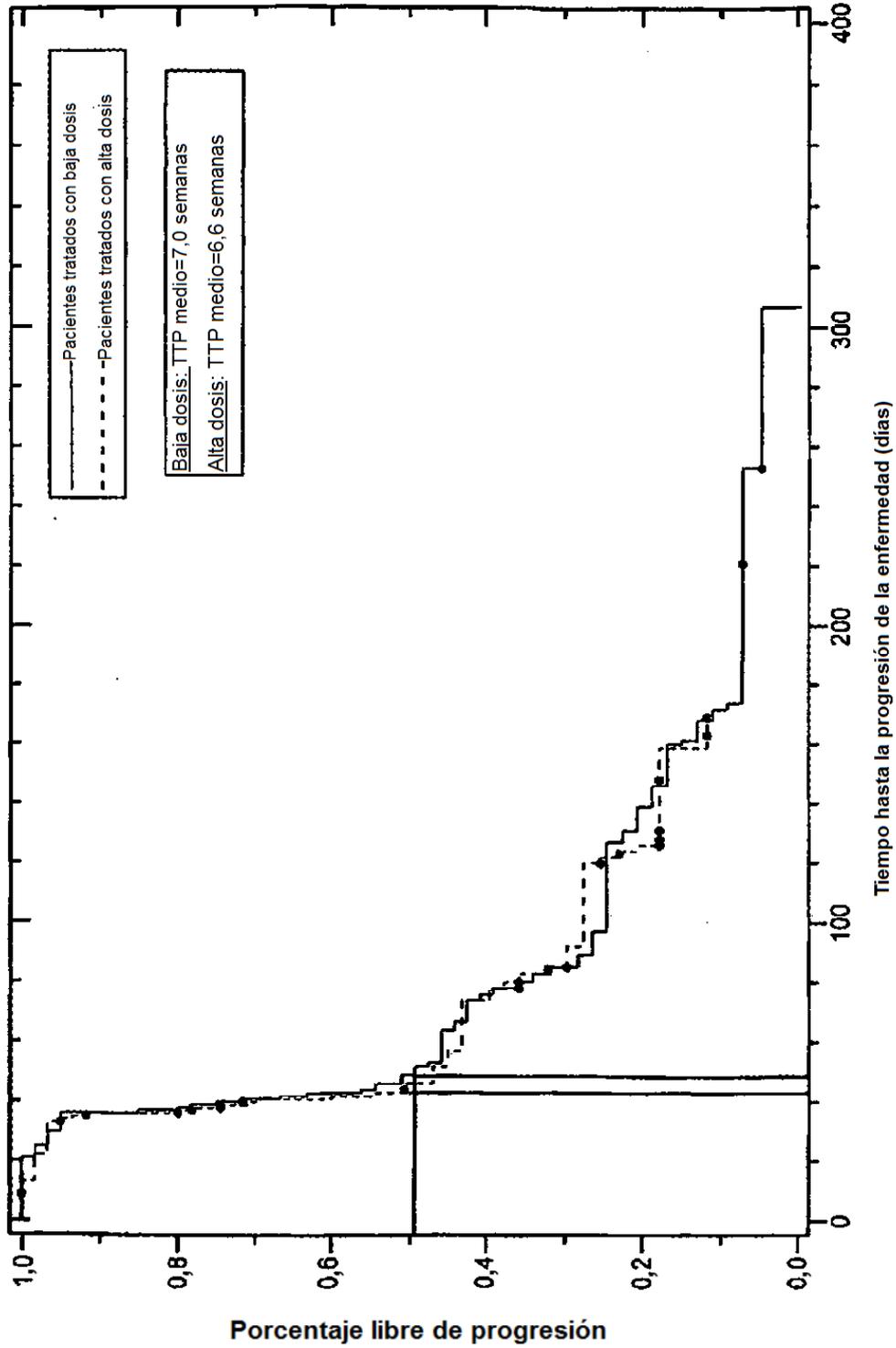


FIG. 16

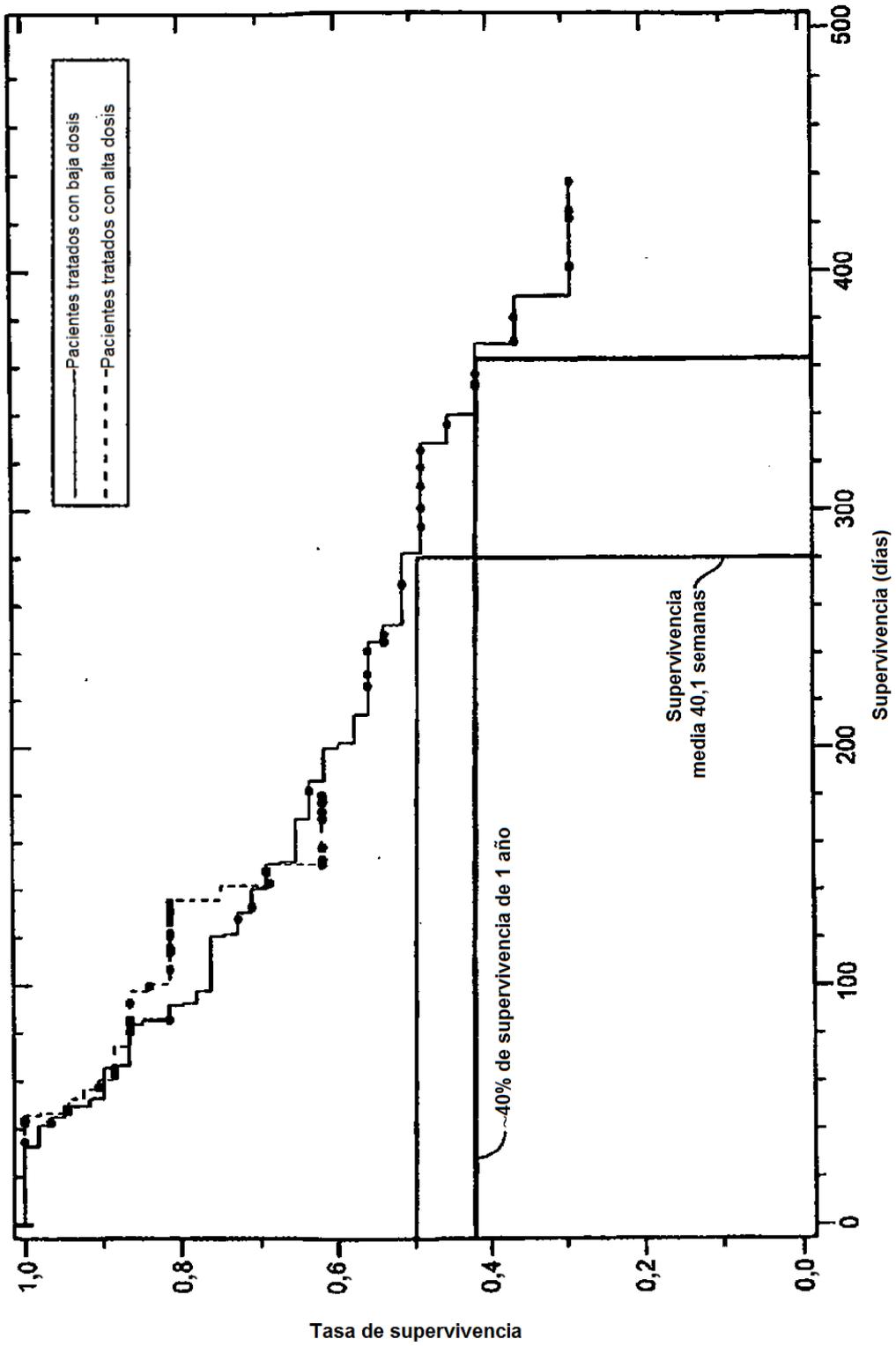


FIG. 17

	420 mg PHER2+	420 mg pHER2-	420 mg pHER2 ?
N	8	23	29
PR	1 (12,5 %)	0 (0,0 %)	1 (3,4 %)
SD	5 (62,5 %)	5(21,7 %)	13(44,8 %)
PD	2 (25,0 %)	13 (56,5 %)	12(41,4 %)
Respuesta UTD	0 (0,0 %)	2 (8,7 %)	0 (0,0 %)
TTP medio (semanas)	20,9	6,0	9,1
Supervivencia media (semanas)	—	35,9	48,4

FIG. 20

Mejor respuesta	reducción en BSLD	reducción en CA-125	semanas de tratamiento	ELISA de pHER2
PR	68 %	54 %	25	+
PR	78 %	22 %	23	NA
SD		33 %	36	NA
SD		57 %	20	NA
SD		15 %	19	-
SD		60 %	32	-
SD		Ninguno	21	+
SD		21 %	44+	NA
SD		None	23	NA
SD		62 %	24	+
SD		5 %	36	-
SD		56 %	18	NA
SD		Ninguno	25	NA
Mixta	30 %	Ninguno	13	NA

FIG. 21

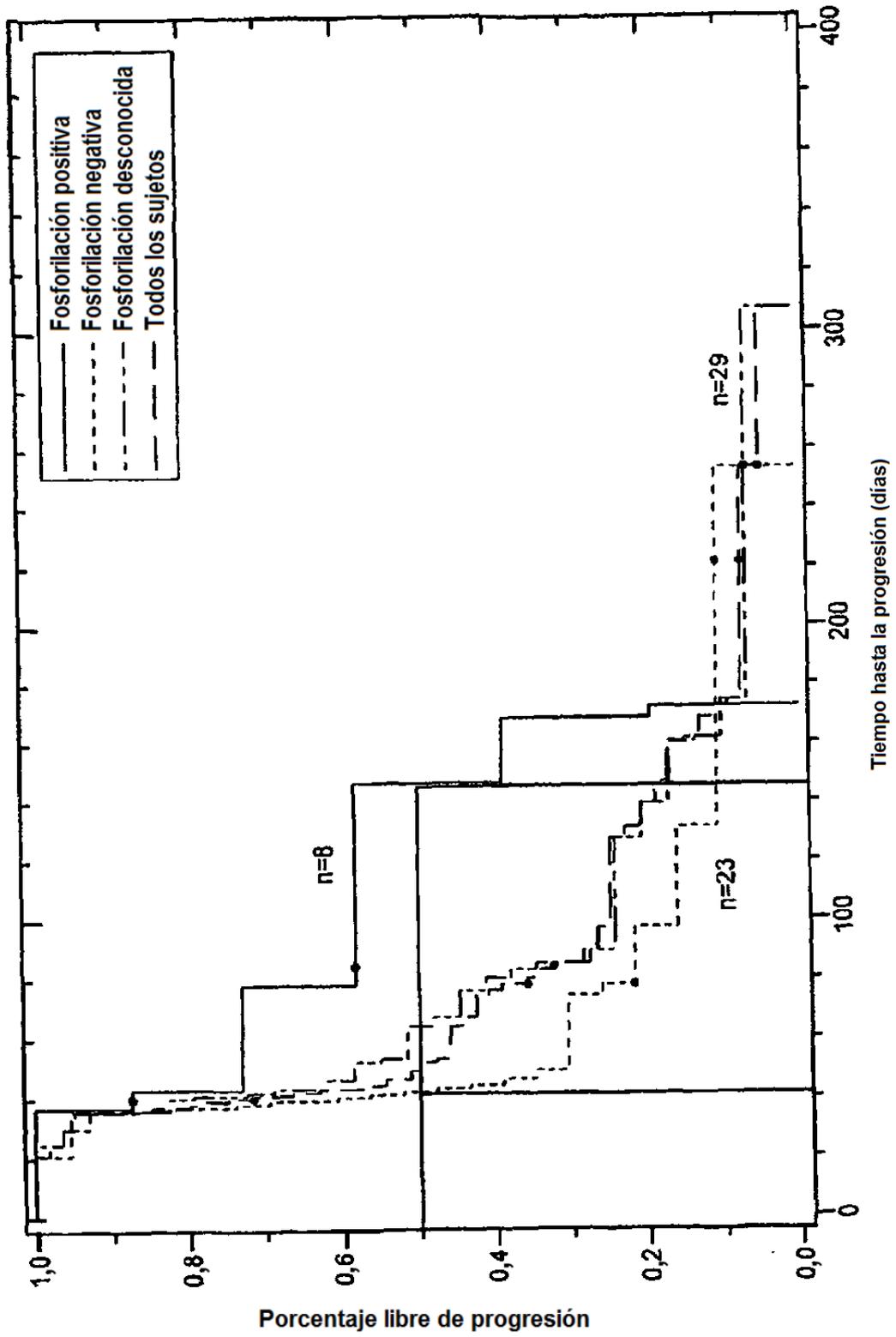


FIG. 22

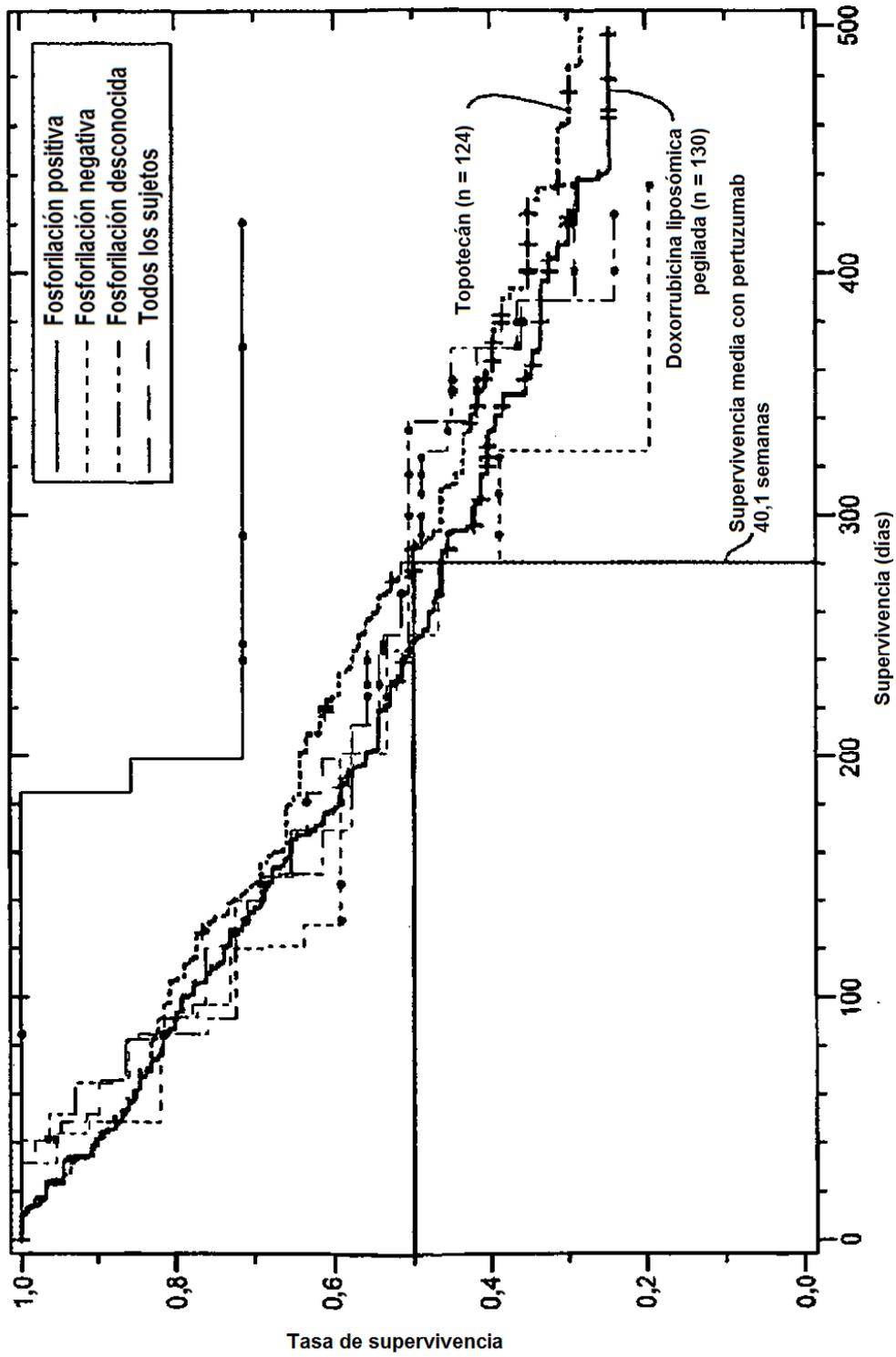


FIG. 23