

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 497**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2008 E 08731126 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2132573**

54 Título: **Predicción de la respuesta a un inhibidor de la dimerización de HER basado en la expresión de HER3 bajo**

30 Prioridad:

**02.03.2007 US 892640 P**

**16.04.2007 US 912053 P**

**19.02.2008 US 29748**

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

**17.07.2014**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (50.0%)**

**1 DNA Way**

**South San Francisco CA 94080-4990, US y**

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**AMLER, LUKAS C.;**

**BIRKNER, MERRILL;**

**LIN, CHIN-YU;**

**MOECKS, JOACHIM y**

**STRAUSS, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 477 497 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

Predicción de la respuesta a un inhibidor de la dimerización de HER basado en la expresión de HER3 bajo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de HER3 bajo como criterio de selección para tratar pacientes con cáncer, tal como pacientes con cáncer de ovario, con un inhibidor de HER, tal como pertuzumab.

10 Además, la invención se refiere al uso de HER3 alto como criterio de selección para tratar pacientes con cáncer con un agente quimioterapéutico, por ejemplo, gemcitabina.

**Antecedentes de la invención**15 **Receptores HER y anticuerpos contra ellos**

La familia HER de tirosina cinasas de receptores son importantes mediadores del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. La familia de receptores incluye cuatro miembros distintos que incluyen receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1 o HER1), HER2 (ErbB2 o p185<sup>neu</sup>), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2).

20 EGFR, codificado por el gen *erbB1*, se ha implicado causalmente en tumor maligno humano. En particular, la elevada expresión de EGFR se ha observado en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y de estómago, además de glioblastomas. La elevada expresión del receptor EGFR está frecuentemente asociada a elevada producción del ligando de EGFR, el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), por las mismas células tumorales que producen la activación del receptor por una ruta estimulante autocrina. Baselga y Mendelsohn Pharmac. Ther. 64:127-154 (1994). Se han evaluado anticuerpos monoclonales dirigidos contra EGFR o sus ligandos, TGF- $\alpha$  y EGF, como agentes terapéuticos en el tratamiento de tales tumores malignos. Véase, por ejemplo, Baselga y Mendelsohn, arriba; Masui y col., Cancer Research 44:1002-1007 (1984); y Wu y col., J. Clin. Invest. 95:1897-1905 (1995).

30 El segundo miembro de la familia de HER, p185<sup>neu</sup>, se identificó originalmente como el producto del gen transformante de neuroblastomas de ratas químicamente tratadas. 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 de ovario y se correlaciona con un mal pronóstico (Slamon y col., Science, 235:177-182 (1987); Slamon y col., Science, 244:707-712 (1989); y patente de EE.UU. n° 4.968.603). Hasta la fecha, no se ha informado de mutación puntual análoga a la de en el proto-oncogén *neu* para tumores humanos. La expresión en exceso de HER2 (frecuentemente, pero no uniformemente debida a la amplificación génica) también se ha observado en otros carcinomas que incluyen carcinomas del estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. Véanse, entre otros, King y col., Science, 229:974 (1985); Yokota y col., Lancet: 1:765-767 (1986); Fukushige y col., Mol Cell Biol., 6:955-958 (1986); Guerin y col., Oncogene Res., 3:21-31 (1988); Cohen y col., Oncogene, 4:81-88 (1989); Yonemura y col., Cancer Res., 51:1034 (1991); Borst y col., Gynecol. Oncol., 38:364 (1990); Weiner y col., Cancer Res., 50:421-425 (1990); Kern y col., Cancer Res., 50:5184 (1990); Park y col., Cancer Res., 49:6605 (1989); Zhau y col., Mol. Carcinog., 3:254-257 (1990); Aasland y col., Br. J. Cancer 57:358-363 (1988); Williams y col., Pathobiology 59:46-52 (1991); y McCann y col., Cancer, 65:88-92 (1990). HER2 puede expresarse en exceso en cáncer de próstata (Gu y col., Cancer Lett. 99:185-9 (1996); Ross y col., Hum. Pathol. 28:827-33 (1997); Ross y col., Cancer 79:2162-70 (1997); y Sadasivan y col., J. Urol. 150:126-31 (1993)).

50 Se han descrito anticuerpos dirigidos contra los productos de la proteína p 185<sup>neu</sup> de rata y HER2 humana.

Drebin y colaboradores han producido anticuerpos contra el producto génico *neu* de rata, p185<sup>neu</sup>. Véase, por ejemplo, Drebin y col., Cell 41:695-706 (1985); Myers y col., Meth. Enzym. 198:277-290 (1991); y el documento WO94/22478. Drebin y col., Oncogene 2:273-277 (1988) informan que las mezclas de anticuerpos reactivas con dos regiones distintas de p185<sup>neu</sup> producen efectos antitumorales sinérgicos sobre células NIH-3T3 transformadas con *neu* implantadas en ratones sin pelo. Véase también la patente de EE.UU. 5.824.311 concedida el 20 de octubre de 1998.

60 Hudziak y col., Mol. Cell. Biol. 9(3):1165-1172 (1989) describen la generación de un panel de anticuerpos para 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 tras la exposición a los anticuerpos se determinó por tinción con cristal violeta de las monocapas después de 72 horas. Usando este ensayo, la máxima inhibición se obtuvo con el anticuerpo llamado 4D5 que inhibió la proliferación celular el 56 %. Otros anticuerpos en el panel redujeron la proliferación celular a un menor grado en este ensayo. Se encontró adicionalmente que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba líneas celulares de tumor de mama que expresan en exceso HER2 a los efectos citotóxicos de TNF- $\alpha$ . Véase también la patente de EE.UU. n° 5.677.171 concedida el 14 de octubre de 1997. Los anticuerpos para HER2 tratados en Hudziak y col., se caracterizan adicionalmente en Fendly y col., Cancer Research 50:1550-1558 (1990); Kotts y col., In Vitro 26(3):59A

(1990); Sarup y col., *Growth Regulation* 1:72-82 (1991); Shepard y col., *J. Clin. Immunol.* 11 (3):117-127 (1991); Kumar y col., *Mol. Cell. Biol.* 11 (2):979-986 (1991); Lewis y col., *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras y col., *Oncogene* 9:1829-1838 (1994); Vitetta y col., *Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski y col., *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994); Scott y col., *J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991); D'souza y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994); Lewis y col., *Cancer Research* 56:1457-1465 (1996); y Schaefer y col., *Oncogene* 15:1385-1394 (1997).

Una versión humanizada recombinante del anticuerpo para HER2 murino 4D5 (huMAB4D5-8, rhuMAB HER2, trastuzumab o HERCEPTIN®; patente de EE.UU. n° 5.821.337) es clínicamente activa en pacientes con cánceres de mama metastásicos que expresan en exceso HER2 que han recibido una amplia terapia contra el cáncer previa (Baselga y col., *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996)). Trastuzumab recibió la autorización de comercialización de la Agencia Estadounidense del Medicamento el 25 de septiembre de 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores expresan en exceso la proteína HER2.

Otros anticuerpos para HER2 con diversas propiedades se han descrito en Tagliabue y col., *Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991); McKenzie y col., *Oncogene* 4:543-548 (1989); Maier y col., *Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991); Bacus y col., *Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990); Stancovski y col., *PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991); Bacus y col., *Cancer Research* 52:2580-2589 (1992); Xu y col., *Int. J. Cancer* 53:401-408 (1993); documento WO94/00136; Kasprzyk y col., *Cancer Research* 52:2771-2776 (1992); Hancock y col., *Cancer Res.* 51:4575-4580 (1991); Shawver y col., *Cancer Res.* 54:1367-1373 (1994); Arteaga y col., *Cancer Res.* 54:3758-3765 (1994); Harwerth y col., *J. Biol. Chem.* 267:15160-15167 (1992); patente de EE.UU. n° 5.783.186; y Klapper y col., *Oncogene* 14:2099-2109 (1997).

El cribado de homología ha producido la identificación de otros dos miembros de la familia de receptores HER; HER3 (patentes de EE.UU. n° 5.183.884 y 5.480.968, además de Kraus y col., *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)) y HER4 (solicitud de patente EP n° 599.274; Plowman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); y Plowman y col., *Nature*, 366:473-475 (1993)). Ambos de estos receptores muestran elevada expresión en al menos algunas líneas de células de cáncer de mama.

Los receptores HER se encuentran generalmente en diversas combinaciones en células y se cree que la heterodimerización aumenta la diversidad de respuestas celulares a varios ligandos de HER (Earp y col., *Breast Cancer Research and Treatment* 35: 115-132 (1995)). EGFR está unido por seis ligandos diferentes; factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), anfiregulina, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), betacelulina y epiregulina (Groenen y col., *Growth Factors* 11:235-257 (1994)). Una familia de proteínas heregulinas resultantes del corte y empalme alternativo de un único gen son ligandos para HER3 y HER4. La familia de heregulina incluye heregulinas alfa, beta y gamma (Holmes y col., *Science*, 256:1205-1210 (1992); patente de EE.UU. n° 5.641.869; y Schaefer y col., *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)); factores de diferenciación de neu (NDF), factores de crecimiento de la glía (GGF); actividad inductora de receptores de acetilcolina (ARIA); y factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF). Para una revisión, véase Groenen y col., *Growth Factors* 11:235-257 (1994); Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247-262 (1996) y Lee y col., *Pharm. Rev.* 47:51-85 (1995). Recientemente se identificaron tres ligandos de HER adicionales; neuregulina-2 (NRG-2) que se informa que se une tanto a HER3 como a HER4 (Chang y col., *Nature* 387 509-512 (1997); y Carraway y col., *Nature* 387:512-516 (1997)); neuregulina-3 que se une a HER4 (Zhang y col., *PNAS (USA)* 94(18):9562-7 (1997)); y neuregulina-4 que se une a HER4 (Harari y col., *Oncogene* 18:2681-89 (1999)). HB-EGF, betacelulina y epiregulina también se unen a HER4.

Aunque EGF y TGF $\alpha$  no se unen a HER2, EGF estimula EGFR y HER2 para formar un heterodímero, que activa EGFR y produce la transfosforilación de HER2 en el heterodímero. Parece que la dimerización y/o transfosforilación activan la tirosina cinasa de HER2. Véase Earp y col., arriba. Asimismo, cuando HER3 se co-expresa con HER2, se forma un complejo de señalización activo y los anticuerpos dirigidos contra HER2 pueden afectar este complejo (Sliwkowski y col., *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)). Adicionalmente, la afinidad de HER3 por heregulina (HRG) aumenta a un mayor estado de afinidad cuando se co-expresa con HER2. Véase, por tanto, Levi y col., *Journal of Neuroscience* 15: 1329-1340 (1995); Morrissey y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1431-1435 (1995); y Lewis y col., *Cancer Res.*, 56:1457-1465 (1996) con respecto al complejo de proteínas HER2-HER3. HER4, al igual que HER3, forma un complejo de señalización activo con HER2 (Carraway y Cantley, *Cell* 78:5-8 (1994)).

Publicaciones de patente relacionadas con anticuerpos para 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, US 6.632.979B1, 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, US 2002/0192652A1, 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.

### Diagnósticos

20 Los pacientes tratados con el anticuerpo para HER2 trastuzumab se seleccionan para terapia basándose en la expresión en exceso/amplificación de HER2. Véanse, por ejemplo, los documentos WO99/31140 (Paton y col.), US2003/0170234A1 (Hellmann, S.) y US2003/0147884 (Paton y col.); además de WO01/89566, US2002/0064785 y US2003/0134344 (Mass y col.). Véase, por tanto, el documento US2003/0152987, Cohen y col., referente a inmunohistoquímica (IHC) e hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) para detectar la expresión en exceso y  
25 amplificación de HER2.

Los documentos WO2004/053497 y US2004/024815A1 (Bacus y col.), además de US 2003/0190689 (Crosby y Smith), se refieren a determinar o predecir la respuesta a terapia con trastuzumab. El documento US2004/013297A1 (Bacus y col.) se refiere a determinar o predecir la respuesta a la terapia con el anticuerpo para EGFR ABX0303. El  
30 documento 2004/000094 (Bacus y col.) se refiere a determinar la respuesta a GW572016, un inhibidor de tirosina cinasas EGFR-HER2 de molécula pequeña. El documento 2004/063709, Amler y col., se refiere a biomarcadores y procedimientos para determinar la sensibilidad al inhibidor de EGFR, HCl de erlotinib. El documento US2004/0209290, Cobleigh y col., se refiere a marcadores de expresión génica para pronóstico de cáncer de mama.

35 Los pacientes tratados con pertuzumab pueden seleccionarse para terapia basándose en la activación o dimerización de HER. Las publicaciones de patente referentes a pertuzumab y la selección de pacientes para terapia con el mismo incluyen: WO01/00245 (Adams y col.); US2003/0086924 (Sliwkowski, M.); US2004/0013667A1 (Sliwkowski, M.); además de WO2004/008099A2 y US2004/0106161 (Bossenmaier y col.).

40 Cronin y col., Am. J. Path. 164(1): 35-42 (2004), describen la medición de la expresión génica en tejidos incorporados en parafina de archivo. Ma y col., Cancer Cell 5:607-616 (2004), describe la pauta génica por micromatrices de oligonucleótidos de genes usando ARN aislado de secciones de tejido de tumor tomadas de biopsias primarias archivadas.

45 Pertuzumab (también conocido como el anticuerpo monoclonal humano recombinante 2C4; OMNITARG™, Genentech, Inc, South San Francisco) representa el primero en una nueva clase de agentes conocidos como inhibidores de la dimerización de HER (HDI) y sirve para inhibir la capacidad de HER2 para formar heterodímeros activos con otros receptores 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  
50 Sliwkowski Nat Rev Mol Cell Biol, 2:127-37 (2001); Sliwkowski Nat Struct Biol 10:158-9 (2003); Cho y col., Nature 421:756-60 (2003); y Malik y col., Pro Am Soc Cancer Res 44:176-7 (2003).

Se ha demostrado que el bloqueo por pertuzumab de la formación de heterodímeros de HER2-HER3 en células tumorales inhibe la señalización de células críticas, que produce proliferación y supervivencia tumoral reducida  
55 (Agus y col., Cancer Cell 2:127-37 (2002)).

Pertuzumab se ha sometido a pruebas como agente individual en la clínica con un ensayo de fase I en pacientes con cánceres avanzados y ensayos de fase II en pacientes con cáncer de ovario y cáncer de mama, además de  
60 cáncer de pulmón y de próstata. En un estudio de fase I, los pacientes con tumores sólidos incurables, localmente avanzados, recurrentes o metastásicos que habían progresado durante o después de la terapia convencional, se trataron con pertuzumab administrado intravenosamente cada 3 semanas. Pertuzumab fue generalmente bien tolerado. La regresión tumoral se logró en 3 de los 20 pacientes evaluables para respuesta. Dos pacientes tuvieron respuestas parciales confirmadas. La enfermedad estable que duró más de 2,5 meses se observó en 6 de los 21 pacientes (Agus y col., Pro Am Soc Clin Oncol 22:192 (2003)). A la dosis de 2,0-15 mg/kg, la farmacocinética de  
65 pertuzumab fue lineal, y la eliminación media osciló de 2,69 a 3,74 ml/día/kg y la semivida de eliminación terminal media osciló de 15,3 a 27,6 días. No se detectaron anticuerpos para pertuzumab (Allison y col., Pro Am Soc Clin

Oncol 22:197 (2003)).

5 Sergina y col. informan que el marcador biológico marcador con el que evaluar la eficacia de inhibidores de tirosina cinasa de HER (TKI) debe ser la transfosforilación de HER3 en vez de la autofosforilación. Sergina y col., Nature 445(7126): 437-441 (2007).

Jazaeri y col. evaluaron perfiles de expresión génica asociados a respuesta a quimioterapia en cáncer de ovarios epitelial. Jazaeri y col., Clin. Cancer Res. 11(17): 6300-6310 (2005).

10 Tanner y col. informan que HER3 predice la supervivencia en cáncer de ovario. Tanner y col., J. Clin. Oncol. 24(26):4317-4323 (2006).

### Resumen de la invención

15 La presente solicitud se refiere, al menos en parte, a la sorprendente observación de que pacientes con cáncer (por ejemplo, pacientes con cáncer de ovario) cuyo cáncer expresa HER3 a un bajo nivel responden mejor en ensayos clínicos humanos a un inhibidor de la dimerización de HER que aquellos pacientes cuyo cáncer expresa HER3 a un alto nivel. Generalmente, tales pacientes tienen un cociente de HER2:HER3 alto (debido al bajo nivel de HER3), de manera que la evaluación de los niveles reactivos de tanto HER2 como HER3 proporciona un medio adicional para  
20 seleccionar pacientes para terapia con un inhibidor de la dimerización de HER.

La invención se define en las reivindicaciones.

25 El ensayo preferido para medir la expresión de HER3 comprende la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo más preferentemente la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR).

El inhibidor de la dimerización de HER2 es un anticuerpo, lo más preferentemente un anticuerpo para HER2 tal como pertuzumab.

30 Preferentemente, el tipo de cáncer que va a tratarse o diagnosticarse en el presente documento está seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de mama metastásico (CMM), cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), cáncer de próstata y cáncer colorrectal. Lo más preferentemente, el tipo de cáncer tratado o diagnosticado en el presente documento es cáncer de ovario, cáncer peritoneal o cáncer de las trompas de Falopio. El tipo de cáncer puede ser resistente a quimioterapia,  
35 resistente a platino, avanzado, resistente al tratamiento y/o recurrente. El procedimiento puede prolongar la supervivencia, que incluye supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) en el paciente.

40 El inhibidor de HER puede administrarse como un agente antitumoral individual, o puede combinarse con una o varias de otras terapias. En una realización, el inhibidor de la dimerización de HER2 se administra con uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como gemcitabina, carboplatino, paclitaxel, docetaxel, topotecan y doxorubicina liposómica, y preferentemente un antimetabolito, tal como gemcitabina. El inhibidor de la dimerización de HER2 también puede combinarse con trastuzumab, erlotinib o bevacizumab.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de un paciente con cáncer de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de pertuzumab al paciente, en el que el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel inferior al percentil 25 para la expresión de HER3 en cáncer de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio.

50 La invención en el presente documento se refiere adicionalmente a un procedimiento de selección de una terapia para un paciente con un tipo de cáncer que puede responder a un inhibidor de la dimerización de HER que comprende determinar la expresión de HER3 en una muestra de cáncer del paciente y seleccionar un inhibidor de la dimerización de HER2 como terapia si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel inferior al percentil 25 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

55 También se describe un artículo de fabricación que comprende, envasados juntos, una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la dimerización de HER2 en un vehículo farmacéuticamente aceptable y una etiqueta que establece que el inhibidor o composición farmacéutica se indica para tratar un paciente con un tipo de cáncer que puede responder a un inhibidor de la dimerización de HER, en el que el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel inferior al percentil 25 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

60 También se describe un procedimiento de fabricación de un inhibidor de la dimerización de HER o una composición farmacéutica del mismo que comprende combinar en un envase el inhibidor o composición farmacéutica y una etiqueta que establece que el inhibidor o composición farmacéutica se indica para tratar un paciente con un tipo de cáncer que puede responder a un inhibidor de la dimerización de HER2, en el que el cáncer del paciente expresa  
65 HER3 a un nivel inferior al percentil 25 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

Aparte de las invenciones anteriores, los datos clínicos humanos proporcionado en el presente documento demostraron que los pacientes con cáncer (por ejemplo, pacientes con cáncer de ovario) cuyo cáncer expresa HER3 a un alto nivel tienen una mejor respuesta clínica a un agente quimioterapéutico, tal como gemcitabina, que aquellos pacientes cuyo cáncer expresa HER3 a un bajo nivel.

5 En cuanto a este aspecto adicional de la invención, la invención proporciona un procedimiento de selección de una terapia para un paciente con un tipo de cáncer que es probable que responda a un agente quimioterapéutico que comprende determinar la expresión de HER3 en una muestra de cáncer del paciente y selección de un agente quimioterapéutico como terapia si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel superior al percentil 25 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer. Preferentemente, el tipo de cáncer es cáncer de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio, que incluye cáncer de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio resistente a platino, además de cáncer de ovario avanzado, resistente al tratamiento o recurrente. Preferentemente, el agente quimioterapéutico seleccionado es un antimetabolito, tal como gemcitabina.

15 La invención también se refiere a tratar un paciente con un tipo de cáncer que puede responder a un agente quimioterapéutico, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico al paciente, en el que el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel superior al percentil 75 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer. El ensayo preferido para medir la expresión de HER3 comprende reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo más preferentemente reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR).

20 Preferentemente, el agente quimioterapéutico es un antimetabolito, lo más preferentemente gemcitabina.

25 Preferentemente, el tipo de cáncer que va a tratarse o diagnosticarse según este aspecto adicional de la invención es cáncer de ovario, cáncer peritoneal o cáncer de las trompas de Falopio. El tipo de cáncer puede ser resistente a quimioterapia, resistente a platino, avanzado, resistente al tratamiento y/o recurrente. El procedimiento puede prolongar la supervivencia, que incluye supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) en el paciente.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a tratar un paciente con cáncer de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de gemcitabina al paciente, en el que el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel superior al percentil 75 para la expresión de HER3 en cáncer de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio.

35 También se describe un artículo de fabricación que comprende, envasados juntos, una composición farmacéutica que comprende un agente quimioterapéutico (tal como gemcitabina) en un vehículo farmacéuticamente aceptable y una etiqueta que establece que el agente quimioterapéutico o composición farmacéutica se indica para tratar un paciente con un tipo de cáncer, en el que el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel superior al percentil 75 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

40 También se describe un procedimiento de fabricación de un agente quimioterapéutico (tal como gemcitabina) o una composición farmacéutica del mismo que comprende combinar en un envase el agente quimioterapéutico o composición farmacéutica y una etiqueta que establece que el agente quimioterapéutico o composición farmacéutica se indica para tratar un paciente con un tipo de cáncer, en el que el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel superior al percentil 25 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

### Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 proporciona un esquema de la estructura de la proteína 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 alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los dominios ligeros variables ( $V_L$ ) (Fig. 2A) y pesados variables ( $V_H$ ) (Fig. 2B) del anticuerpo monoclonal murino 2C4 (SEC ID N° 1 y 2, respectivamente); dominios  $V_L$  y  $V_H$  de la variante 574/pertuzumab (SEC ID N° 3 y 4, respectivamente) y regiones estructurales consenso de  $V_L$  y  $V_H$  humanas (κI hum, subgrupo I de kappa ligera; III hum, subgrupo III pesado) (SEC ID N° 5 y 6, respectivamente). Los asteriscos identifican diferencias entre dominios variables de pertuzumab y anticuerpo monoclonal murino 2C4 o entre dominios variables de pertuzumab y la región estructural humana. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están entre corchetes.

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

La Figura 4 representa, esquemáticamente, la unión de 2C4 al sitio de unión heterodimérico de HER2, previniendo así la heterodimerización con EGFR o HER3 activados.

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

65 La Figura 6 compara diversas actividades de trastuzumab y pertuzumab.

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

cadena pesada (Fig. 7B; SEC ID N° 16) de trastuzumab, respectivamente.

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

5 La Fig. 9 representa el diseño del estudio/esquema para el ensayo clínico en el Ejemplo 1 que implica pacientes con carcinoma de ovario, peritoneal primario o de las trompas de Falopio resistente a platino tratado con tanto gemcitabina y placebo como gemcitabina y pertuzumab.

La Fig. 10A representa la supervivencia libre de progresión (SLP) para todos los pacientes del estudio en el Ejemplo 1.

10 La Fig. 10B es una versión actualizada de la Fig. 10A. SLP se ha estimado usando el modelo de Cox estratificado y la prueba del orden logarítmico estratificada por factores de estratificación por aleatorización (ECOG PS, número de tratamientos previos para enfermedad resistente a platino y capacidad de medición de la enfermedad).

La Fig. 11A representa la SLP por estado de pHER2 predicho.

15 La Fig. 11B es una versión actualizada de la Fig. 11A.

La Fig. 12A representa la SLP por cortes de EGFR por qRT-PCR (HER1).

La Fig. 12B es otra representación de SLP por cortes de EGFR por wRT-PCR (HER1), que también indica el número de sujetos en los grupos de HER1 (alto) y HER1 (bajo) a diversos valores de corte de EGFR.

La Fig. 13A representa la SLP por cortes de HER2 por qRT-PCR.

20 La Fig. 13B es otra representación de la SLP por cortes de HER2 por qRT-PCR, que también indica el número de sujetos en los grupos de HER1 (alto) y HER1 (bajo) a diversos valores de corte de HER2.

La Fig. 14A representa la SLP por cortes de HER3 por qRT-PCR.

La Fig. 14B es otra representación de SLP por cortes de HER3 por qRT-PCR, que también indica el número de sujetos en los grupos de HER3 (alto) y HER3 (bajo) a diversos valores de corte de HER3.

25 La Fig. 15A muestra la SLP por subgrupos de HER3. La actividad de pertuzumab es la mayor en pacientes con tumores que expresan HER3 bajo y tiende a aumentar a medida que disminuye el nivel de expresión génica de HER3.

La Fig. 15B es otra representación de la SLP por niveles de HER3 por qRT-PCR.

30 La Fig. 16A demuestra la SLP por subgrupos de HER3. Los datos muestran que puede haber una interacción negativa entre pertuzumab y gemcitabina en pacientes con tumores que expresan HER3 alto.

La Fig. 16B es otra representación de la SLP por niveles de HER3 por qRT-PCR. Los datos confirman adicionalmente que puede haber una interacción negativa entre pertuzumab y gemcitabina en pacientes con tumores que expresan HER3 alto.

35 La Fig. 17A resume la SLP por subgrupos de HER3; subgrupo de expresión de HER3 alto y subgrupo de expresión de HER3 bajo.

La Fig. 17B es una versión actualizada de la SLP por niveles de HER3 por qRT-PCR mostrados en la Fig. 17B.

La Fig. 18A demuestra adicionalmente la SLP por subgrupos de HER3.

La Fig. 18B es una versión actualizada del análisis de SLP por cuartiles de expresión de HER3, mostrado en la Fig. 18A.

40 La Fig. 19A muestra la SLP por qRT-PCR de HER3 con una partición 50/50; con expresión de HER3 bajo en el percentil inferior a 50 y expresión de HER3 alto en el percentil superior o igual a 50.

La Fig. 19B es una versión actualizada de la SLP por qRT-PCR de HER3 con una partición 50/50, mostrada en la Fig. 19A.

45 La Fig. 20A muestra la SLP por qRT-PCR de HER3 con una partición 25/75; con la expresión de HER3 bajo en el percentil inferior a 25 y expresión de HER3 alto en el percentil superior o igual a 25.

La Fig. 20B es una versión actualizada de la SLP por qRT-PCR de HER3 con una partición 25/75, mostrada en la Fig. 20A.

La Fig. 21A muestra datos preliminares para supervivencia global (SG) en todos los pacientes. Datos basados en 46/130 eventos.

50 La Fig. 21B es un diagrama actualizado de datos de SG, modelo de Cox estratificado estimado y prueba del orden logarítmico estratificada por factores de estratificación por aleatorización (ECOG PS, número de tratamientos previos para enfermedad resistente a platino y capacidad de medición de la enfermedad).

La Fig. 22A ilustra datos preliminares para SG por HER3 en qRT-PCR. Datos basado en 43/119 eventos.

55 La Fig. 22B es un diagrama actualizado de datos de SG por HER3 en qRT-PCR con una partición 50/50, con expresión de HER3 bajo en el percentil inferior a 50 y expresión de HER3 alto en el percentil superior o igual a 25.

La Fig. 23A demuestra la SLP por qRT-PCR de HER3 comparando cocientes de riesgos instantáneos (HR) altos frente a bajos.

60 La Fig. 23B es un diagrama actualizado de SLP por qRT-PCR de HER3 que compara cocientes de riesgos instantáneos (HR) altos frente a bajos.

La Fig. 24A muestra el conjunto completo de datos para pertuzumab en cáncer de ovario resistente a platino en el Ejemplo 1, con SLP por HER3 por qRT-PCR. Nota: HR y los valores de p del orden logarítmico no se ajustaron para comparación múltiple.

65 La Fig. 24B es otro conjunto de datos para pertuzumab en cáncer de ovario resistente a platino, con SLP por qRT-PCR de HER3. Precisamente como en la Fig. 24A, HR y los valores de p del orden logarítmico no se ajustaron para comparación múltiple.

La Fig. 25 muestra la SLP y SG por qRT-PCR de HER3 para pacientes tratados como en el Ejemplo 2 con el agente individual pertuzumab. HER3 alto fueron pacientes en el percentil superior e igual a 75; pacientes en HER3 bajo fueron aquellos en el percentil inferiores a 75. La mediana de la supervivencia para pacientes que expresan bajo fue 3,31 años (IC del 95 %, 1,93-4,69); la mediana de la supervivencia fue 1,80 años para

pacientes que expresan HER3 alto (IC del 95 %, 0,83 a 2,78).

La Fig. 26A muestra la relación normalizada calibrada de HER3; el intervalo de expresión es aproximadamente 20-80 veces. CP están entre aproximadamente 23 y 30 para la mayoría de las muestras.

La Fig. 26B es otra figura que muestra la relación normalizada calibrada de HER3; el intervalo de expresión es aproximadamente 20-80 veces. CP están entre aproximadamente 23 y 30 para la mayoría de las muestras.

La Fig. 27 muestra el flujo de trabajo del ensayo de diagnóstico *in vitro* (IVD) por qRT-PCR de pertuzumab con LIGHTCYCLER® 2.0.

La Fig. 28 muestra el flujo de trabajo del ensayo IVD de pertuzumab y el análisis con un marcador y referencia.

La Fig. 29A proporciona SLP por percentiles de HER2:HER3 para pacientes tratados en el Ejemplo 1.

La Fig. 29B es otra figura que muestran la SLP por percentiles de HER2:HER3 para pacientes tratados en el

Ejemplo 1. Nota: Los HR y los valores de p del orden logarítmico no se ajustaron para comparación múltiple.

La Fig. 30A evalúa la SLP por cociente de HER2:HER3 para el Ejemplo 1 usando representaciones de Kaplan-Meier específicamente para pacientes con cocientes de HER2 con respecto a HER3 superiores a la mediana, o superiores al percentil 75.

La Fig. 30B es una actualización que muestra la SLP por el cociente de HER2:HER3 para el Ejemplo 1 usando representaciones de Kaplan-Meier específicamente para pacientes con relaciones de HER2 con respecto a HER3 superiores a la mediana, o superiores al percentil 75.

La Fig. 31A evalúa la SLP por subgrupos de cuartiles del cociente de HER2:HER3, de nuevo del Ejemplo 1.

La Fig. 31B es otro resumen del análisis de SLP por cuartiles de HER2/HER3 de cáncer de ovario recurrente.

La Fig. 32 muestra representaciones de Kaplan-Meier para la SLP para sujetos con cáncer de ovario que tienen niveles de HER3 inferiores a la mediana e iguales o superiores a la mediana, respectivamente, tratados como se describe en el Ejemplo 3.

La Fig. 33 muestra una representación de Kaplan-Meier de la SLP para sujetos con cáncer de ovario, tratados con quimioterapia o pertuzumab, en el grupo de pacientes con niveles de HER3 inferiores a la mediana e iguales o superiores a la mediana, respectivamente.

La Figura 34 muestra las representaciones de Kaplan-Meier de SLP para sujetos con cáncer de ovario, tratados con pertuzumab y quimioterapia o con pertuzumab solo, para cocientes de HER2/HER3 por debajo de la mediana e iguales o superiores a la mediana, respectivamente.

La Figura 35 muestra una representación de Kaplan-Meier de la SLP para sujetos con cáncer de ovario, tratados con quimioterapia o pertuzumab, para cocientes de HER2/HER3 por debajo de la mediana e iguales o superiores a la mediana, respectivamente.

## Descripción detallada de las realizaciones preferidas

### I. Definiciones

Un “receptor HER” es una proteína tirosina cinasa de receptor que pertenece a la familia de receptores HER e incluye receptores EGFR, HER2, HER3 y HER4. El receptor HER comprenderá generalmente un dominio extracelular, que puede unirse a un ligando de HER y/o dimerizarse con otra molécula de receptor HER; un dominio transmembrana lipófilo; un dominio de tirosina cinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización del extremo carboxilo que aloja varios residuos de tirosina que pueden estar fosforilados. El receptor HER puede ser un receptor HER de “secuencia nativa” o una “variante de la secuencia de aminoácidos” del mismo. Preferentemente, el receptor HER es el receptor HER humano de la secuencia nativa.

Los términos “ErbB1”, “HER1”, “receptor del factor de crecimiento epidérmico” y “EGFR” se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a EGFR como se desvela, por ejemplo, en Carpenter y col., Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987), que incluye formas mutantes que se producen naturalmente del mismo (por ejemplo, un EGFR mutante de delección como en Humphrey y col., PNAS (USA) 87:4207-4211 (1990)). *erbB1* se refiere al gen que codifica el producto de la proteína EGFR.

Las expresiones “ErbB2” y “HER2” se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a la proteína HER2 humana descrita, por ejemplo, en Semba y col., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985) y Yamamoto y col., Nature 319:230-234 (1986) (número de acceso de Genbank X03363). El término “*erbB2*” se refiere al gen que codifica ErbB2 humano y “*neu*” se refiere al gen que codifica p185<sup>neu</sup> de rata. HER2 preferido es HER2 humano de la secuencia nativa.

En el presente documento, “dominio extracelular de HER2” o “CD de HER2” se refiere a un dominio de HER2 que está fuera de una célula, tanto anclado a una membrana celular como en circulación, que incluye fragmentos del mismo. En una realización, el dominio extracelular de HER2 puede comprender cuatro dominios: “dominio I” (residuos de aminoácidos de aproximadamente 1-195; SEC ID N°: 19), “dominio II” (residuos de aminoácidos de aproximadamente 196-319; SEC ID N°: 20), “dominio III” (residuos de aminoácidos de aproximadamente 320-488; SEC ID N°: 21) y “dominio IV” (residuos de aminoácidos de aproximadamente 489-630; SEC ID N°: 22) (numeración

de residuos sin péptido señal). Véanse Garrett y col., Mol. Cell. 11: 495-505 (2003), Cho y col., Nature 421: 756-760 (2003), Franklin y col., Cancer Cell 5:317-328 (2004) y Plowman y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1746-1750 (1993), además de la Fig. 1 en el presente documento.

5 “ErbB3” y “HER3” se refieren al polipéptido receptor como se desvela, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.183.884 y 5.480.968 además de Kraus y col., PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989).

Los términos “ErbB4” y “HER4” en el presente documento se refieren al polipéptido receptor como se desvela, por ejemplo, en la solicitud de patente EP n° 599.274; Plowman y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750 (1993); y Plowman y col., Nature, 366:473-475 (1993), que incluyen 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 indica un polipéptido que se une a y/o activa un receptor HER. El ligando de HER de particular interés en el presente documento es un ligando de HER humano de la secuencia nativa tal como factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Savage y col., J. Biol. Chem. 247:7612-7621 (1972)); factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) (Marquardt y col., Science 223:1079-1082 (1984)); anfiregulina, también conocida como factor de crecimiento de schwannoma o autocrino de queratinocitos (Shoyab y col., Science 243:1074-1076 (1989); Kimura y col., Nature 348:257-260 (1990); y Cook y col., Mol. Cell. Biol. 11:2547-2557 (1991)); betacelulina (Shing y col., Science 259:1604-1607 (1993); y Sasada y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173 (1993)); factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) (Higashiyama y col., Science 251:936-939 (1991)); epiregulina (Toyoda y col., J. Biol. Chem. 270:7495-7500 (1995); y Komurasaki y col., Oncogene 15:2841-2848 (1997)); una heregulina (véase más adelante); neuregulina-2 (NRG-2) (Carraway y col., Nature 387:512-516 (1997)); neuregulina-3 (NRG-3) (Zhang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:9562-9567 (1997)); neuregulina-4 (NRG-4) (Harari y col., Oncogene 18:2681-89 (1999)); y cripto (CR-1) (Kannan y col., J. Biol. Chem. 272(6):3330-3335 (1997)). Los ligandos de HER que se unen a EGFR incluyen EGF, TGF- $\alpha$ , anfiregulina, betacelulina, HB-EGF y epiregulina. Los ligandos de HER que se unen a HER3 incluyen heregulinas. Los ligandos de HER que pueden unirse a HER4 incluyen betacelulina, epiregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 y heregulinas.

“Heregulina” (HRG) cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido codificado por el producto génico de heregulina como se ha desvelado en la patente de EE.UU. n° 5.641.869, o Marchionni y col., Nature, 362:312-318 (1993). Ejemplos de heregulinas incluyen heregulina- $\alpha$ , heregulina- $\beta$ 1, heregulina- $\beta$ 2 y heregulina- $\beta$ 3 (Holmes y col., Science, 256:1205-1210 (1992); y la patente de EE.UU. n° 5.641.869); factor de diferenciación de *neu* (NDF) (Peles y col., Cell 69: 205-216 (1992)); actividad inductora de receptores de acetilcolina (ARIA) (Falls y col., Cell 72:801-815 (1993)); factores de crecimiento de la glía (GGF) (Marchionni y col., Nature, 362:312-318 (1993)); factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho y col., J. Biol. Chem. 270:14523-14532 (1995));  $\gamma$ -heregulina (Schaefer y col., Oncogene 15:1385-1394 (1997)).

Un “dímero de HER” en el presente documento es un dímero no covalentemente asociado que comprende al menos dos receptores HER. Tales complejos pueden formarse cuando una célula que expresa dos o más receptores HER se expone a un ligando de HER y pueden aislarse por inmunoprecipitación y analizarse por SDS-PAGE como se describe, por ejemplo, en Sliwkowski y col., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994). Otras proteínas, tales como una subunidad de receptores de citocina (por ejemplo, gp130), pueden asociarse al dímero. Preferentemente, el dímero de HER comprende HER2.

45 Un “heterodímero de HER” en el presente documento es un heterodímero no covalentemente asociado 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 para HER (por ejemplo, anticuerpos para EGFR, HER2, HER3 o HER4); fármacos dirigidos a EGFR; antagonistas de HER de molécula pequeña; inhibidores de tirosina cinasas de HER; inhibidores duales de tirosina cinasas 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 aguas abajo tales como MAPK o Akt (véase la Fig. 5). Preferentemente, 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. Preferentemente, el inhibidor de la dimerización de HER es un inhibidor de la dimerización de HER2 y/o inhibe la heterodimerización de HER. Preferentemente, 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 la dimerización de HER más preferido en el presente 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 de los mismos con uno o varios de otros receptores HER (por ejemplo, anticuerpo monoclonal para EGFR 806, mAb 806, que se une a EGFR activado o “desconectado”; véase Johns y col., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)); anticuerpos que se unen a HER3 e inhiben la dimerización del mismo con uno o varios de otros receptores HER; anticuerpos que se unen a HER4 e

inhiben la dimerización del mismo con uno o varios de otros receptores HER; inhibidores de la dimerización de péptidos (patente de EE.UU. nº 6.417.168); inhibidores de la dimerización antisentido; etc.

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

10 Un “anticuerpo para HER” es un anticuerpo que se une a un receptor HER. Opcionalmente, el anticuerpo para HER interfiere adicionalmente con la activación o función de HER. Preferentemente, el anticuerpo para HER se une al receptor HER2. Un anticuerpo para HER2 de particular interés en el presente documento es pertuzumab. Otro ejemplo de un anticuerpo para HER2 es trastuzumab. Ejemplos de anticuerpos para EGFR incluyen cetuximab y ABX0303.

15 “Activación de HER” se refiere a la activación, o fosforilación, de uno cualquiera o más receptores HER. Generalmente, la activación de HER produce la transducción de señales (por ejemplo, aquellas producidas por un dominio de cinasa intracelular de un receptor HER que fosforila residuos de tirosina en el receptor HER o un polipéptido de sustrato). La activación de HER puede mediar por ligando de HER que se une a un dímero de HER que comprende el receptor HER de interés. El ligando de HER que se une a un dímero de HER puede activar un dominio cinasa de uno o más de los receptores HER en el dímero y así producir la fosforilación de residuos de tirosina en uno o más de los receptores HER y/o fosforilación de residuos de tirosina en polipéptidos(s) de sustrato  
20 adicional(es), tales como cinasas intracelulares Akt o MAPK, véase, por ejemplo, la Fig. 5.

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

25 Un anticuerpo que “inhibe la dimerización de HER” es un anticuerpo que inhibe, o interfiere con, la formación de un dímero de HER. Preferentemente, un anticuerpo tal se une a HER2 en el sitio de unión heterodimérico del mismo. El anticuerpo inhibidor de la dimerización más preferido en el presente 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  
30 varios de otros receptores HER (por ejemplo, anticuerpo monoclonal para EGFR 806, mAb 806, que se une a EGFR activado o “desconectado”; véase Johns y col., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)); anticuerpos que se unen a HER3 e inhiben la dimerización del mismo con uno o varios de otros receptores HER; y anticuerpos que se unen a HER4 e inhiben la dimerización del mismo con uno o varios de otros receptores HER.

35 Un anticuerpo que “bloquea la activación del ligando de un receptor HER más eficazmente que trastuzumab” es uno que reduce o elimina la activación del ligando de HER de receptor(es) HER o dímero(s) de HER más eficazmente (por ejemplo, al menos aproximadamente 2 veces más eficazmente) que trastuzumab. Preferentemente, un anticuerpo tal bloquea la activación del ligando de HER de un receptor HER al menos aproximadamente tan eficazmente como el anticuerpo monoclonal murino 2C4 o un fragmento Fab del mismo, o como pertuzumab o un  
40 fragmento Fab del mismo. Puede evaluarse la capacidad de un anticuerpo para bloquear la activación del ligando de un receptor HER estudiando los dímeros de HER directamente, o evaluando la activación de HER, o señalización aguas abajo, que resulta de la dimerización de HER, y/o evaluando el sitio de unión de anticuerpo-HER2, etc. Ensayos para cribar anticuerpos con la capacidad para inhibir la activación del ligando de un receptor HER más eficazmente que trastuzumab se describen en Agus y col., Cancer Cell 2: 127-137 (2002) y el documento  
45 WO01/00245 (Adams y col.). A modo de ejemplo solo, puede ensayarse: inhibición de la formación de dímeros de HER (véase, por ejemplo, la Fig. 1A-B de Agus y col., Cancer Cell 2: 127-137 (2002); y el documento WO01/00245); reducción en la activación del ligando de HER de células que expresan dímeros de HER (documento WO01/00245 y Fig. 2A-B de Agus y col., Cancer Cell 2: 127-137 (2002), por ejemplo); bloqueo de la unión del ligando de HER a células que expresan dímeros de HER (documento WO01/00245, y Fig. 2E de Agus y col., Cancer Cell 2: 127-137 (2002), por ejemplo); 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 la presencia (o ausencia) de ligando de HER (documento WO01/00245 y Figs. 3A-D de Agus y col., Cancer Cell 2: 127-137 (2002), por ejemplo); inhibición de la señalización aguas abajo (por ejemplo, inhibición de la fosforilación de AKT dependiente de HRG o inhibición de la fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF $\alpha$ ) (véase el documento WO01/00245 y la Fig. 2C-D de Agus y  
50 col., Cancer Cell 2: 127-137 (2002), por ejemplo). También puede evaluarse si el anticuerpo inhibe o no la dimerización de HER estudiando el sitio de unión de anticuerpo-HER2, por ejemplo, evaluando una estructura o modelo, tal como una estructura cristalina, del anticuerpo unido a HER2 (véase, por ejemplo, Franklin y col., Cancer Cell 5:317-328 (2004)).

60 Un “sitio de unión heterodimérico” en HER2 se refiere a una región en el dominio extracelular de HER2 que se pone en contacto con, o interacciona con, una región en el dominio extracelular de EGFR, HER3 o HER4 tras la formación de un dímero con el mismo. La región se encuentra en el dominio II de HER2. Franklin y col., Cancer Cell 5:317-328 (2004).

65 El anticuerpo para HER2 puede “inhibir la fosforilación de AKT dependiente de HRG” y/o inhibir “la fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF $\alpha$ ” más eficazmente (por ejemplo, al menos 2 veces más eficazmente) que

trastuzumab (véase Agus y col., Cancer Cell 2: 127-137 (2002) y el documento WO01/00245, a modo de ejemplo).

El anticuerpo para HER2 puede ser uno que, al igual que pertuzumab, “no inhiba la escisión del ectodominio de HER2” (Molina y col., Cancer Res. 61:4744-4749(2001)). Trastuzumab, por otra parte, pueden inhibir la escisión del ectodominio de HER2.

Un anticuerpo para HER2 que “se une a un sitio de unión heterodimérico” de HER2 se une a residuos en el dominio II (y opcionalmente también se une a residuos en otros de los dominios del dominio extracelular de HER2, tales como los dominios I y III), y puede impedir estéricamente, al menos a cierto grado, la formación de un heterodímero de HER2-EGFR, HER2-HER3 o HER2-HER4. Franklin y col., Cancer Cell 5:317-328 (2004) caracterizan la estructura cristalina de HER2-pertuzumab, depositada en el banco de datos de proteínas RCSB (código de ID IS78), que ilustra un anticuerpo a modo de ejemplo que se une al sitio de unión heterodimérico de HER2.

Un anticuerpo que “se une al dominio II” de HER2 se une a residuos en el dominio II y opcionalmente residuos en otro(s) dominio(s) de HER2, tales como los dominios I y III. Preferentemente, el anticuerpo que se une al dominio II se une al empalme entre los dominios I, II y III de HER2.

“Expresión” de proteínas se refiere a la conversión de la información codificada en un gen en ARN mensajero (ARNm) y luego a la proteína.

En el presente documento, una muestra o célula que “expresa” una proteína de interés (tal como HER3 y/o HER2) es una en la que el ARNm que codifica la proteína, o la proteína, que incluye fragmentos de la misma, se determina que está presente en la muestra o célula.

Una muestra, célula, tumor o cáncer que “expresa HER3 a un nivel inferior a la mediana del nivel para la expresión de HER3” en un tipo de cáncer es uno en el que el nivel de expresión de HER3 se considera un “nivel de HER3 bajo” para un experto para ese tipo de cáncer. Generalmente, tal nivel estará en el intervalo de aproximadamente 0 a menos de aproximadamente el 50 %, con respecto a niveles de HER3 en una población de muestras, células, tumores o cánceres del mismo tipo de cáncer. Por ejemplo, la población que se usa para llegar a la mediana del nivel de expresión puede ser muestras de cáncer de ovario generalmente, o subagrupaciones de las mismas, tales como cáncer de ovario resistente a quimioterapia, cáncer de ovario resistente a platino, además de cáncer de ovario avanzado, resistente al tratamiento o recurrente. Los ejemplos en el presente documento demuestran cómo puede determinarse la mediana del nivel de expresión. Esto puede constituir un valor absoluto de expresión. Así, con referencia a la Fig. 17 en el presente documento, el corte para pacientes con cáncer ovario resistente a platino que se considera que expresa HER3 a un bajo nivel puede ser aproximadamente 2,28 o menos (inferior al percentil 50); aproximadamente 1,88 o menos (inferior al percentil 45); aproximadamente 1,71 o menos (inferior al percentil 40); aproximadamente 1,57 o menos (inferior al percentil 35); aproximadamente 1,4 o menos (inferior al percentil 30); aproximadamente 1,19 o menos (inferior al percentil 25); aproximadamente 0,99 o menos (inferior al percentil 20), etc. Tales valores absolutos se cuantificarán en un ensayo bajo condiciones de ensayo especificadas tales como la qRT-PCR desvelada en el presente documento, y lo más preferentemente el ensayo de qRT-PCR como en el Ejemplo 1. Preferentemente, el nivel de expresión de HER3 es inferior al percentil 50, y lo más preferentemente inferior al percentil 30 ó 25.

Las expresiones “HER2:HER3” o “HER2 con respecto a HER3” en el presente documento se refieren al nivel de expresión de HER2 con respecto al nivel de expresión de HER3 en una muestra, célula, tumor o cáncer. Tal(es) nivel(es) de expresión puede(n) cuantificarse usando varias técnicas diferentes tales como las desveladas en el presente documento. Aunque esto puede calcularse como un cociente de la expresión de HER2 con respecto a la expresión de HER3, la presente invención contempla diversas otras formas de evaluar los niveles de HER2 y HER3 de manera que se seleccione un paciente para terapia en el presente documento, que incluyen, pero no se limita a, usar un árbol de decisiones en el que los pacientes se seleccionan si su expresión de HER2 y/o HER3 está por encima o por debajo de ciertos cortes, etc. Tales diversos otros medios para comparar HER2 con HER3 están englobados por los términos “HER2:HER3” o “HER2 con respecto a HER3” en el presente documento.

Una muestra, célula, tumor o cáncer que “expresa HER2:HER3 a un nivel que es superior al percentil 25 para la expresión de HER2:HER3” en un tipo de cáncer es uno en el que el cociente de la expresión de HER2 con respecto a la expresión de HER3 no es un “nivel de HER2:HER3 bajo” para ese tipo de cáncer. Preferentemente, tal nivel estará en el intervalo de superior a aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 100 %, con respecto a niveles de HER2:HER3 en una población de muestras, células, tumores o cánceres del mismo tipo de cáncer. Por ejemplo, la población que se usa para llegar a tales niveles de expresión puede ser muestras de cáncer de ovario generalmente, o subagrupaciones de las mismas, tales como cáncer de ovario resistente a quimioterapia, cáncer de ovario resistente a platino, además de cáncer de ovario avanzado, resistente al tratamiento o recurrente. Los ejemplos en el presente documento demuestran cómo pueden determinarse los niveles de expresión en percentiles. En una realización, el nivel de HER2:HER3 constituye un valor absoluto de expresión. Así, con referencia a la Fig. 29 en el presente documento, el corte para pacientes con cáncer de ovario resistente a platino que expresa HER2:HER3 a este nivel puede ser aproximadamente 0,82 o más (superior al percentil 25); aproximadamente 0,90 o más (superior al percentil 30); aproximadamente 1,06 o más (superior al percentil 35); aproximadamente 1,13 o más

(superior al percentil 40); aproximadamente 1,26 o más (superior al percentil 45); aproximadamente 1,53 o más (superior a percentil 50); aproximadamente 1,70 o más (superior al percentil 55); aproximadamente 1,86 o más (superior al percentil 60); aproximadamente 2,15 o más (superior al percentil 65); aproximadamente 2,49 o más (superior al percentil 70); aproximadamente 2,62 o más (superior al percentil 75); aproximadamente 2,92 o más (superior al percentil 80), etc. Tales valores absolutos se cuantificarán en un ensayo bajo condiciones de ensayo especificadas, tales como la qRT-PCR desvelada en el presente documento, y lo más preferentemente el ensayo de qRT-PCR como en el Ejemplo 1. En una realización, el nivel de expresión de HER2:HER3 es superior al percentil 50, preferentemente superior al percentil 70, y lo más preferentemente superior al percentil 75. Pacientes cuyo cáncer expresa HER2:HER3 a niveles como se describen en el presente documento pueden, o no pueden, expresar en exceso HER2.

La técnica de “reacción en cadena de la polimerasa” o “PCR” como se usa en el presente documento generalmente se refiere a un procedimiento en el que cantidades mínimas de un trozo específico de ácido nucleico, ARN y/o ADN, se amplifican como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.683.195 concedida el 28 de julio de 1987. Generalmente, necesita estar disponible la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá, de forma que puedan diseñarse cebadores de oligonucleótidos; estos cebadores serán idénticos o similares en secuencia a las hebras opuestas del molde que va a amplificarse. Los nucleótidos del extremo 5' de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. Puede usarse PCR para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas de ADN genómico total y ADNc transcrito de ARN celular total, secuencias de bacteriófago o plásmido, etc. Véanse generalmente Mullis y col., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989). Como se usa en el presente documento, la PCR se considera que es un ejemplo, pero no el único, de un procedimiento de reacción de polimerasa de ácido nucleico para amplificar una muestra de prueba 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 en tiempo real cuantitativa” o “qRT-PCR” se refiere a una forma de PCR en la que la cantidad de producto de PCR se mide en cada etapa en una reacción de PCR. Esta técnica se ha descrito en diversas publicaciones que incluyen Cronin y col., Am. J. Pathol. 164(1):35-42 (2004); y Ma y col., Cancer Cell 5:607-616 (2004).

El término “micromatriz” se refiere a una disposición ordenada de elementos de matriz hibridables, preferentemente sondas de polinucleótidos, sobre un sustrato.

El término “polinucleótido”, cuando se usa en singular o plural, generalmente se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. Así, por ejemplo, los polinucleótidos como se definen en el presente 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 incluyen regiones mono y bicatenarias. Además, el término “polinucleótido” como se usa en el presente documento se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las hebras en tales regiones pueden ser de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir todas de una o más de las moléculas, pero más normalmente implican solo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región tricatenaria frecuentemente es un oligonucleótido. El término “polinucleótido” incluye específicamente ADNc. El término incluye ADN (que incluyen ADNc) y ARN que contienen una o más bases modificadas. Así, los ADN o ARN con esqueletos modificados por estabilidad o por otros motivos son “polinucleótidos” ya que el término está previsto en el presente documento. Además, los ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritriadas, están incluidos dentro del término “polinucleótidos” como se define en el presente documento. En general, el término “polinucleótido” engloba todas las formas químicamente, enzimáticamente y/o metabólicamente modificadas de polinucleótidos sin modificar, además de las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, que incluyen células simples y complejas.

El término “oligonucleótido” se refiere a un polinucleótido relativamente corto, que incluye, sin limitación, desoxirribonucleótidos monocatenarios, ribonucleótidos mono o bicatenarios, híbridos de ARN:ADN y ADN bicatenarios. Los oligonucleótidos, tales como oligonucleótidos de sondas de ADN monocatenario, se sintetizan frecuentemente mediante procedimientos químicos, por ejemplo, usando sintetizadores de oligonucleótidos automatizados que están comercialmente disponibles. Sin embargo, los oligonucleótidos pueden prepararse mediante otros varios procedimientos que incluyen técnicas *in vitro* mediadas por ADN recombinante y por expresión de ADN en células y organismos.

El término “amplificación génica” se refiere a un procedimiento por el cual se forman múltiples copias de un gen o fragmento de gen en una célula o línea celular particular. La región duplicada (un estiramiento de ADN amplificado) se denomina frecuentemente “amplicón”. Normalmente, la cantidad de ARN mensajero (ARNm) producido también aumenta la proporción del número de copias hechas del gen particular expresado.

La "rigurosidad" de reacciones de hibridación puede ser fácilmente determinada por un experto en la materia, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración de sales. En general, sondas más largas requieren mayores temperaturas para la hibridación apropiada, mientras que sondas más cortas necesitan menores temperaturas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para la re-hibridación cuando las cadenas complementarias están presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de identidad deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, de esto resulta que temperaturas relativas mayores tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas menores menos. Para detalles adicionales y la explicación de la rigurosidad de reacciones de hibridación véase Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se define en el presente documento, normalmente: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para lavar, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecilsulfato de sodio al 0,1 % a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante tal como formamida, por ejemplo, 50 % (v/v) de formamida con albúmina de suero bovino al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C; o (3) emplean formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1 %, 5 x disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1 % y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato de sodio) y formamida al 50 % a 55 °C seguido por un lavado de alta rigurosidad de que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55 °C.

"Condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse como se describe por Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, e incluyen el uso de una disolución 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 la noche a 37 °C en una disolución que comprende: formamida al 20 %, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 % y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37,50 °C. El experto en la técnica reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., según sea necesario para adaptar factores tales como la longitud de sonda y similares.

Un polipéptido de la "secuencia nativa" es uno que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (por ejemplo, receptor HER o ligando de HER) derivado de la naturaleza, que incluye variantes que se producen naturalmente o alélicas. Tales polipéptidos de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos. Así, un polipéptido de la secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos del polipéptido humano, polipéptido murino o polipéptido de cualquier otra especie de mamífero que se produce naturalmente.

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

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con la investigación, diagnóstico o usos terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica (1) a más del 95 % en peso de anticuerpo como se ha determinado por, por ejemplo, el procedimiento de Lowry, y en algunas realizaciones a más del 99 % en peso; (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos del extremo N o secuencia de aminoácidos interna por uso de, por ejemplo, un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, tinción con azul de Coomassie o con plata. 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. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Los "anticuerpos nativos" son glucoproteínas normalmente heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes de disulfuro entre cadenas regularmente separadas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V<sub>H</sub>) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V<sub>L</sub>) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una superficie de

separación entre los dominios ligero y variable de las cadenas pesadas.

La “región variable” o “dominio variable” de un anticuerpo se refiere a los dominios del extremo amino de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada puede denominarse “VH”. El dominio variable de la cadena ligera puede denominarse “VL”. Estos dominios son generalmente las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión al antígeno.

El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables se diferencien ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usen en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a lo largo de todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables (HVR), tanto en los dominios variables de las cadenas ligeras como las cadenas pesadas. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman las regiones estructurales (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de hoja beta, conectada por tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura de hoja beta. Las HVR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de anticuerpos (véase, Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

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

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas y se describen generalmente en, por ejemplo, Abbas y col., *Cellular and Mol. Immunology*, 4ª ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o varias de otras proteínas o péptidos.

Los términos “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo completo” se usan en el presente documento indistintamente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no fragmentos de anticuerpos como se define a continuación. Los términos se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Un “anticuerpo desnudo” para los fines en el presente documento es un anticuerpo que no está conjugado con un resto citotóxico o radiomarca.

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente que comprenden la región de unión al antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja la capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina da un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación con antígeno y todavía puede reticular el antígeno.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión al antígeno completo. En una realización, una especie de Fv bicatenaria consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y ligera en estrecha asociación no covalente. En una especie de Fv monocatenaria (scFv), un dominio variable de la cadena pesada y ligera puede estar ligado covalentemente por un ligador de péptido flexible, de forma que las cadenas ligeras y pesadas puedan asociarse en una estructura “dimérica” análoga a la de en una especie Fv bicatenaria. Es en esta configuración que las tres HVR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno sobre la superficie del dímero VH-VL. Conjuntamente, las seis HVR confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse al antígeno, aunque a una menor afinidad que el sitio de unión entero.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el (los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes poseen un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Fragmentos "Fv monocatenarios" o "scFv" de anticuerpos comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena de polipéptidos sencilla. Generalmente, el polipéptido de scFv comprende además un ligador de polipéptido entre los dominios VH y VL que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), pág. 269-315. Los fragmentos scFv en el presente documento incluyen específicamente "productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños" (SMIP) tal como se han desvelado en los documentos US2005/0180970A1 y US2005/0186216 A1 asignados a Trubion.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH-VL). Usando un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son obligados a aparearse con los dominios complementarios de la otra cadena y a crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson y col., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson y col., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Por tanto, el adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, ya que no es una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal tal normalmente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptidos que se une a diana, en el que la secuencia de polipéptidos de unión a diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia de polipéptidos de unión a diana de una pluralidad de secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, el procedimiento de selección pueden ser la selección de un único clon de una pluralidad de clones, tal como un conjunto de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que una secuencia de unión diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpo policlonal que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpo monoclonal son ventajosas ya que normalmente están sin contaminar por otras inmunoglobulinas.

El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, ya que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden producirse mediante varias técnicas que incluyen, por ejemplo, el procedimiento de hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975); Hongo y col., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567), tecnologías de expresión en fago (véanse, por ejemplo, Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu y col., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee y col., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-12472 (2004); y Lee y col., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004) y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen partes o todos los loci o genes de inmunoglobulinas humanas que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann y col., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); las patentes de EE.UU. nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks y col., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que presenten la actividad biológica deseada (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567; y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en los que la región de unión al antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, inmunizando monos macacos con el antígeno de interés.

Formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una HVR del receptor están sustituidos con residuos de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de FR de la inmunoglobulina humana son sustituidos con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden ser para refinar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones y col., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Véanse también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurler y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); y las patentes de EE.UU. nº 6.982.321 y 7.087.409.

Anticuerpos para HER2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 o trastuzumab (HERCEPTIN®) como se describen en la Tabla 3 de la patente de EE.UU. 5.821.337; 520C9 humanizado (documento WO93/21319); y anticuerpos 2C4 humanizados tales como pertuzumab como se describen en el presente documento.

Para los fines en el presente documento, “trastuzumab”, “HERCEPTIN®” y “huMAb4D5-8” se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas en las SEC ID N° 15 y 16, respectivamente.

En el presente documento, “pertuzumab” y “OMNITARG™” se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas en las SEC ID N° 13 y 14, respectivamente.

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

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o ha sido producido usando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos como se ha desvelado en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen bibliotecas de expresión en fago. Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos procedimientos descritos en Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner y col., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando el antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir tales anticuerpos en respuesta a exposición antigénica, pero cuyos sitios endógenos se han inhabilitado, por ejemplo, xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.075.181 y 6.150.584 referentes a la tecnología XENOMOUSE™). Véase, por tanto, por ejemplo, Li y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) referente a anticuerpos humanos generados mediante una tecnología de hibridomas de linfocitos B humanos.

Residuos de la “región estructural” o de “FR” son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de HVR que se han definido en el presente documento.

El término “numeración de residuos del dominio variable como en Kabat” o “numeración de las posiciones de aminoácidos como en Kabat”, y variaciones de los mismos, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de la cadena pesada o dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat y col., arriba. Usando este sistema de numeración, la actual secuencia de aminoácidos lineal pueden contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una

FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, los residuos 82a, 82b y 82c, etc., según Kabat) después del residuo 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de residuos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada por Kabat "patrón".

En toda la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, el sistema de numeración de Kabat se usa generalmente cuando se refiere a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat y col., *Sequences of Immunological Interest*. 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa generalmente cuando se refiere a un residuo en una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU informado en Kabat y col., *Sequences of Immunological Interest*. 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). A menos que se establezca de otro modo en el presente documento, referencias a números de residuos en el dominio variable de anticuerpos significa numeración de residuos por el sistema de numeración de Kabat. A menos que se establezca de otro modo en el presente documento, referencias a números de residuos en el dominio constante de anticuerpos significa numeración de residuos por el sistema de numeración EU (por ejemplo, véase la solicitud provisional de Estados Unidos nº 60/640.323, Figuras para la numeración EU).

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que producen una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee aquella(s) alteración (alteraciones). En una realización, un anticuerpo madurado por afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad pueden producirse usando ciertos procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks y col., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describen la maduración por afinidad por barajado de dominios VH y VL. La mutagénesis al azar de HVR y/o residuos de la región estructural se describe, por ejemplo, por Barbas y col., *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier y col., *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton y col., *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson y col., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins y col., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

"Funciones efectoras" de anticuerpos se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de la secuencia nativa o región Fc de variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región del extremo C de una cadena pesada de la inmunoglobulina que incluye regiones Fc de la secuencia nativa y regiones Fc de variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de la inmunoglobulina podrían variar, se define que la región Fc de la cadena pesada de IgG humana normalmente se estira de un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o de Pro230, al extremo carboxilo de la misma. La lisina del extremo C (residuo 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o manipulando recombinantemente el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin residuos K447 eliminados, y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

A menos que se indique lo contrario en el presente documento, la numeración de los residuos en una cadena pesada de la inmunoglobulina es la del índice EU como en Kabat y col., arriba. El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo IgG1 EU humano.

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de la secuencia nativa. "Funciones efectoras" a modo de ejemplo incluyen unión a C1q; CDC; unión a receptor de Fc; ADCC; fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), etc. Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y pueden evaluarse usando diversos ensayos como se ha desvelado, por ejemplo, en definiciones en el presente documento.

Una "región Fc de la secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc de la secuencia nativa humana incluyen una región Fc de IgG1 humana de la secuencia nativa (alotipos no A y A); región Fc de IgG2 humana de la secuencia nativa; región Fc de IgG3 humana de la secuencia nativa; y región Fc de IgG4 humana de la secuencia nativa, además de variantes que se producen naturalmente de las mismas.

Una "región Fc de variante" comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la de una región Fc de la secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc de variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de la secuencia nativa o en comparación con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de la secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc de variante en el presente documento poseerá preferentemente al menos aproximadamente el 80 % de homología con una región Fc de la secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % de homología con la misma, más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % de homología con la misma.

"Receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, que incluyen variantes alélicas y formas alternativamente cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores Fc $\gamma$ RII incluyen Fc $\gamma$ RIIA (un "receptor activante") y Fc $\gamma$ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. El receptor activante Fc $\gamma$ RIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor Fc $\gamma$ RIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase, por ejemplo, Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel y col., Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Otros FcR, que incluyen aquellos que van a identificarse en el futuro, están englobados por el término "FcR" en el presente documento.

El término "receptor de Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim y col., J. Immunol. 24:249 (1994)) y la regulación de la homeostasia de inmunoglobulinas. Se conocen procedimientos de medición de la unión a FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie y Ward, Immunol. Today 18(12):592-598 (1997); Ghetie y col., Nature Biotechnology 15(7):637-640 (1997); Hinton y col., J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004); documento WO 2004/92219 (Hinton y col.).

La unión a FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión con alta afinidad a FcRn humano puede ensayarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos con una región Fc de variante. El documento WO 2000/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a FcR. Por tanto, véase, por ejemplo, Shields y col., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001).

"Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En ciertas realizaciones, las células expresan al menos Fc $\gamma$ RIII y realizan función (funciones) efectora(s) de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP), linfocitos citolíticos espontáneos (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretada unida sobre receptores de Fc (FcR) presentes sobre ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células NK, neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que lleva antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Las células primarias para mediar en ADCC, células NK, expresan Fc $\gamma$ RIII solo, mientras que los monocitos expresan Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.500.362 ó 5.821.337 o la patente de EE.UU. n.º 6.737.056 (Presta). Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen CMSP y células NK. Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes y col., PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (o la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno relacionado. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods 202:163 (1996). Variantes de polipéptidos con secuencias de aminoácidos de la región Fc alterada (polipéptidos con una región Fc de variante) y capacidad de unión a C1q elevada o disminuida se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 6.194.551 B1 y el documento WO 1999/51642. Por tanto, véase, por ejemplo, Idusogie y col., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

El término “anticuerpo que comprende región Fc” se refiere a un anticuerpo que comprende una región Fc. La lisina del extremo C (residuo 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o por manipulación recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Por consiguiente, una composición que comprende un anticuerpo que tiene una región Fc según la presente invención puede comprender un anticuerpo con K447, con todos los K447 eliminados, o una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

El término “anticuerpo de la especie principal” en el presente documento se refiere a la estructura de anticuerpo en una composición que es la molécula de anticuerpo cuantitativamente predominante en la composición. En una realización, el anticuerpo de la especie principal es un anticuerpo para HER2, tal como un anticuerpo que se une al dominio II de HER2, anticuerpo que inhibe la dimerización de HER más eficazmente que trastuzumab, y/o un anticuerpo que se une a un sitio de unión heterodimérico de HER2. La realización preferida en el presente documento del anticuerpo de la especie principal es una que comprende las secuencias de aminoácidos ligeras variables y pesadas variables en SEC ID N° 3 y 4, y lo más preferentemente que comprende las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas en SEC ID N° 13 y 14 (pertuzumab).

Una anticuerpo de “variante de la secuencia de aminoácidos” en el presente documento es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos que se diferencia de un anticuerpo de la especie principal. Generalmente, las variantes de la secuencia de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente el 70 % de homología con el anticuerpo de la especie principal, y preferentemente serán al menos aproximadamente el 80 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 90 %, homólogas al anticuerpo de la especie principal. Las variantes de la secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones y/o adiciones en ciertas posiciones dentro de o adyacentes a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la especie principal. Ejemplos de variantes de la secuencia de aminoácidos en el presente documento incluyen una variante ácida (por ejemplo, variante de anticuerpo desamidado), un variante básica, un anticuerpo con una extensión conductora del extremo amino (por ejemplo, VHS-) en una o dos cadenas ligeras del mismo, un anticuerpo con un residuo de lisina del extremo C en una o dos cadenas pesadas del mismo, etc., e incluye combinaciones de variaciones a las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y/o ligeras. La variante de anticuerpo de interés particular en el presente documento es el anticuerpo que comprende una extensión conductora del extremo amino sobre una o dos cadenas ligeras del mismo, opcionalmente que comprende además otra secuencia de aminoácidos y/o diferencias de glicosilación con respecto al anticuerpo de la especie principal.

Una anticuerpo de “variante de glicosilación” en el presente documento es un anticuerpo con uno o más restos de hidrato de carbono unidos al mismo que se diferencian de uno o más restos de hidrato de carbono unidos a un anticuerpo de la especie principal. Ejemplos de variantes de glicosilación en el presente documento incluyen anticuerpo con una estructura de oligosacárido G1 o G2, en lugar de una estructura de oligosacárido G0, unido a una región Fc del mismo, anticuerpo con uno o dos restos de hidrato de carbono unidos a una o dos cadenas ligeras del mismo, anticuerpo sin hidrato de carbono unido a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, etc., y combinaciones de alteraciones de glicosilación.

Si el anticuerpo tiene una región Fc, una estructura de oligosacárido puede unirse a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, por ejemplo, en el residuo 299 (298, numeración Eu de residuos). Para pertuzumab, G0 era la estructura de oligosacárido predominante, encontrándose otras estructuras de oligosacárido tales como G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) y G2 en menores cantidades en la composición de pertuzumab.

A menos que se indique lo contrario, una “estructura de oligosacárido G1” en el presente documento incluye estructuras G-1, G1-1, G1(1-6) y G1(1-3).

Una “extensión conductora del extremo amino” en el presente documento se refiere a uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia conductora del extremo amino que están presentes en el extremo amino de una cualquiera o más cadenas pesadas o ligeras de un anticuerpo. Una extensión conductora del extremo amino a modo de ejemplo comprende o consiste en tres residuos de aminoácidos, VHS, presentes en una o ambas cadenas ligeras de una variante de anticuerpo.

Un anticuerpo “desamidado” es uno en el que uno o más residuos de asparagina del mismo se han derivatizado, por ejemplo, a un ácido aspártico, una succinimida o un ácido iso-aspártico.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento celular no regulado. Un “tipo de cáncer” en el presente documento se refiere a una categoría o indicación particular de cáncer. Ejemplos de tales tipos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, 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 tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), cáncer de pulmón de células no pequeñas

(CPCNP), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, 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 de las vías biliares, además de cáncer de cabeza y cuello, además de subtipos de cualquiera de tales cánceres, que incluyen, pero no se limitan a, tipos resistentes a quimioterapia, resistentes a platino, avanzados, resistentes al tratamiento y/o recurrentes de los mismos.

Un “tipo de cáncer que puede responder a un inhibidor de HER” es uno que cuando se trata con un inhibidor de HER, tal como un anticuerpo para HER2 o inhibidor de molécula pequeña, muestra un beneficio terapéuticamente eficaz en el paciente con él según cualquiera de los criterios para eficacia terapéutica conocidos para el oncólogo experto, que incluyen aquellos elaborados en el presente documento, pero particularmente en términos de supervivencia, que incluye supervivencia libre de progresión (SLP) y/o supervivencia global (SG). Preferentemente, tal cáncer está seleccionado de cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de mama metastásico (CMM), cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), cáncer de próstata y cáncer colorrectal. Lo más preferentemente, el cáncer es cáncer de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio, que incluye formas resistentes a platino de tales cánceres, además de cáncer de ovario avanzado, resistente al tratamiento o recurrente.

Un “tipo de cáncer que puede responder a un inhibidor de la dimerización de HER” es uno que cuando se trata con un inhibidor de la dimerización de HER, tal como pertuzumab, muestra un beneficio terapéuticamente eficaz en el paciente con él según cualquiera de los criterios para eficacia terapéutica conocidos para el oncólogo experto, que incluyen aquellos elaborados en el presente documento, pero particularmente en términos de supervivencia, que incluye supervivencia libre de progresión (SLP) y/o supervivencia global (SG). Preferentemente, tal cáncer está seleccionado de cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de mama metastásico (CMM), cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), cáncer de próstata y cáncer colorrectal. Lo más preferentemente, el cáncer es cáncer de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio, que incluye formas resistentes a platino de tales cánceres, además de cáncer de ovario avanzado, resistente al tratamiento o recurrente.

Una “respuesta eficaz” y expresión similar se refiere a una respuesta al inhibidor de la dimerización de HER, inhibidor de HER o agente quimioterapéutico que es significativamente superior a una respuesta de un paciente que no expresa HER3 al nivel diseñado.

Un cáncer “avanzado” es uno que se ha extendido fuera del sitio u órgano de origen, tanto por invasión local como metástasis.

Un cáncer “resistente al tratamiento” es uno que progresa aún cuando un agente antitumoral, tal como un agente quimioterapéutico, esté siendo administrado al paciente con cáncer. Un ejemplo de un cáncer resistente al tratamiento es uno que es resistente al tratamiento con platino.

Un cáncer “recurrente” es uno que ha vuelto a crecer, tanto en el sitio inicial como en un sitio remoto, después de una respuesta a terapia inicial.

En el presente documento, un “paciente” es un paciente humano. El paciente puede ser un “paciente con cáncer”, es decir, uno que está padeciendo o en riesgo de padecer uno o más síntomas del cáncer.

Una “muestra tumoral” en el presente documento es una muestra derivada de, o que comprende células tumorales de, un tumor del paciente. Ejemplos de muestras tumorales en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, biopsias de tumor, células tumorales circulantes, proteínas plasmáticas circulantes, líquido ascítico, cultivos celulares primarios o líneas celulares derivadas de tumores o que presentan propiedades similares a tumores, además de muestras tumorales conservadas, tales como muestras tumorales fijadas en formalina, incorporadas en parafina o muestras tumorales congeladas.

Una muestra tumoral “fijada” es una que se ha conservado histológicamente usando un fijador.

Una muestra tumoral “fijada en formalina” una que se ha conservado usando formaldehído como fijador.

Una muestra tumoral “incorporada” es una rodeada por un medio firme y generalmente duro tal como parafina, cera, celoidina o una resina. La incorporación hace posible el corte de finas secciones para examen microscópico o para la generación de micromatrices de tejido (TMA).

Una muestra tumoral “incorporada en parafina” es una rodeada por una mezcla purificada de hidrocarburos sólidos derivados del petróleo.

En el presente documento, una muestra tumoral “congelada” se refiere a una muestra tumoral que está, o ha sido, congelada.

5 Una muestra de cáncer o biológica que “muestra expresión, amplificación o activación de HER” es una que, en una prueba de diagnóstico, expresa (incluyendo expresión en exceso) un receptor HER, ha amplificado el gen HER, y/o demuestra de otra forma la activación o fosforilación de un receptor HER.

10 Una célula cancerosa con “expresión en exceso o amplificación de receptores HER” es una que tiene niveles significativamente mayores de una proteína o gen de receptor HER en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Tal expresión en exceso puede producirse por amplificación génica o por elevada transcripción o traducción. La expresión en exceso o amplificación de receptores HER puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando niveles elevados de la proteína HER presente sobre la superficie de una célula (por ejemplo, mediante un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). Alternativamente, o adicionalmente, pueden medirse niveles de ácido nucleico que codifica HER en la célula, por ejemplo, mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia Southern o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). También puede estudiarse la expresión en exceso o amplificación de receptores HER midiendo el antígeno liberado (por ejemplo, dominio extracelular de HER) en un líquido biológico tal como suero (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.933.294 concedida el 12 de junio de 1990; documento WO91/0526 publicado el 18 de abril de 1991; patente de EE.UU. 5.401.638 concedida el 28 de marzo de 1995; y Sias y col., J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, están disponibles diversos ensayos *in vivo* para el médico habitual. Por ejemplo, pueden exponerse células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con una marca detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y puede evaluarse la unión del anticuerpo a células en el paciente, por ejemplo, por barrido externo para radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

25 En cambio, un cáncer que “no expresa en exceso o amplifica receptor HER” es uno que no tiene niveles superiores a los normales de la proteína o gen de receptor HER en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Los anticuerpos que inhiben la dimerización de HER, tales como pertuzumab, pueden usarse para tratar cáncer que no expresa en exceso o amplifica receptor HER2.

30 En el presente documento, un “agente antitumoral” se refiere a un fármaco usado para tratar cáncer. Ejemplos no limitantes de agentes antitumorales en el presente documento incluyen agentes quimioterapéuticos, inhibidores de HER, inhibidores de la dimerización de HER, anticuerpos para HER, anticuerpos dirigidos contra antígenos asociados a tumor, compuestos antihormonales, citocinas, fármacos dirigidos a EGFR, agentes antiangiogénicos, inhibidores de tirosina cinasas, agentes inhibidores del crecimiento y anticuerpos, agentes citotóxicos, anticuerpos que inducen apoptosis, inhibidores de la COX, inhibidores de farnesiltransferasa, anticuerpos que se unen a la proteína oncofetal CA 125, vacunas contra HER2, inhibidores de Raf o ras, doxorubicina liposómica, topotecan, taxano, inhibidores duales de tirosina cinasas, TLK286, EMD-7200, pertuzumab, trastuzumab, erlotinib y bevacizumab.

35 Un “agente antitumoral autorizado” es un fármaco usado para tratar cáncer al que se le ha concedido autorización de comercialización por una autoridad reguladora tal como la Agencia Estadounidense del Medicamento (FDA) o equivalente extranjero de la misma.

40 Si un inhibidor de HER o inhibidor de la dimerización de HER se administra como un “agente antitumoral individual”, es el único agente antitumoral administrado para tratar el cáncer, es decir, no se administra en combinación con otro agente antitumoral, tal como quimioterapia.

45 Por “tratamiento de referencia” en el presente documento está previsto el agente antitumoral o agentes que se usan rutinariamente para tratar una forma particular de cáncer. Por ejemplo, para cáncer de ovario resistente a platino, el tratamiento de referencia es topotecan o doxorubicina liposómica.

50 Un “agente inhibidor del crecimiento”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa HER, tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce 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 distinto de la fase S), tal como agentes que inducen la parada en G1 y la parada en fase M. Bloqueantes en fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que paran G1 también se extienden a la parada en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs” de Murakami y col., (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 células cancerosas que expresan en exceso HER2. Los anticuerpos para HER2 inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de células de tumor de mama SK-BR-3 en cultivo celular más del 20 %, y preferentemente 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, en los que la inhibición del crecimiento se determina seis días después de la exposición de células SK-BR-3 al anticuerpo (véase la patente de EE.UU. n° 5.677.171 concedida 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 en el presente documento más adelante. El anticuerpo inhibidor del crecimiento preferido es una variante humanizada de anticuerpo monoclonal murino 4D5, por ejemplo, trastuzumab.

Un anticuerpo que “induce apoptosis” es uno que induce muerte celular programada como se ha determinado por unión de anexina V, fragmentación de ADN, encogimiento celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de la membrana (llamados cuerpos apoptóticos). La célula es normalmente una que expresa en exceso el receptor HER2. Preferentemente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreática o de vejiga. *In vitro*, la célula puede ser SK-BR-3, BT474, célula Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o célula SKOV3. Están disponibles diversos procedimientos para evaluar los eventos celulares asociados a la apoptosis. Por ejemplo, puede medirse la translocalización de fosfatidilserina (PS) por unión de anexina; la fragmentación de ADN puede evaluarse mediante escalonamiento de ADN; y la condensación nuclear/de cromatina junto con fragmentación de ADN puede evaluarse por cualquier aumento en células hipodiploides. Preferentemente, el anticuerpo que induce apoptosis es uno que produce aproximadamente 2 a 50 veces, preferentemente aproximadamente 5 a 50 veces, y lo más preferentemente aproximadamente 10 a 50 veces, de inducción de la unión de anexina con respecto a célula sin tratar en un ensayo de unión a anexina usando células BT474 (véase más adelante). Ejemplos de anticuerpos para HER2 que inducen apoptosis son 7C2 y 7F3.

El “epítotope 2C4” es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se une el anticuerpo 2C4. Con el fin de cribar para anticuerpos que se unan al epítotope 2C4, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Preferentemente, el anticuerpo bloquea la unión de 2C4 a HER2 aproximadamente el 50 % o más. Alternativamente, el mapeo de epítotos puede realizarse para evaluar si el anticuerpo se une o no al epítotope 2C4 de HER2. El epítotope 2C4 comprende residuos del dominio II en el dominio extracelular de HER2. 2C4 y pertuzumab se unen al dominio extracelular de HER2 en el empalme de los dominios I, II y III. Franklin y col., *Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

El “epítotope 4D5” es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se unen el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y trastuzumab. Este epítotope está próximo al dominio transmembrana de HER2, y dentro del dominio IV de HER2. Para cribar para anticuerpos que se unen al epítotope de 4D5 puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Preferentemente, el anticuerpo bloquea la unión de 2C4 a HER2 aproximadamente el 50 % o más. Alternativamente, el mapeo de epítotos puede realizarse para evaluar si el anticuerpo se une o no al epítotope 4D5 de HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más residuos en la región de aproximadamente el residuo 529 a aproximadamente el residuo 625, incluido el ECD de HER2, numeración de residuos que incluye el péptido señal).

El “epítotope 7C2/7F3” es la región en el extremo N, dentro del dominio I, del dominio extracelular de HER2 a la que se unen los anticuerpos 7C2 y/o 7F3 (cada uno depositado en la ATCC, véase más adelante). Para cribar para anticuerpos que se unen al epítotope de 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 and David Lane (1988). Alternativamente, el mapeo de epítotos puede realizarse para establecer si el anticuerpo se une o no al epítotope de 7C2/7F3 en HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más residuos en la región de aproximadamente el residuo 22 a aproximadamente el residuo 53 de ECD de HER2, numeración de residuos que incluye el péptido señal).

“Tratamiento” se refiere a tanto tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con cáncer, además de aquellos en los que el cáncer va a prevenirse. Por tanto, el paciente que va a tratarse en el presente documento puede haber sido diagnosticado como que tiene o puede tener predisposición o ser susceptible a cáncer.

Los términos “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” se refieren a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar cáncer en el paciente. La cantidad eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar a cierto grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar a cierto grado y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, a cierto grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar a cierto grado uno o más de los síntomas asociados al cáncer. Hasta el punto de que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La cantidad eficaz puede prolongar la supervivencia libre de progresión (por ejemplo, como se mide por los Criterios de evaluación de respuestas para tumores sólidos, RECIST, o cambios de CA-125), producir una respuesta objetiva (incluyendo una respuesta parcial, RP, o respuesta completa, RC), mejorar la supervivencia (incluyendo supervivencia global y supervivencia libre de progresión) y/o

mejorar uno o más síntomas del cáncer (por ejemplo, como se evalúa por FOSI). Lo más preferentemente, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco es eficaz para mejorar la supervivencia libre de progresión (SLP) y/o supervivencia global (SG).

5 “Supervivencia” se refiere a mantener al paciente vivo, e incluye supervivencia global, además de supervivencia libre de progresión.

“Supervivencia global” se refiere a mantener al paciente vivo durante un periodo de tiempo definido, tal como 1 año, 5 años, etc., desde el momento del diagnóstico o tratamiento.

10 “Supervivencia libre de progresión” se refiere a mantener al paciente vivo, sin que el cáncer progrese o empeore.

Por “prolongar la supervivencia” se indica aumentar la supervivencia global o libre de progresión en un paciente tratado con respecto a un paciente sin tratar (es decir, con respecto a un paciente no tratado con un inhibidor de HER, inhibidor de la dimerización de HER, tal como pertuzumab), o con respecto a un paciente que no expresa HER3 al nivel diseñado, y/o con respecto a un paciente tratado con un agente antitumoral autorizado (tal como topotecan o doxorubicina liposómica, si el cáncer es cáncer de ovario).

20 Una “respuesta objetivo” se refiere a una respuesta medible, que incluye respuesta completa (RC) o respuesta parcial (RP).

Por “respuesta completa” o “CR” está prevista la desaparición de todos los signos de cáncer en respuesta a tratamiento. Esto no siempre significa que el cáncer se haya curado.

25 “Respuesta parcial” o “RP” se refiere a una disminución en el tamaño de uno o más tumores o lesiones, o en el grado de cáncer en el cuerpo, en respuesta al tratamiento.

30 El término “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o produce la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de planta o animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de las mismas.

35 Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y la ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calmentestatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de 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; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediína (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 11 y caliqueamicina omega 11 (véase, por ejemplo, Nicolaou y col., *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor de alfa-4 integrina oral; dinemicina, que incluye dinemicina A; una esperamicina; además de cromóforo de neocarzinostatina y la cromoproteína relacionada cromóforos antibióticos de enediína), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposomas de HCl de doxorubicina (DOXIL®), doxorubicina liposómica TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposómica pegilada (CAELYX®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marfelmomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una eptilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metrotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; recuperador de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziouona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales

como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; 5 dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas manipuladas con albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™) y doxetaxel (TAXOTERE™); clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vincas, que previenen que la polimerización de tubulina forme microtúbulos, que incluyen vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, 10 FILDESIN®) y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovovina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, que incluye bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (ARELIA®), tiludronato (SKELID®) o 15 risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización que participan en proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo, 20 LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); perifosina; inhibidor de la COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosomas (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tales como oblimersen sodio (GENA SENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR (véase la definición más adelante); inhibidores de tirosina cinasas (véase la definición más adelante); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; además de combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para 25 una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

En el presente documento, agentes quimioterapéuticos incluyen "agentes antihormonales" o "agentes terapéuticos 30 endocrinos" que actúan regulando, reduciendo, bloqueando o inhibiendo los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento de cáncer. Pueden ser hormonas en sí mismas, que incluyen, pero no se limitan a: antiestrógenos con perfil mixto de agonista/antagonista que incluyen tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, keoxifeno y moduladores de receptores selectivos de estrógenos (SERM) tales como SERM3; antiestrógenos puros sin 35 propiedades agonistas tales como fulvestrant (FASLODEX®) y EM800 (tales agentes pueden bloquear la dimerización de receptores de estrógeno (ER), inhibir la unión de ADN, aumentar la renovación de ER y/o suprimir niveles de ER); inhibidores de la aromatasa, que incluyen inhibidores de la aromatasa esteroideos tales como formestano y exemestano (AROMASIN®) e inhibidores de la aromatasa no esteroideos tales como anastrozol (ARIMIDAX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de la aromatasa incluyen vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol y 4(5)-imidazoles; agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante, que incluyen leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, buserelina y triptorelina; esteroides sexuales, que incluyen progestinas tales como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, 40 estrógenos tales como dietilestilbestrol y premarina, y andrógenos/retinoides tales como fluoximesterona, ácido all-transretiónico y fenretinida; onapristona; antiprogesteronas; reguladores por disminución de receptores de estrógenos (ERD); antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; además de combinaciones de dos o más de los 45 anteriores.

Un "agente quimioterapéutico antimetabolito" es un agente que es estructuralmente similar a un metabolito, pero 50 puede no ser usado por el cuerpo de una manera productiva. 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 (XELODA™), 6-mercaptopurina, metotrexato, 6-tioguanina, pemetrexed, raltitrexed, arabinosilcitosina ARA-C citarabina (CYTOSAR-U®), dacarbazina (DTIC-DOME®), azocitosina, desoxicitosina, piridmideno, fludarabina (FLUDARA®), cladribina, 2-desoxi-D-glucosa etc. El agente quimioterapéutico antimetabolito preferido es gemcitabina. 55

"Gemcitabina" o "monoclorhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (b-isómero)" es un análogo de nucleósido que presenta actividad antitumoral. La fórmula empírica para el HCl de gemcitabina es C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> · HCl. El HCl de gemcitabina es comercializado por Eli Lilly bajo la marca registrada GEMZAR®. 60

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. 65

Por "quimioterapia basada en platino" está prevista terapia con uno o más agentes quimioterapéuticos basados en platino, opcionalmente en combinación con uno o varios de otros agentes quimioterapéuticos.

Por cáncer “resistente a quimioterapia” se indica que el paciente con cáncer ha progresado mientras que recibe un ciclo de quimioterapia (es decir, el paciente es “resistente al tratamiento con quimioterapia”), o el paciente ha progresado en el plazo de 12 meses (por ejemplo, en el plazo de 6 meses) después de completarse un ciclo de quimioterapia.

Por cáncer “resistente a platino” se indica que el paciente con cáncer ha progresado mientras que recibe una quimioterapia basada en platino (es decir, el paciente es “resistente al tratamiento con platino”), o el paciente ha progresado en el plazo de 12 meses (por ejemplo, en el plazo de 6 meses) después de completarse un ciclo de quimioterapia basada en platino.

Un “agente antiangiogénico” se refiere a un compuesto que bloquea, o interfiere con, a cierto grado, el desarrollo de los vasos sanguíneos. El factor antiangiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o anticuerpo que se une a un factor de crecimiento o receptor de factor de crecimiento que participa en promover la angiogénesis. El factor antiangiogénico preferido en el presente documento es un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), tal como bevacizumab (AVASTIN®).

El término “citocina” es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen la hormona de crecimiento tal como la hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana de N-metionilo y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante tiroidea (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ ; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 $\alpha$ , 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- $\alpha$  o TNF- $\beta$ ; y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y el ligando kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa

Como se usa en el presente documento, el término “fármaco dirigido a EGFR” se refiere a un agente terapéutico que se une a EGFR y, opcionalmente, inhibe la activación de EGFR. Ejemplos de tales 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 EE.UU. n.º 4.943.533, Mendelsohn y col.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano reformado (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 tipo II (patente de EE.UU. n.º 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tal como ABX-EGF (véase el documento WO98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto y col., Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo para EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compite con tanto EGF como TGF- $\alpha$  por la unión a EGFR; y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns y col., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR puede conjugarse con un agente citotóxico, generando así un inmunoconjugado (véase, por ejemplo, el documento EP659.439A2, Merck Patent GmbH). Ejemplos de moléculas pequeñas que se unen a EGFR incluyen ZD 1839 o Gefitinib (IRESSA™; Astra Zeneca); CP-358774 o Erlotinib (TARCEVA™; Genentech/OSI); y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen); EMD-7200.

Un “inhibidor de tirosina cinasas” es una molécula que inhibe la actividad de tirosina cinasas de una tirosina cinasa tal como un receptor HER. Ejemplos de tales inhibidores incluyen los fármacos dirigidos a EGFR anotados en el párrafo precedente; inhibidor de tirosina cinasas de HER2 de molécula pequeña tal como TAK165 disponible de Takeda; CP-724.714, un inhibidor selectivo oral de la tirosina cinasa de receptor ErbB2 (Pfizer y OSI); inhibidores duales de HER tales como EKB-569 (disponible de Wyeth) que preferencialmente se unen a EGFR, pero inhiben tanto células que expresan en exceso HER2 como EGFR; GW572016 (disponible de Glaxo) un oral inhibidor de tirosina cinasas HER2 y EGFR; PKI-166 (disponible de Novartis); inhibidores de pan-HER tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de Raf-1 tales como agente antisentido ISIS-5132 disponible de ISIS Pharmaceuticals que inhibe la señalización de Raf-1; inhibidores de TK no dirigidos a HER tales como mesilato de imatinib (Gleevec™) disponible de Glaxo; inhibidor de la cinasa I regulada extracelular MAPK CI-1040 (disponible de Pharmacia); quinazolinas, 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 (diferuloiimetano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen restos de nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambers); moléculas antisentido (por ejemplo, aquellas que se unen a

ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (patente de EE.UU. nº 5.804.396); trifostinas (patente de EE.UU. nº 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de 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 describen en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: patente de EE.UU. nº 5.804.396; documento WO99/09016 (American Cyanamid); WO98/43960 (American Cyanamid); documento WO97/38983 (Warner Lambert); documento WO99/06378 (Warner Lambert); documento WO99/06396 (Warner Lambert); documento WO96/30347 (Pfizer, Inc); documento WO96/33978 (Zeneca); documento WO96/3397 (Zeneca); y documento WO96/33980 (Zeneca).

Una dosis "fija" o "plana" de un agente terapéutico en el presente documento se refiere a una dosis que se administra a un paciente humano sin considerar el peso (WT) o área superficial corporal (BSA) del paciente. Por tanto, la dosis fija o plana no se proporciona como una dosis de mg/kg o una dosis de mg/m<sup>2</sup>, sino como una cantidad absoluta del agente terapéutico.

Una dosis de "carga" en el presente documento generalmente comprende una dosis inicial de un agente terapéutico administrado a un paciente, y va seguida de una o más dosis de mantenimiento de la misma. Generalmente se administra una única dosis de carga, pero se contemplan múltiples dosis de carga en el presente documento. Normalmente, la cantidad de dosis de carga administrada(s) supera la cantidad de la(s) dosis de mantenimiento y/o la(s) dosis de carga se administran más frecuentemente que la(s) dosis de mantenimiento, de manera que se logre la concentración en estado estacionaria deseada del agente terapéutico antes de que pueda lograrse con la(s) dosis de mantenimiento.

Una dosis de "mantenimiento" en el presente documento se refiere a una o más dosis de un agente terapéutico administrado al paciente durante un periodo de tratamiento. Normalmente, las dosis de mantenimiento se administran a intervalos de tratamiento separados, tales como aproximadamente cada semana, aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente cada 3 semanas, o aproximadamente cada 4 semanas.

Un "medicamento" es un fármaco activo para tratar cáncer, tal como un inhibidor de HER, un inhibidor de la dimerización de HER (tal como pertuzumab) o un agente quimioterapéutico (tal como gemcitabina).

Un "público objetivo" es un grupo de personas o una institución a la que se promueve o se tiene previsto promover un medicamento particular, tal como por marketing o publicidad, especialmente para usos particulares, tratamientos, o indicaciones, tales como pacientes individuales, poblaciones de pacientes, lectores de periódicos, bibliografía médica y revistas, audiencia de televisión o internet, oyentes de radio o internet, médicos, empresas farmacéuticas, etc.

Un "prospecto" se usa para referirse a instrucciones normalmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos, que contiene información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, otros productos terapéuticos que van a combinarse con el producto envasado, y/o advertencias referentes al uso de tales productos terapéuticos, etc.

## II. Producción de anticuerpos

Como, en la realización preferida, el inhibidor de HER es un anticuerpo, sigue una descripción en cuanto a técnicas a modo de ejemplo para la producción de anticuerpos para HER usados según la presente invención. El antígeno de HER que va a usarse para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de un receptor HER o una porción del mismo, que contiene el epítipo deseado. Alternativamente, las células que expresan HER en su superficie celular (por ejemplo, células NIH-3T3 transformadas para expresar en exceso HER2; o una línea celular de carcinoma tal como células SK-BR-3, véase Stancovski y col., PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991)) pueden usarse para generar anticuerpos. Otras formas de receptor HER útil para generar anticuerpos serán evidentes para aquellos expertos en la materia.

### (i) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se producen preferentemente 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 es inmunogénica en las especies a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzilsulfosuccinimida (conjugación a residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl<sub>2</sub> o R'N=C=NR en la que R y R' son grupos alquilo diferentes.

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 disolución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales

se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días después, los animales se sangran y el suero se ensaya para título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta la meseta del título. Preferentemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero se conjuga con una proteína diferente y/o mediante un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también pueden prepararse en cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. Por tanto, agentes de agregación tales como alumbre se usan adecuadamente para potenciar la respuesta inmunitaria.

(ii) *Anticuerpos monoclonales*

En la materia están disponibles diversos procedimientos para preparar anticuerpos monoclonales en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), por procedimientos de ADN recombinante (patente de EE.UU. n° 4.816.567).

En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se ha descrito anteriormente en el presente documento para provocar linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos se fusionan entonces 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 así preparadas se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan la producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre éstas, líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Centro de distribución de células del Instituto Salk, San Diego, California, EE.UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland. EE.UU. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y heteromiéloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); y Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de 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 enzima (ELISA).

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

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

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

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven de fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan a células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y col., *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückerthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

En otra realización, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas en fago de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCaffery y col., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Las posteriores publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) por barajado de cadena (Marks y col., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), además de infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Así, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de las cadenas pesadas y cadenas ligeras humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. nº 4.816.567; y Morrison y col., *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido de no inmunoglobulina.

Normalmente, tales polipéptidos de no inmunoglobulina están sustituidos con los dominios constantes de un anticuerpo, o están sustituidos con los dominios variables de un sitio de combinación del antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación del antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación del antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

### *(iii) Anticuerpos humanizados*

En la técnica se han descrito procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente en lo sucesivo residuos de "importación", que se toman normalmente de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. nº 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el llamado procedimiento "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor es entonces aceptada como la región estructural humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims y col., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia y col., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta y col., *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 lograr este objetivo, según un procedimiento preferido, anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias del receptor y de importación de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como aumento de la afinidad por el (los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y principalmente sustancialmente implicados en influir en la unión al antígeno.

El documento WO01/00245 describe la producción de anticuerpos para HER2 humanizados a modo de ejemplo que se unen a HER2 y bloquean la activación del ligando de un receptor HER. El anticuerpo humanizado de particular interés en el presente documento bloquea la activación mediada por EGF, TGF- $\alpha$  y/o HRG de MAPK esencialmente tan eficazmente como el anticuerpo monoclonal murino 2C4 (o un fragmento Fab del mismo) y/o se une a HER2 esencialmente tan eficazmente como el anticuerpo monoclonal murino 2C4 (o un fragmento Fab del mismo). El anticuerpo humanizado en el presente documento puede comprender, por ejemplo, residuos no humanos de la

región hipervariable incorporados en un dominio pesado variable humano y puede comprender además una sustitución de la región estructural (FR) en una posición seleccionada del grupo que consiste en 69H, 71H y 73H utilizando el sistema de numeración de dominios variables expuesto en Kabat y col., *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 de FR en dos o todas las posiciones 69H, 71H y 73H.

Un anticuerpo humanizado a modo de ejemplo de interés en el presente documento comprende complementariedad de dominios pesados variables que determinan residuos GFTFTDYTMX en la que 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 de aminoácidos de aquellos residuos de CDR, por ejemplo, si las modificaciones mantienen esencialmente o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las anteriores secuencias de CDR pesadas variables. Tales variantes de anticuerpo pueden prepararse por maduración por afinidad, por ejemplo, como se describe más adelante. El anticuerpo humanizado más preferido comprende la secuencia de aminoácidos del dominio pesado variable en SEC ID N°: 4.

El anticuerpo humanizado puede comprender complementariedad de dominios ligeros variables que determinan residuos KASQDVSIGVA (SEC ID N°: 10); SASYX<sup>1</sup>X<sup>2</sup>X<sup>3</sup> en la que X<sup>1</sup> es preferentemente R o L, X<sup>2</sup> es preferentemente Y o E, y X<sup>3</sup> es preferentemente T o S (SEC ID N°: 11); y/o QQYYIYPYT (SEC ID N°: 12), por ejemplo, además de aquellos residuos de CDR del dominio pesado variable en el párrafo precedente. Tales anticuerpos humanizados comprenden opcionalmente modificaciones de aminoácidos de los anteriores residuos de CDR, por ejemplo, si las modificaciones mantienen esencialmente o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las anteriores secuencias de CDR ligeras variables. Tales variantes de anticuerpo pueden prepararse por maduración por afinidad, por ejemplo, como se describe más adelante. El anticuerpo humanizado más preferido comprende la secuencia de aminoácidos del dominio ligero variable en SEC ID N°: 3.

La presente solicitud también contempla anticuerpos madurados por afinidad que se unen a HER2 y bloquean la activación del ligando de un receptor HER. El anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, por ejemplo, uno que comprende las secuencias ligeras variables y/o pesadas variables de SEC ID N° 3 y 4, respectivamente (es decir, que comprende VL y/o VH de pertuzumab). El anticuerpo madurado por afinidad se une preferentemente al receptor HER2 con una afinidad superior a la de 2C4 murino o pertuzumab (por ejemplo, de aproximadamente dos o aproximadamente cuatro veces, a aproximadamente 100 veces o aproximadamente 1000 veces de afinidad mejorada, por ejemplo, como se evalúa usando un dominio extracelular (ECD) de HER2 por ELISA). Residuos de CDR pesados variables a modo de ejemplo 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 residuos). Ejemplos de residuos de 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 residuos).

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como Fab, que está opcionalmente conjugado con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto. El anticuerpo IgG1 intacto preferido comprende la secuencia de la cadena ligera en SEC ID N°: 13 y la secuencia de la cadena pesada en SEC ID N°: 14.

#### (iv) Anticuerpos humanos

Como una alternativa a la humanización pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que tras la inmunización pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J<sub>H</sub>) en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de la línea germinal en tales ratones mutantes en la línea germinal producirá la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann y col., *Year in Immuno*, 7:33 (1993); y las patentes de EE.UU. n° 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807. Alternativamente, la tecnología de expresión en fago (McCafferty y col., *Nature* 348, 552-553 (1990)) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro* a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes sin inmunizar. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en marco en un gen de la proteína de la cubierta tanto principal como minoritario de un bacteriófago filamentoso tal como M13 o fd, y se muestran como fragmentos funcionales de anticuerpos sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria

del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. Las muestras de fago pueden realizarse en varias formas; 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 genes de V para la expresión en fago. Clackson y col., *Nature* 352, 624-628 (1991) aislaron una matriz diferente de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes de V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos sin inmunizar y los anticuerpos con respecto a una matriz diferente de antígenos (incluyendo autoantígenos) pueden aislarse esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991), o Griffith y col., *EMBO J.* 12, 725-734 (1993). Véase, por tanto, las patentes de EE.UU. nº 5.565.332 y 5.573.905.

Como se trata anteriormente, los anticuerpos humanos también pueden generarse por linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de EE.UU. 5.567.610 y 5.229.275).

Anticuerpos para HER2 humanos se describen en la patente de EE.UU. nº 5.772.997 concedida el 30 de junio de 1998 y el documento WO 97/00271 publicado el 3 de enero de 1997.

#### (v) Fragmentos de anticuerpos

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos que comprenden una o más regiones de unión al antígeno. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); y Brennan y col., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ahora ser directamente producidos por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos tratadas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter y col., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> pueden aislarse directamente de cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico experto. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; patente de EE.UU. nº 5.571.894; y patente de EE.UU. nº 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; por tanto, pueden ser adecuadas para la unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión de sFv para dar la fusión de una proteína efectora en tanto el extremo amino como el carboxi de un sFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, arriba. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.641.870. Tales anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

#### (vi) Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopes diferentes. Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a dos epítopes diferentes de la proteína HER2. Otros de tales anticuerpos pueden combinar un sitio de unión de HER2 con sitio(s) de unión para EGFR, HER3 y/o HER4. Alternativamente, un brazo de HER2 puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante sobre un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores de Fc para IgG (Fc $\gamma$ R), tales como Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) y Fc $\gamma$ RIII (CD16), de manera que centren mecanismos de defensa celular para 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- $\alpha$ , alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>).

El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo HER2/Fc $\gamma$ RIII biespecífico y la patente de EE.UU. nº 5.837.234 desvela un anticuerpo HER2/Fc $\gamma$ RI biespecífico IDM1 (Osidem). Un anticuerpo HER2/Fc $\alpha$  biespecífico se muestra en el documento WO98/02463. La patente de EE.UU. nº 5.821.337 enseña un anticuerpo HER2/CD3 biespecífico. MDX-210 es un Ab HER2-Fc $\gamma$ RIII biespecífico.

Los procedimientos para producir anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina en los que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537 (1993)). Debido al surgido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace normalmente por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante embarazosa, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos

similares se desvelan en el documento WO 93/08829 y en Traunecker y col., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Según un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios que combinan anticuerpo-antígeno) están fusionados a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (C<sub>H</sub>1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones en las que relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales produzca altos rendimientos o cuando las relaciones no sean de significancia particular.

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

Según otro enfoque descrito en la patente de EE.UU. n° 5.731.168, la superficie de separación entre un par de moléculas de anticuerpos puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La superficie de separación preferida comprende al menos una parte del dominio C<sub>H</sub>3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la superficie de separación de la primera molécula de anticuerpo están sustituidas con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean sobre la superficie de separación de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para elegir como diana células del sistema inmunitario para células no deseadas (patente de EE.UU. n° 4.676.980) y para el tratamiento de infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden producirse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Agentes de reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica y se desvelan en la patente de EE.UU. n° 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlace químico. Brennan y col., *Science*, 229:81 (1985), describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito de sodio para estabilizar ditiolos vecinos y prevenir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte entonces en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro Fab'-TNB derivado para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992), describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')<sub>2</sub>. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. Por tanto, el anticuerpo biespecífico formado podía unirse a células que expresan en exceso el receptor HER2 y linfocitos T humanos normales, además de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se han producido usando cremalleras de leucina. Kostelny y col., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión

de genes. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y entonces se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) por un ligador 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 están obligados a aparearse con los dominios  $V_L$  y  $V_H$  complementarios de otro fragmento, formándose así dos sitios de unión al antígeno. También se ha notificado otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv (sFv). Véase, Gruber y col., J. Immunol., 152:5368 (1994).

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

#### 15 (vii) Otras modificaciones de secuencias de aminoácidos

Se contemplan modificación (modificaciones) de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede desearse mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se hace cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procedimientos post-traduccionales del anticuerpo, tales como cambiar el número o posición de los sitios de glicosilación.

Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son las localizaciones preferidas para mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells Science, 244:1081-1085 (1989). Aquí se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen con un aminoácido neutro o negativamente (lo más preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con antígeno. Entonces, aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan introduciendo más u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Así, mientras que el sitio para la introducción de una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación por sí misma no necesita predeterminarse. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, el barrido de ala o la mutagénesis al azar se realiza en el codón o región diana y las variantes de anticuerpo expresadas se criban para la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que oscilan en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, además de inserciones intrasecuencia de un único residuo de aminoácido o múltiples residuos de aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo en el extremo N o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituido con un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "Sustituciones preferidas". Si tales sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados "Sustituciones a modo de ejemplo" en la Tabla 1, o como se describen adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos, y cribarse los productos.

**Tabla 1**

| Residuo original | Sustituciones a modo de ejemplo | Sustituciones preferidas |
|------------------|---------------------------------|--------------------------|
| Ala (A)          | Val; Leu; Ile                   | 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 |

Modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se llevan a cabo seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) la masa de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse según similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda ed., pág. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

- (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares sin carga: 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)

Alternativamente, los residuos que se producen naturalmente pueden dividirse en grupos basándose en propiedades comunes de las cadenas laterales:

- (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) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas supondrán el intercambio de un miembro de una de estas clases con otra clase.

Cualquier residuo de cisteína que no participe en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede estar sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación anómala. En cambio, puede(n) añadirse enlace(s) de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente si 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 residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para el desarrollo posterior tendrá(n) propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental del que se generan. Una forma conveniente de generar tales variantes de sustitución implica maduración por afinidad usando expresión en fago. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se expresan en un modo monovalente en partículas de fago filamentosas como fusiones con el producto génico III de M13 encapsidado dentro de cada partícula. Entonces, las variantes expresadas en fago se criban para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se ha desvelado en el presente documento. Con el fin de identificar sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación puede realizarse mutagénesis por barrido de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y HER2 humano. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a cribado usando como se describe en el presente documento y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para el posterior desarrollo.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por alterar se indica deleciónar uno o más restos de hidrato de carbono encontrados en el anticuerpo, y/o añadir uno o más

sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de anticuerpos está normalmente tanto ligada a N como ligada a O. Ligado a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina en las que X es cualquier aminoácido, excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un posible sitio de glicosilación. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, el más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxi prolina o 5-hidroxisilina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos anteriormente descritas (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o sustitución con, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación ligados a O).

Si el anticuerpo comprende una región Fc, el hidrato de carbono unido al mismo puede alterarse. Por ejemplo, anticuerpos con una estructura de hidrato de carbono madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la solicitud de patente de EE.UU. 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 bisecante (GlcNAc) en el hidrato de carbono unido a una región Fc del anticuerpo se citan en el documento WO03/011878, Jean-Mairet y col., y la patente de EE.UU. n° 6.602.684, Umana y col., Anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se informan en el documento WO97/30087, Patel y col., Véanse también el documento WO98/58964 (Raju, S.) y el documento WO99/22764 (Raju, S.) referente a anticuerpos con hidrato de carbono alterado unido a la región Fc de los mismos.

Puede desearse modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, de manera que se potencie la citotoxicidad mediada por células dependiente del antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede lograrse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, puede(n) introducirse residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado pueden tener capacidad de internalización mejorada y/o elevada destrucción de células mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Véanse Caron y col., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad potenciada usando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff y col., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente puede manipularse un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y así puede tener lisis del complemento potenciada y capacidades de ADCC. Véase Stevenson y col., Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

El documento WO00/42072 (Presta, L.) describe anticuerpos con función de ADCC mejorada en presencia de células efectoras humanas, si los anticuerpos comprenden sustituciones de aminoácidos en la región Fc de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo con ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de residuos). Preferentemente, la región Fc alterada es una región Fc de IgG1 humana que comprende o que consiste en sustituciones en una, dos o tres de estas posiciones. Tales sustituciones están opcionalmente combinadas con sustitución (sustituciones) que aumentan la unión de C1q y/o CDC.

Los anticuerpos con unión de C1q alterada y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) se describen en el documento WO99/51642, la patente de EE.UU. n° 6.194.551B1, la patente de EE.UU. n° 6.242.195B1, la patente de EE.UU. n° 6.528.624B1 y la patente de EE.UU. n° 6.538.124 (Idusogie y col.). Los anticuerpos comprenden una sustitución de aminoácidos en una o más de posiciones de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de la región Fc de los mismos (numeración Eu de residuos).

Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo puede incorporarse un epítipo de unión al receptor silvestre en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5.739.277. Como se usa en el presente documento, el término "epítipo de unión al receptor silvestre" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida en suero in vivo de la molécula de IgG.

Anticuerpos con unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn) y semividas elevadas se describen en los documentos WO00/42072 (Presta, L.) y US2005/0014934A1 (Hinton y col.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en ella 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 residuos). La variante de anticuerpo que comprende la región Fc preferida con unión de FcRn mejorada comprende sustituciones de aminoácidos en una, dos o tres de las posiciones 307, 380 y 434 de la región Fc de la misma (numeración Eu de

residuos).

También se contemplan anticuerpos manipulados con tres o más (preferentemente cuatro) sitios de unión al antígeno funcionales (solicitud de EE.UU. n° US2002/0004587 A1, Miller y col.).

Moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante varios procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una variante preparada anteriormente o una versión de no variante del anticuerpo.

*(viii) Cribado de anticuerpos con las propiedades deseadas*

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

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

Por ejemplo, la inhibición de la unión de HRG a líneas celulares MCF7 de tumor de mama por anticuerpos para HER2 puede realizarse usando cultivos de MCF7 de monocapa sobre hielo en un formato de placa de 24 pocillos como se describe esencialmente en el documento WO01/00245. Los anticuerpos monoclonales para HER2 pueden añadirse a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos. Luego puede añadirse rHRG $\beta$ <sub>177-224</sub> marcado con <sup>125</sup>I (25 pm), y la incubación puede continuar durante 4 a 16 horas. Pueden prepararse las curvas de respuesta a dosis y puede calcularse un valor de CI<sub>50</sub> para el anticuerpo de interés. En una realización, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER tendrá una CI<sub>50</sub> para inhibir la unión de HRG a células MCF7 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferentemente 10 nM o menos. Si el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, la CI<sub>50</sub> para inhibir la unión de HRG a células MCF7 en este ensayo puede ser, por ejemplo, aproximadamente 100 nM o menos, más preferentemente 50 nM o menos.

Alternativamente, o adicionalmente, puede evaluarse la capacidad de un anticuerpo para bloquear la fosforilación de tirosina estimulada por ligando de HER de un receptor HER presente en un hetero-oligómero de HER. Por ejemplo, células que expresan endógenamente los receptores HER o transfectadas para expresarlos pueden incubarse con el anticuerpo y luego ensayarse para actividad de fosforilación de tirosina dependiente de ligando de HER usando un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (que está opcionalmente conjugado con una marca detectable). El ensayo de activación del receptor de cinasas descrito en la patente de EE.UU. n° 5.766.863 también está disponible para determinar la activación del receptor HER y bloquear esa actividad por un anticuerpo.

En una realización puede cribarse un anticuerpo que inhibe la estimulación con HRG de la fosforilación de p180 tirosina 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 anticuerpos monoclonales para HER2 pueden añadirse a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente; entonces, rHRG $\beta$ <sub>177-244</sub> puede añadirse a cada pocillo a una concentración final de 0,2 nM, y la incubación puede continuar durante 8 minutos. El medio puede aspirarse de cada pocillo, y las reacciones pueden detenerse mediante la adición de 100  $\mu$ l de tampón de muestra SDS (5 % de SDS, DTT 25 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25  $\mu$ l) puede someterse a electroforesis sobre un gel del 4-12 % de gradiente (Novex) y luego transferirse electroforéticamente a membrana de poli(difluoruro de vinilideno). Las inmunotransferencias de anti-fosfotirosina (a 1  $\mu$ g/ml) pueden revelarse, y la intensidad de la banda reactiva predominante a M<sub>r</sub> ~180.000 puede cuantificarse por densitometría de reflectancia. El anticuerpo seleccionado inhibirá preferentemente significativamente la estimulación con HRG de la fosforilación de p180 tirosina a aproximadamente el 0-35 % del control en este ensayo. Puede hacerse una curva de dosis-respuesta para la inhibición de la estimulación con HRG de la fosforilación de p180 tirosina como se ha determinado por densitometría de reflectancia y puede calcularse una CI<sub>50</sub> para el anticuerpo de interés. En una realización, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER tendrá una CI<sub>50</sub> para inhibir la estimulación con HRG de la fosforilación de p180 tirosina en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferentemente 10 nM o menos. Si el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, la CI<sub>50</sub> para inhibir la estimulación con HRG de la fosforilación de p180 tirosina en este ensayo puede ser, por ejemplo, aproximadamente 100 nM o menos, más preferentemente 50 nM o menos.

También pueden evaluarse los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo sobre células MDA-MB-175, por ejemplo, esencialmente como se describe en Schaefer y col., Oncogene 15:1385-1394 (1997). Según este ensayo, células MDA-MB-175 pueden tratarse con un anticuerpo monoclonal para HER2 (10  $\mu$ g/ml) durante 4 días y tefirse

con cristal violeta. La incubación con un anticuerpo para HER2 puede mostrar un efecto inhibitor del crecimiento sobre esta línea celular similar al mostrado por el anticuerpo monoclonal 2C4. En otra realización, HRG exógeno no invertirá significativamente esta inhibición. Preferentemente, el anticuerpo podrá 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 ausencia de HRG exógeno.

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

Para identificar anticuerpos para HER2 inhibidores del crecimiento, puede cribarse para anticuerpos que inhiben el crecimiento de células cancerosas que expresan en exceso HER2. En una realización, el anticuerpo inhibidor del crecimiento de elección puede inhibir el crecimiento de células SK-BR-3 en cultivo celular aproximadamente el 20-100 % y preferentemente aproximadamente el 50-100 % a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. Para identificar tales anticuerpos puede realizarse el ensayo de SK-BR-3 descrito en la patente de EE.UU. nº 5.677.171. Según este ensayo, células SK-BR-3 se cultivan en una mezcla 1:1 de medio F12 y DMEM complementado con 10 % de suero bovino fetal, glutamina y penicilina-estreptomina. Las células SK-BR-3 se siembran a 20.000 células en una placa de cultivo celular de 35 mm (2 ml/35 mm de placa). 0,5 a 30 µg/ml del anticuerpo para HER2 se añaden por pocillo. Después de seis días se cuenta el número de células, en comparación con células sin tratar, usando un contador de células COULTER™ electrónico. Aquellos anticuerpos que inhiben el crecimiento de las células SK-BR-3 aproximadamente el 20-100 %, o aproximadamente el 50-100 %, pueden seleccionarse como anticuerpos inhibidores del crecimiento. Véase la patente de EE.UU. nº 5.677.171 para ensayos para cribar anticuerpos inhibidores del crecimiento, tales como 4D5 y 3E8.

Con el fin de seleccionar anticuerpos que inducen apoptosis está disponible un ensayo de unión a anexina que usa células BT474. Las células BT474 se cultivan y se siembran en placas como se trata en el párrafo precedente. Entonces, el medio se elimina y se sustituye con medio fresco solo o medio que contiene 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal. Tras un periodo de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se desprenden por tripsinación. Entonces, las células se centrifugan, se resuspenden en tampón de unión a Ca<sup>2+</sup> y se separan en alícuotas en tubos como se ha tratado anteriormente para el ensayo de muerte celular. Entonces, los tubos reciben anexina marcada (por ejemplo, anexina V-FITC) (1 µg/ml). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Aquellos anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina con 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. Con el fin de realizar este ensayo, células BT474 que han sido tratadas con el anticuerpo de interés, como se ha descrito en los dos párrafos precedentes, se incuban con 9 µg/ml de HOECHST 33342™ durante 2 h a 37 °C, luego se analizan sobre 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 preferentemente 3 veces o mayor) que las células sin tratar (hasta el 100 % de células apoptóticas) pueden seleccionarse como anticuerpos pro-apoptóticos usando este ensayo. Véase el documento WO98/17797 para ensayos para cribar anticuerpos que inducen apoptosis, tales como 7C2 y 7F3.

Para cribar para anticuerpos que se unen 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 and David Lane (1988), para evaluar si el anticuerpo bloquea o no de forma cruzada la unión de un anticuerpo, tal como 2C4 o pertuzumab, a HER2. Alternativamente, o adicionalmente, puede realizarse mapeo de epítopes mediante procedimientos conocidos en la técnica y/o puede estudiarse la estructura de anticuerpo-HER2 (Franklin y col., *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)) para ver qué dominio(s) de HER2 es/son unido/s por el anticuerpo.

#### *(ix) Composiciones de pertuzumab*

En una realización de una composición de anticuerpo para HER2, la composición comprende una mezcla de un anticuerpo de pertuzumab de la especie principal y una o más variantes del mismo. La realización preferida en el presente documento de un anticuerpo de la especie principal de pertuzumab es una que comprende las secuencias de aminoácidos ligeras variables y pesadas variables en SEC ID Nº 3 y 4, y lo más preferentemente que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera seleccionada de SEC ID Nº 13 y 17, y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada seleccionada de SEC ID Nº 14 y 18 (incluyendo variantes desamidadas y/u oxidadas de aquellas secuencias). En una realización, la composición comprende una mezcla del anticuerpo de pertuzumab de la especie principal y una variante de la secuencia de aminoácidos del mismo que comprende una extensión conductora del extremo amino. Preferentemente, la extensión conductora del extremo amino está sobre una cadena ligera de la variante del anticuerpo (por ejemplo, sobre una o dos cadenas ligeras de la variante del anticuerpo). El anticuerpo de la especie principal para HER2 o la variante del anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, Fab de fragmentos F(ab')<sub>2</sub>), pero preferentemente ambos son anticuerpos de longitud completa. La variante del anticuerpo en el presente documento puede comprender una

extensión conductora del extremo amino sobre una cualquiera o más de las cadenas pesadas o ligeras del mismo. Preferentemente, la extensión conductora del extremo amino está sobre una o dos cadenas ligeras del anticuerpo. La extensión conductora del extremo amino comprende o consiste preferentemente en VHS-. La presencia de la extensión conductora del extremo amino en la composición puede detectarse por diversas técnicas analíticas que incluyen, pero no se limitan a, análisis de secuencias del extremo N, ensayo para heterogeneidad de carga (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico o electroforesis de zona capilar), espectrometría de masas, etc. La cantidad de la variante del anticuerpo en la composición generalmente oscila de una cantidad que constituye el límite de detección de cualquier ensayo (preferentemente análisis de secuencias del extremo N) usado para detectar la variante a una cantidad inferior a la cantidad del anticuerpo de la 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 conductora del extremo amino. Tales cantidades en porcentaje se determinan preferentemente usando análisis cuantitativo de secuencias del extremo N o análisis de intercambio catiónico (preferentemente, usando una columna de intercambio de cationes débiles de alta resolución, tal como una columna de intercambio catiónico PROPAC WCX-10™). Aparte de la variante de extensión conductora del extremo amino, se contemplan otras alteraciones de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la especie principal y/o variante, que incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo que comprende un residuo de lisina del extremo C sobre una o ambas cadenas pesadas del mismo, una variante de anticuerpo desamidado, etc.

Además, el anticuerpo de la especie principal o variante puede comprender además variaciones de glicosilación, ejemplos no limitantes de las cuales incluyen anticuerpo que comprende una estructura de oligosacárido G1 o G2 unida a la región Fc del mismo, anticuerpo que comprende un resto de hidrato de carbono unido a una cadena ligera del mismo (por ejemplo, uno o dos restos de hidrato de carbono, tales como glucosa o galactosa, unidos a una o dos cadenas ligeras del anticuerpo, por ejemplo, unidas a uno o más residuos de lisina), anticuerpo que comprende una o dos cadenas pesadas no glicosiladas, o anticuerpo que comprende un oligosacárido sialado unido a una o dos cadenas pesadas del mismo, etc.

La composición puede recuperarse de una línea celular genéticamente manipulada, por ejemplo, una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) que expresa el anticuerpo para HER2, o puede prepararse por síntesis de péptidos.

#### (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, de planta o animal, que incluye fragmentos y/o variantes de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una caliqueamicina, una maitansina (patente de EE.UU. nº 5.208.020), un tricoteno y CC1065, también se contemplan en el presente documento.

En una realización preferida de la invención, el anticuerpo está conjugado con una o más moléculas de maitansina (por ejemplo, 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 reaccionar con anticuerpo modificado (Chari y col., *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 puede producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones sub-picomolares. Análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a,  $\gamma_1^1$ ,  $\alpha_2^1$ ,  $\alpha_3^1$ , N-acetil- $\gamma_1^1$ , PSAG y  $\theta_1^1$  (Hinman y col., *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993) y Lode y col., *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)). Véanse, por tanto, las patentes de EE.UU. 5.714.586; 5.712.374; 5.264.586; y 5.773.001.

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

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

Están disponibles varios isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos para HER2 radioconjugados. Ejemplos incluyen At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radiactivos de Lu.

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

Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico puede prepararse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos.

En el presente documento se contemplan otros inmunoconjugados. Por ejemplo, el anticuerpo puede ligarse a uno de varios polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede estar atrapado 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 de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, albúmina microesferas, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>a</sup> edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Los anticuerpos desvelados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describen en Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); las patentes de EE.UU. n° 4.485.045 y 4.544.545; y el documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se desvelan en la patente de EE.UU. n° 5.013.556.

Liposomas particularmente útiles pueden generarse por el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición de lípido que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido dando liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse con los liposomas como se describe en Martin y col., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982), mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está opcionalmente contenido dentro del liposoma. Véase Gabizon y col., J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989).

### III. Procedimientos de diagnóstico

En un primer aspecto, la invención en el presente documento proporciona un procedimiento de selección de una terapia para un paciente con un tipo de cáncer (por ejemplo, cáncer de ovario) que puede responder a un inhibidor de la dimerización de HER2 (por ejemplo, pertuzumab) que comprende determinar la expresión de HER3 en una muestra de cáncer del paciente y seleccionar un inhibidor de la dimerización de HER2 como terapia si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel inferior al percentil 25 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento de selección de una terapia para un paciente con un tipo de cáncer (por ejemplo, cáncer de ovario) que puede responder a un agente quimioterapéutico que comprende determinar la expresión de HER3 en una muestra de cáncer del paciente y seleccionar un agente quimioterapéutico (por ejemplo, gemcitabina) como terapia si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel superior al percentil 75 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

El nivel de expresión en percentil puede determinarse esencialmente contemporáneamente con la medición de la expresión de HER3, o puede haberse determinado previamente.

Antes de los procedimientos terapéuticos descritos a continuación, el (los) nivel(es) de expresión de HER3 se evalúa/n en el cáncer del paciente. Generalmente, una muestra biológica se obtiene del paciente en necesidad de terapia, muestra que se somete a uno o más ensayos de diagnóstico, normalmente al menos un ensayo de diagnóstico *in vitro* (IVD). Sin embargo, otras formas de evaluar HER3, tal como diagnóstico *in vivo*, se contemplan expresamente en el presente documento. La muestra biológica es normalmente una muestra tumoral,

preferentemente de muestra tumoral de cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de mama metastásico (CMM), cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), cáncer de próstata o cáncer colorrectal.

- 5 La muestra biológica en el presente documento puede ser una muestra fijada, por ejemplo, una muestra fijada en formalina, incorporada en parafina (FFPE), o una muestra congelada.

10 Diversos procedimientos de determinación de la expresión de ARNm o proteína incluyen, pero no se limitan a, pauta de expresión génica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que incluye PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR), análisis de micromatrices, análisis en serie de la expresión génica (SAGE), MassARRAY, análisis de expresión génica por secuenciación distintiva masivamente paralela (MPSS), proteómica, inmunohistoquímica (IHC), etc. Preferentemente se cuantifica ARNm. Tal análisis de ARNm se realiza preferentemente usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o por análisis de micromatrices. Si se emplea PCR, una forma preferida de PCR es PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). El ensayo de qRT-PCR preferido es como se describe en el Ejemplo 1 más adelante.

15 Las etapas de un protocolo representativo para la pauta de expresión génica usando tejidos incorporados en parafina fijados como fuente de ARN, que incluyen aislamiento de ARNm, purificación, extensión con cebadores y amplificación, se facilitan en diversos artículos de revistas publicados (por ejemplo: Godfrey y col., J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 (2000); Specht y col., Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001)). Brevemente, un procedimiento representativo empieza con cortar secciones de aproximadamente 10 microgramos de espesor de muestras de tejido tumoral incorporadas en parafina. Entonces, el ARN se extrae, y se eliminan la proteína y el ADN. Después del análisis de la concentración de ARN pueden incluirse etapas de reparación y/o amplificación de ARN, si fuera necesario, y el ARN se transcribe de forma inversa usando promotores específicos de genes seguido de PCR. Finalmente, los datos se analizan para identificar la(s) mejor(es) opción (opciones) de tratamiento disponible(s) para el paciente basándose en el patrón de expresión génica característico identificado en la muestra tumoral examinada.

20 Diversos procedimientos a modo de ejemplo para determinar la expresión génica se describirán ahora en más detalle.

30 *(i) Pauta de expresión génica*

En general, los procedimientos de pauta de expresión génica pueden dividirse en dos grandes grupos: procedimientos basados en análisis de hibridación de polinucleótidos y procedimientos basados en secuenciación de polinucleótidos. Los procedimientos más comúnmente usados conocidos en la técnica para la cuantificación de la expresión de ARNm en una muestra incluyen transferencia Northern e hibridación *in situ* (Parker & Bames, Methods in Molecular Biology 106:247-283 (1999)); ensayos de protección de RNasa (Hod, Biotechniques 13:852-854 (1992)); y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Weis y col., Trends in Genetics 8:263-264 (1992)). Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, que incluyen dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Procedimientos representativos para el análisis de expresión génica basada en secuenciación incluyen análisis en serie de la expresión génica (SAGE) y análisis de expresión génica por secuenciación distintiva masivamente paralela (MPSS).

45 *(ii) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

De las técnicas enumeradas anteriormente, un procedimiento cuantitativo sensible y flexible es la PCR, que puede usarse para comparar niveles de ARNm en diferentes poblaciones de muestras, en tejidos normales y tumorales, con o sin tratamiento con fármaco, para caracterizar patrones de expresión génica, para discriminar entre ARNm estrechamente relacionados y para analizar estructura de ARN.

50 La primera etapa es el aislamiento de ARNm de una muestra diana. El material de partida es normalmente ARN total aislado de tumores humanos o líneas celulares tumorales, y tejidos normales o líneas celulares correspondientes, respectivamente. Así, el ARN puede aislarse de varios tumores primarios que incluyen tumor de mama, pulmón, colon, próstata, cerebro, hígado, riñón, páncreas, bazo, timo, testículos, ovario, útero, etc., o líneas celulares tumorales, con ADN reunido de donantes sanos. Si la fuente de ARNm es un tumor primario, el ARNm puede extraerse, por ejemplo, de muestras de tejido congeladas o incorporadas en parafina y fijadas (por ejemplo, fijadas en formalina) archivadas. Los procedimientos generales para la extracción de ARNm son muy conocidos en la técnica y se desvelan en libros de texto convencionales de biología molecular, que incluyen Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons (1997). Los procedimientos para la extracción de ARN de tejidos incorporados en parafina se desvelan, por ejemplo, en Rupp y Locker, Lab Invest. 56:A67 (1987), y De Andrés y col., BioTechniques 18:42044 (1995). En particular, el aislamiento de ARN puede realizarse usando kit de purificación, conjunto de tampón y proteasa de fabricantes comerciales, tales como Qiagen, según las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, el ARN total de células en cultivo puede aislarse usando mini-columnas RNeasy de Qiagen. Otros kits de aislamiento de ARN comercialmente disponibles incluyen ADN completo MASTERPURE® y kit de purificación de ARN (EPICENTRE®, Madison, Wis.), y kit de aislamiento de parafina en bloque de parafina (Ambion, Inc.). El ARN total de muestras de tejido puede aislarse usando ARN Stat-60 (prueba de Tel). El ARN

preparado a partir de tumor puede aislarse, por ejemplo, por centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio.

5 Como el ARN no puede servir de molde para la PCR, la primera etapa en la pauta de expresión génica por PCR es la transcripción inversa del molde de ARN en ADNc, seguido de su amplificación exponencial en una reacción de PCR. Las dos transcriptasas inversas más comúnmente usadas son transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) y transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). La etapa de transcripción inversa se realiza normalmente usando cebadores específicos, hexámeros al azar o cebadores de oligo-dT, dependiendo de las circunstancias y el objetivo de la pauta de expresión. Por ejemplo, el ARN extraído  
10 puede transcribirse de forma inversa usando un kit de PCR de ADN GENEAMP™ (Perkin Elmer, Calif., EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc derivado puede entonces usarse como molde en la posterior reacción de PCR. Aunque la etapa de PCR puede usar varias ADN polimerasas dependientes de ADN termoestables, normalmente emplea la Taq ADN polimerasa, que tiene una actividad de nucleasa de 5'-3', pero carece de una actividad de endonucleasa de 3'-5' de corrección. Así, la PCR TAQMAN® normalmente utiliza la actividad de 5'-nucleasa de Taq o Tth polimerasa para hidrolizar una sonda de hibridación unida a su amplicón diana, pero puede usarse cualquier enzima con actividad de 5'-nucleasa equivalente. Se usan dos cebadores de oligonucleótidos para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Un tercer oligonucleótido, o sonda, se diseña para detectar la secuencia de nucleótidos localizada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no es extensible por la enzima Taq ADN polimerasa, y se marca con un colorante fluorescente indicador y un colorante fluorescente extintor. Cualquier emisión inducida por láser del colorante indicador se inactiva por el colorante extintor cuando los dos colorantes se localizan próximos como están sobre la sonda. Durante la reacción de amplificación, la enzima Taq ADN polimerasa escinde la sonda de una manera dependiente del molde. Los fragmentos de la sonda resultantes se disocian en disolución, y la señal del colorante indicador liberado está libre del efecto extintor del segundo fluoróforo. Se libera una molécula de colorante para cada nueva molécula sintetizada, y la detección del colorante indicador sin extinguir proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos.  
25

La PCR TAQMAN® puede realizarse usando equipo comercialmente disponible tal como, por ejemplo, el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7700® (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, Calif., EE.UU.), o Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). En una realización preferida, el procedimiento de 5'-nucleasa se ejecuta en un dispositivo de PCR cuantitativa en tiempo real tal como el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7700®. El sistema consiste en un ciclador térmico, láser, dispositivo de carga acoplada (CCD), cámara y ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos sobre un ciclador térmico. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por láser se recoge en tiempo real mediante los cables de fibra óptica para los 96 pocillos, y se detecta en el CCD. El sistema incluye software para hacer funcionar el instrumento y para analizar los datos.  
30  
35

Los datos del ensayo de 5'-nucleasa se expresan inicialmente como Ct, o el ciclo umbral. Como se trata anteriormente, los valores de fluorescencia se registran durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado en ese momento en la reacción de amplificación. El momento en el que la señal fluorescente se registra primero como estadísticamente significativa es el ciclo umbral (Ct).  
40

Para minimizar los errores y el efecto de la variación de muestra a muestra, la PCR se realiza normalmente usando un patrón interno. El patrón interno ideal se expresa a un nivel constante entre diferentes tejidos, y no está afectado por el tratamiento experimental. Los ARN más frecuentemente usados para normalizar patrones de expresión génica son ARNm para los genes de mantenimiento gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y P-actina.  
45

Una variación más reciente de la técnica de PCR es PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR), que mide la acumulación de producto de PCR mediante una sonda fluorogénica doblemente marcada (es decir, sonda TAQMAN®). La PCR en tiempo real es compatible tanto con la PCR competitiva cuantitativa, si el competidor interno para cada secuencia diana se usa para la normalización, como con la PCR comparativa cuantitativa usando un gen de normalización contenido dentro de la muestra, o un gen de mantenimiento para PCR. Para más detalles véase, por ejemplo, Held y col., *Genome Research* 6:986-994 (1996).  
50

Las etapas de un protocolo representativo para perfilar la expresión génica usando tejidos incorporados en parafina fijados como fuente de ARN, que incluye aislamiento de ARNm, purificación, extensión con cebadores y amplificación, se facilitan en diversos artículos de revistas publicados (por ejemplo: Godfrey y col., *J. Molec. Diagnostics* 2: 84-91 (2000); Specht y col., *Am. J. Pathol.* 158: 419-29 (2001)). Brevemente, un procedimiento representativo empieza cortando secciones de aproximadamente 10 microgramos de espesor de muestras de tejido tumoral incorporadas en parafina. Entonces, el ARN se extrae y se eliminan la proteína y el ADN. Después del análisis de la concentración de ARN pueden incluirse etapas de reparación y/o amplificación de ARN, si fuera necesario, y el ARN se transcribe de forma inversa usando promotores específicos de genes seguido de PCR.  
55  
60

Según un aspecto de la presente invención, los cebadores y sondas de PCR se diseñan basándose en las secuencias de intrones presentes en el gen que va a amplificarse. En esta realización, la primera etapa en el diseño del cebador/sonda es la delineación de secuencias de intrones dentro de los genes. Esto puede hacerse por software públicamente disponible, tal como el software DNA BLAT desarrollado por Kent, W., *Genome Res.*  
65

12(4):656-64 (2002), o por el software BLAST que incluye sus variaciones. Etapas posteriores siguen procedimientos bien establecidos del diseño de cebadores y sondas de PCR.

5 Con el fin de evitar señales no específicas es importante enmascarar secuencias repetitivas dentro de los intrones cuando se diseñan los cebadores y sondas. Esto puede realizarse fácilmente usando el programa Repeat Masker disponible en línea del Colegio de Medicina Baylor, que criba secuencias de ADN contra una biblioteca de elementos repetitivos y devuelve una secuencia de búsqueda en la que los elementos repetitivos están enmascarados. Las secuencias de intrones enmascaradas pueden entonces usarse para diseñar secuencias de cebadores y de sondas usando cualquier paquete de diseño de cebadores/sondas comercialmente o de otro modo públicamente disponible, tal como Primer Express (Applied Biosystems); MGB assay-by-design (Applied Biosystems); Primer3 (Rozen y Skaletsky (2000) Primer3 en la WWW para usuarios generales y para programadores biólogos. En: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, N.J., pág. 365-386).

15 Factores considerados en el diseño de cebadores de PCR incluyen longitud del cebador, temperatura de fusión ( $T_m$ ) y contenido de G/C, especificidad, secuencias complementarias del cebador y secuencia del extremo 3'. En general, los cebadores de PCR óptimos tienen generalmente 17-30 bases de longitud y contienen aproximadamente el 20-80 %, tal como, por ejemplo, aproximadamente el 50-60 % de bases de G+C. Normalmente se prefieren  $T_m$  entre 50 y 80 °C, por ejemplo, aproximadamente 50 a 70 °C.

20 Para pautas adicionales para el diseño de cebadores y sondas de PCR véase, por ejemplo, Dieffenbach y col., "General Concepts for PCR Primer Design" en PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1995, pág. 133-155; Innis y Gelfand, "Optimization of PCRs" en PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, CRC Press, Londres, 1994, pág. 5-11; y Plasterer, T. N. Primerselect: Primer and probe design. Methods Mol. Biol. 70:520- 527 (1997).

25 Las condiciones, cebadores, sondas y referencia interna (G6PDH) preferidos son como se describen en el Ejemplo 1 más adelante.

### 30 (iii) Micromatrices

También puede identificarse expresión génica diferencial, o confirmarse usando la técnica de micromatrices. Así, el perfil de expresión de genes asociados al cáncer de mama puede medirse en tanto tejido tumoral fresco como incorporado en parafina usando tecnología de micromatrices. En este procedimiento, las secuencias de polinucleótidos de interés (incluyendo ADNc y oligonucleótidos) se siembran en placa, o se disponen en matrices, sobre un sustrato de microchip. Las secuencias dispuestas en matrices se hibridan entonces con sondas de ADN específicas de células o tejidos de interés. Precisamente como en el procedimiento de PCR, la fuente de ARNm normalmente es ARN total aislado de tumores o líneas celulares tumorales humanos, y tejidos o líneas celulares normales correspondientes. Así, el ARN puede aislarse de varios tumores o líneas celulares tumorales primarios. Si la fuente de ARNm es un tumor primario, el ARNm puede extraerse, por ejemplo, de muestras de tejido congeladas o incorporadas en parafina y fijadas (por ejemplo, fijadas en formalina) archivadas que se preparan rutinariamente y se conservan en la práctica clínica cotidiana.

45 En una realización específica de la técnica de micromatrices, los insertos amplificados por PCR de clones de ADNc se aplican a un sustrato en una matriz densa. Preferentemente, al menos 10.000 secuencias de nucleótidos se aplican al sustrato. Los genes dispuestos en micromatrices, inmovilizados sobre el microchip a 10.000 elementos cada una, son adecuados para hibridación bajo condiciones rigurosas. Sondas de ADNc fluorescentemente marcadas pueden generarse mediante incorporación de nucleótidos fluorescentes por transcripción inversa de ARN extraído de tejidos de interés. Las sondas de ADNc marcadas aplicadas al chip se hibridan con especificidad por cada mancha de ADN sobre la matriz. Después de lavado riguroso para eliminar las sondas no específicamente unidas, el chip se barre por microscopía láser confocal o por otro procedimiento de detección, tal como una cámara de CCD. La cuantificación de la hibridación de cada elemento dispuesto en matriz permite la evaluación de la abundancia de ARNm correspondiente. Con fluorescencia de color dual, sondas de ADNc marcadas por separado generadas a partir de dos fuentes de ARN se hibridan por parejas a la matriz. La abundancia relativa de los transcritos de las dos fuentes correspondientes a cada gen especificado se determina así simultáneamente. La escala miniaturizada de la hibridación proporciona una evaluación conveniente y rápida del patrón de expresión para grandes números de genes. Se ha mostrado que tales procedimientos tienen la sensibilidad requerida para detectar transcritos raros, que se expresan a una bajas copias por célula, y para detectar reproduciblemente al menos aproximadamente diferencias de dos veces en los niveles de expresión (Schna y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(2):106-149 (1996)). Los análisis de micromatrices pueden realizarse por equipo comercialmente disponible, siguiendo los protocolos del fabricante, tales como usando la tecnología Affymetrix GENCHIP™, o la tecnología de micromatrices Incyte.

65 El desarrollo de procedimientos de micromatrices para el análisis a gran escala de la expresión génica hace posible buscar sistemáticamente marcadores moleculares de clasificación de cáncer y predicción de desenlaces en varios tipos de tumores.

*(iv) Análisis en serie de la expresión génica (SAGE)*

El análisis en serie de la expresión génica (SAGE) es un procedimiento que permite el análisis simultáneo y cuantitativo de un gran número de transcritos de genes, sin la necesidad de proporcionar una sonda de hibridación individual para cada transcrito. Primero se genera una marca de secuencia corta (aproximadamente 10-14 pb) que contiene información suficiente para identificar únicamente un transcrito, a condición de que la marca se obtenga de una única posición dentro de cada transcrito. Entonces, se enlazan juntos muchos transcritos para formar largas moléculas en serie, que pueden secuenciarse, revelando la identidad de las múltiples marcas simultáneamente. El patrón de expresión de cualquier población de transcritos puede evaluarse cuantitativamente determinando la abundancia de marcas individuales, e identificando el gen correspondiente a cada marca. Para más detalles véase, por ejemplo, Velculescu y col., *Science* 270:484-487 (1995); y Velculescu y col., *Cell* 88:243-51 (1997).

*(v) Tecnología MassARRAY*

La tecnología MassARRAY (Sequenom, San Diego, Calif.) es un procedimiento de alto rendimiento automatizado de análisis de la expresión génica usando espectrometría de masas (EM) para la detección. Según este procedimiento, tras el aislamiento de ARN, transcripción inversa y amplificación por PCR, los ADNc se someten a extensión con cebadores. Los productos de la extensión con cebadores derivados de ADNc se purifican, y se dispensan sobre una matriz de chip que está pre-cargada con los componentes necesarios para la preparación de muestras de EM MALDI-TOF. Los diversos ADNc presentes en la reacción se cuantifican analizando las áreas de los picos en el espectro de masas obtenido.

*(vi) Análisis de expresión génica por secuenciación distintiva masivamente paralela (MPSS)*

Este procedimiento, descrito por Brenner y col., *Nature Biotechnology* 18:630-634 (2000), es un enfoque de secuenciación que combina secuenciación distintiva no basada en geles con clonación *in vitro* de millones de moldes sobre microperlas separadas de 5 microgramos de diámetro. Primero, una biblioteca de microperlas de moldes de ADN se construye por clonación *in vitro*. Esto va seguido del ensamblaje de una matriz plana de las microperlas que contienen el molde en una celda de flujo a una alta densidad (normalmente superior a  $3 \times 10^6$  microperlas/cm<sup>2</sup>). Los extremos libres de los moldes clonados sobre cada microperla se analizan simultáneamente, usando un procedimiento de secuenciación distintiva basada en fluorescencia que no requiere la separación de fragmentos de ADN. Se ha mostrado que este procedimiento proporciona simultáneamente y con exactitud, en una única operación, cientos de miles de secuencias distintivas de genes de una biblioteca de ADNc de levadura.

*(vii) Inmunohistoquímica*

Los procedimientos inmunohistoquímicos también son adecuados para detectar niveles de expresión de los marcadores de pronóstico de la presente invención. Así, los anticuerpos o antisueros, preferentemente antisueros policlonales, y lo más preferentemente anticuerpos monoclonales específicos para cada marcador, se usan para detectar la expresión. Los anticuerpos pueden detectarse por marcado directo de los propios anticuerpos, por ejemplo, con marcas radiactivas, marcas fluorescentes, marcas de hapteno tales como biotina, o una enzima tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Alternativamente, el anticuerpo primario sin marcar se usa conjuntamente con un anticuerpo secundario marcado, que comprende antisueros, antisueros policlonales o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario. Los protocolos de inmunohistoquímica y kits son muy conocidos en la técnica y están comercialmente disponibles.

*(viii) Proteómica*

El término "proteoma" se define como la totalidad de las proteínas presentes en una muestra (por ejemplo, tejido, organismo o cultivo celular) en un cierto momento de tiempo. La proteómica incluye, entre otras cosas, estudio de los cambios globales de la expresión de proteínas en una muestra (también denominado "proteómica de expresión"). La proteómica normalmente incluye las siguientes etapas: (1) separación de proteínas individuales en una muestra por electroforesis en gel 2-D (PAGE 2-D); (2) identificación de las proteínas individuales recuperadas del gel, por ejemplo, por espectrometría de masas o secuenciación del extremo N, y (3) análisis de los datos usando bioinformática. Los procedimientos de proteómica son suplementos valiosos a otros procedimientos de pauta de expresión génica y pueden usarse, solos o en combinación con otros procedimientos, para detectar los productos de los marcadores de pronóstico de la presente invención.

*(ix) Descripción general del aislamiento, la purificación y la amplificación de ARNm*

Las etapas de un protocolo representativo para perfilar la expresión génica usando tejidos incorporados en parafina fijados como fuente de ARN, que incluye aislamiento de ARNm, purificación, extensión con cebadores y amplificación, se facilitan en diversos artículos revistas publicados (por ejemplo: Godfrey y col., *J. Molec. Diagnostics* 2: 84-91 (2000); Specht y col., *Am. J. Pathol.* 158: 419-29 (2001)). Brevemente, un procedimiento representativo empieza con cortar secciones de aproximadamente 10 microgramos de espesor de muestras de tejido tumoral incorporadas en parafina. Entonces, el ARN se extrae, y se eliminan la proteína y el ADN. Después del análisis de la

concentración de ARN pueden incluirse etapas de reparación y/o amplificación de ARN, si fuera necesario, y el ARN se transcribe de forma inversa usando promotores específicos de genes seguido de PCR. Finalmente, los datos se analizan para identificar la(s) mejor(es) opción (opciones) de tratamiento disponible(s) para el paciente basándose en el patrón de expresión génica característico identificado en la muestra tumoral examinada.

En una realización, el paciente tratado en el presente documento, aparte de expresar HER3 a un cierto nivel, el paciente no expresa adicionalmente en exceso HER2. La expresión de HER2 en exceso puede analizarse por IHC, por ejemplo, usando HERCEPTEST® (Dako). Las secciones de tejido incorporadas en parafina de una biopsia de tumor pueden someterse al ensayo de IHC y corresponderse con criterios de intensidad de tinción de la proteína HER2 del siguiente modo:

Puntuación 0 no se observa tinción o se observa tinción de la membrana en menos del 10 % de las células tumorales.

Puntuación 1+ se detecta una tinción de membrana débil/apenas perceptible en más del 10 % de las células tumorales. Las células solo se tiñen en parte de su membrana.

Puntuación 2+ se observa una tinción de membrana completa de débil a moderada en más del 10 % de las células tumorales.

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

Aquellos tumores con puntuaciones 0 ó 1+ para la evaluación de la expresión en exceso de HER2 pueden caracterizarse como que no expresan en exceso HER2, mientras que aquellos tumores con puntuaciones 2+ o 3+ pueden caracterizarse como que expresan en exceso HER2.

Los tumores que expresan HER2 en exceso pueden evaluarse por puntuaciones inmunohistoquímicas correspondientes al número de copias de moléculas de 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 expresión en exceso de HER2 al nivel 3+, que conduce a activación independiente del ligando de la tirosina cinasa (Hudziak y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7159-7163 (1987)) se producen en aproximadamente el 30 % de los cánceres de mama, y en estos pacientes, la supervivencia libre de recaída y supervivencia global son reducidas (Slamon y col., Science, 244:707-712 (1989); Slamon y col., Science, 235:177-182 (1987)). Alternativamente, o adicionalmente, ensayos FISH tales como INFORM™ (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION™ (Vysis, Illinois) pueden llevarse a cabo en tejido tumoral incorporado en parafina fijado en formalina para determinar el grado (si lo hay) de amplificación de HER2 en el tumor.

La expresión de HER3 y/o de HER2 también puede evaluarse usando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo, administrando una molécula (tal como un anticuerpo) que se une a la molécula que va a detectarse y se marca con una marca detectable (por ejemplo, un isótopo radiactivo) y barriendo externamente el paciente para la localización de la marca.

#### IV. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas del inhibidor de la dimerización de HER2, o agente quimioterapéutico usado según la presente invención, se preparan para almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado 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 disoluciones acuosas. También se contemplan cristales de anticuerpos (véase la solicitud de patente de EE.UU. 2002/0136719). Vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Formulaciones de anticuerpos liofilizadas se describen en el documento WO 97/04801.

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

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está tratándose, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Diversos fármacos que pueden combinarse con el inhibidor de la dimerización de HER2 se describen en la sección de tratamiento más adelante. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparada, 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 de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales 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, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. n° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de  $\gamma$ -etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que van a usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Por consiguiente, se proporciona un procedimiento de fabricación de un inhibidor de la dimerización de HER2 (tal como pertuzumab), o una composición farmacéutica del mismo, procedimiento que comprende combinar en un envase el inhibidor o composición farmacéutica y una etiqueta que establece que el inhibidor o composición farmacéutica se indica para tratar un paciente con un tipo de cáncer (por ejemplo, cáncer de ovario) que puede responder al inhibidor, en el que el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel inferior al percentil 25 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

Además, se proporciona un procedimiento de fabricación de un agente quimioterapéutico (tal como gemcitabina) o una composición farmacéutica del mismo, en el que el procedimiento comprende combinar en un envase el agente quimioterapéutico o composición farmacéutica y una etiqueta que establece que el agente quimioterapéutico o composición farmacéutica se indica para tratar un paciente con un tipo de cáncer (ejemplificado por cáncer de ovario), en el que el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel superior al percentil 75 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

## V. Tratamiento con inhibidores de HER

La invención en el presente documento se refiere a tratar un paciente con un tipo cáncer que puede responder a un inhibidor de la dimerización de HER2, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor al paciente, en el que el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel inferior al percentil 25 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

En una realización particularmente preferida, la invención se refiere a tratar un paciente con cáncer de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de pertuzumab al paciente, en el que el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel inferior al percentil 25 para la expresión de HER3 en cáncer de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de selección de una terapia para un paciente con un tipo de cáncer que puede responder a un agente quimioterapéutico que comprende determinar la expresión de HER3 en una muestra de cáncer del paciente y seleccionar un agente quimioterapéutico como terapia si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel superior al percentil 75 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer. En esta realización, preferentemente el tipo de cáncer es cáncer de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio, que incluye cáncer de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio resistente a platino, además de cáncer de ovario avanzado, resistente al tratamiento y/o recurrente. El agente quimioterapéutico es preferiblemente un antimetabolito, tal como gemcitabina. Así, en esta realización, HER3 alto se correlaciona con respuesta mejorada a terapia con un agente quimioterapéutico, tal como gemcitabina.

Ejemplos de diversos tipos de cánceres que pueden tratarse con un inhibidor de HER o inhibidor de la dimerización de HER se enumera en la sección de definiciones anterior. Los tipos de cánceres preferidos incluyen cáncer de ovario; cáncer peritoneal; cáncer de las trompas de Falopio; cáncer de mama, que incluye cáncer de mama metastásico (CMM); cáncer de pulmón, que incluye cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP); cáncer de próstata; y cáncer colorrectal. En una realización, el cáncer que se trata es cáncer avanzado, resistente al tratamiento, recurrente, resistente a quimioterapia y/o resistente a platino.

La terapia con el inhibidor de la dimerización de HER2 y/o agente quimioterapéutico prolonga preferentemente la supervivencia, que incluye supervivencia libre de progresión (SLP) y/o supervivencia global (SG). En una realización, la terapia con el inhibidor de HER o inhibidor de la dimerización de HER prolonga la supervivencia al menos aproximadamente el 20 % más que la supervivencia lograda administrando un agente antitumoral autorizado, o tratamiento de referencia, para el cáncer que está tratándose.

En la realización preferida, el procedimiento implica tratar un paciente con cáncer de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio. El paciente puede tener cáncer de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio avanzado, resistente al tratamiento, recurrente, resistente a quimioterapia y/o resistente a platino. La administración de pertuzumab al paciente puede prolongar, por ejemplo, la supervivencia al menos aproximadamente el 20 % más que la supervivencia lograda administrando topotecan o doxorubicina liposómica a un paciente tal.

El inhibidor de la dimerización de HER2 y/o agente quimioterapéutico se administra a un paciente humano de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalaciones. Se prefiere la administración intravenosa del anticuerpo.

Para la prevención o tratamiento de cáncer, la dosis de inhibidor de la dimerización de HER2 y/o agente quimioterapéutico dependerá del tipo de cáncer que va a tratarse, como se ha definido anteriormente, la gravedad y evolución del cáncer, si el anticuerpo se administra o no para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al fármaco, y el criterio del médico adjunto.

En una realización se administra una dosis de inhibidor fija. La dosis fija puede administrarse adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Si se administra un dosis fija, preferentemente está en el intervalo de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 2000 mg del inhibidor. Por ejemplo, la dosis fija puede ser aproximadamente 420 mg, aproximadamente 525 mg, aproximadamente 840 mg, o aproximadamente 1050 mg del inhibidor, tal como pertuzumab.

Si 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 preferentemente aproximadamente cada 3 semanas. La dosis fijada puede continuar administrándose, por ejemplo, hasta que la progresión de la enfermedad, acontecimiento adverso, u otro momento como se ha determinado por el médico. Por ejemplo, pueden administrarse de aproximadamente dos, tres, o cuatro, hasta aproximadamente 17 o más dosis fijas.

En una realización se administran una o más dosis de carga del anticuerpo, seguido de una o más dosis de mantenimiento del anticuerpo. En otra realización se administran una pluralidad de las mismas dosis al paciente.

Según una realización preferida de la invención se administra una dosis fija de inhibidor de la dimerización de HER2 (por ejemplo, pertuzumab) de aproximadamente 840 mg (dosis de carga), seguido de una o más dosis de aproximadamente 420 mg (dosis de mantenimiento) del anticuerpo. Las dosis de mantenimiento se administran preferentemente aproximadamente cada 3 semanas, durante un total de al menos dos dosis, hasta 17 o más dosis.

Según otra realización preferida de la invención se administran una o más dosis fijas de aproximadamente 1050 mg del inhibidor de la dimerización de HER2 (por ejemplo, pertuzumab), por ejemplo, cada 3 semanas. Según esta realización, una, dos o más de las dosis fijas se administran, por ejemplo, durante hasta un año (17 ciclos), y más según se desee.

En otra realización, una dosis fija de aproximadamente 1050 mg del inhibidor de la dimerización de HER (por ejemplo, pertuzumab) se administra 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 según esta realización.

Aunque el inhibidor de la dimerización de HER2 o agente quimioterapéutico puede administrarse como un agente antitumoral individual, el paciente se trata opcionalmente con una combinación del inhibidor (o agente quimioterapéutico), y uno o más agentes quimioterapéuticos (adicionales). Agentes quimioterapéuticos a modo de ejemplo en el presente documento incluyen: gemcitabina, carboplatino, paclitaxel, docetaxel, topotecan y/o doxorubicina liposómica. Preferentemente, al menos uno de los agentes quimioterapéuticos es un agente

quimioterapéutico antimetabolito tal como gemcitabina. La administración combinada incluye coadministración o administración simultánea, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferentemente hay un periodo de tiempo mientras que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Así, el agente quimioterapéutico antimetabolito puede administrarse antes de, o tras, la administración del inhibidor. En esta realización, el momento adecuado entre al menos una administración del agente quimioterapéutico antimetabolito y al menos una administración del inhibidor es preferentemente aproximadamente 1 mes o menos, y lo más preferentemente aproximadamente 2 semanas o menos. Alternativamente, el agente quimioterapéutico antimetabolito y el inhibidor se administran simultáneamente al paciente, en una formulación única o formulaciones separadas. El tratamiento con la combinación del agente quimioterapéutico (por ejemplo, agente quimioterapéutico antimetabolito tal como gemcitabina) y el inhibidor (por ejemplo, pertuzumab) puede producir un beneficio terapéutico sinérgico, o superior a aditivo, al paciente.

Agentes quimioterapéuticos particularmente deseados para combinar con el inhibidor, por ejemplo, para terapia de cáncer de ovario, incluyen: un agente quimioterapéutico antimetabolito tal como gemcitabina; un compuesto de platino tal como carboplatino; un toxoide tal como paclitaxel o docetaxel; topotecan; o doxorubicina liposómica.

Un agente quimioterapéutico antimetabolito, si se administra, se administra normalmente a dosificaciones conocidas para él, o opcionalmente reducidas debido a la acción combinada de los fármacos o efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico antimetabolito. La preparación y los programas de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse según instrucciones del fabricante o como se determine empíricamente por el médico habitual. Si el agente quimioterapéutico antimetabolito es gemcitabina, preferentemente se administra a una dosis entre aproximadamente 600 mg/m<sup>2</sup> y 1250 mg/m<sup>2</sup> (por ejemplo, aproximadamente 1000 mg/m<sup>2</sup>), por ejemplo, en los días 1 y 8 de un ciclo de 3 semanas.

Aparte del inhibidor y agente quimioterapéutico antimetabolito, otras pautas terapéuticas pueden combinarse con ésta. Por ejemplo, puede administrarse un segundo (tercero, cuarto, etc.) agente quimioterapéutico, en el que el segundo agente quimioterapéutico es tanto otro agente quimioterapéutico antimetabolito diferente, como 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, que incluye, doxorubicina liposómica), topotecan, pemetrexed, alcaloide de la vinca (tal como vinorelbina) y TLK 286. Pueden administrarse "mezclas" de diferentes agentes quimioterapéuticos.

Otros agentes terapéuticos que pueden combinarse con el inhibidor y/o agente quimioterapéutico incluyen uno cualquiera o más de: un segundo inhibidor de HER diferente, inhibidor de la dimerización de HER (por ejemplo, un anticuerpo para HER2 inhibidor del crecimiento tal como trastuzumab, o un anticuerpo para HER2 que induce la apoptosis de una célula que expresa en exceso HER2, tal como 7C2, 7F3 o variantes humanizadas del mismo); un anticuerpo dirigido contra un antígeno asociado a tumor diferente, tal como EGFR, HER3, HER4; compuesto antihormonal, por ejemplo, un compuesto antiestrógeno tal como tamoxifeno, o un inhibidor de aromatasas; un cardioprotector (para prevenir o reducir cualquier disfunción miocárdica asociada a la terapia); una citocina; un fármaco dirigido a EGFR (tal como TARCEVA®, IRESSA® o cetuximab); un agente antiangiogénico (especialmente bevacizumab comercializado por Genentech bajo la marca registrada AVASTIN™); un inhibidor de tirosina cinasas; un inhibidor de la COX (por ejemplo, un inhibidor de COX-1 o COX-2); fármaco antiinflamatorio no esteroideo, celecoxib (CELEBREX®); inhibidor de farnesiltransferasa (por ejemplo, Tipifarnib/ZARNESTRA® R115777 disponible de Johnson and Johnson o Lonafarnib SCH66336 disponible de Schering-Plough); anticuerpo que se une a la proteína oncofetal CA 125 tal como Oregovomab (MoAb B43,13); vacuna contra HER2 (tal como la vacuna HER2 AutoVac de Pharmexia, o la vacuna contra la proteína APC8024 de Dendreon, o la vacuna contra el péptido HER2 de GSK/Corixa); otra terapia dirigida a HER (por ejemplo, trastuzumab, cetuximab, ABX-EGF, EMD7200, gefitinib, erlotinib, CP724714, C11033, GW572016, IMC-11F8, TAK165, etc.); inhibidor de Raf y/o ras (véase, por ejemplo, documento WO 2003/86467); inyección de liposomas de HCl de doxorubicina (DOXIL®); inhibidor de la topoisomerasa I tal como topotecan; taxano; inhibidor dual de tirosina cinasas HER2 y EGFR tal como lapatinib/GW572016; TLK286 (TELCYTA®); EMD-7200; un medicamento que trata náuseas tal como un antagonista de serotonina, esteroide o benzodiazepina; un medicamento que previene o trata erupción cutánea o terapias de acné convencionales, que incluye antibiótico tópico u oral; un medicamento que trata o previene diarrea; un medicamento reductor de la temperatura corporal tal como acetaminofeno, difenhidramina o meperidina; factor de crecimiento hepatopoyético, etc.

Dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes anteriormente coadministrados son aquellas presentemente usadas y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente e inhibidor.

Además de las pautas terapéuticas anteriores, el paciente puede someterse a extirpación quirúrgica de células cancerosas y/o radioterapia.

Si el inhibidor es un anticuerpo, preferentemente el anticuerpo administrado es un anticuerpo desnudo. Sin embargo, el inhibidor administrado puede conjugarse con un agente citotóxico. Preferentemente, el inhibidor conjugado y/o

antígeno con el que se une es internalizado por la célula, produciendo elevada eficacia terapéutica del conjugado en la destrucción de la célula cancerosa a la que se une. En una realización preferida, el agente citotóxico se dirige a o interfiere con ácido nucleico en la célula cancerosa. Ejemplos de tales agentes citotóxicos incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

5 La presente solicitud contempla la administración del inhibidor 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.

10 Hay dos enfoques principales para conseguir el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células del paciente; *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, normalmente en el sitio en el que se requiere el anticuerpo. Para la administración *ex vivo*, las células del paciente se sacan, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente tanto directamente como, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.892.538 y 5.283.187). Hay varias técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere o no en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped previsto. Técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión de células, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio, etc. Un vector comúnmente usado para la administración *ex vivo* del gen es un retrovirus.

15 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 adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son, por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Chol). En algunas situaciones se desea proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que elija como diana las células diana, tal como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor sobre la célula diana, etc. Si se emplean liposomas, las proteínas que se unen a una proteína de la membrana de la superficie celular asociada a endocitosis pueden usarse para elegir como diana y/o para facilitar la captación, por ejemplo, proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en el ciclo, y proteínas que eligen como diana la localización intracelular y potencian la semivida intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor se describe, por ejemplo, por Wu y col., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987); y Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos de marcado de genes y de terapia génica actualmente conocidos véase Anderson y col., Science 256:808-813 (1992). Véase también el documento WO 93/25673 y las referencias citadas en su interior.

#### VI. Artículos de fabricación

40 En otra realización de la invención se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de las enfermedades o afecciones descritas anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden formarse de varios materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente conserva o contiene una composición que es eficaz para tratar la enfermedad o afección de elección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es el inhibidor de la dimerización de HER2, tal como pertuzumab, o agente quimioterapéutico, tal como gemcitabina.

50 El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón diluyente farmacéuticamente aceptable tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. El artículo de fabricación puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

55 Los kits y artículos de fabricación de la presente invención también incluyen información, por ejemplo, en forma de un prospecto o etiqueta, que indica que la composición se usa para tratar cáncer si el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel definido dependiendo del fármaco. El prospecto o etiqueta puede tomar cualquier forma, tal como papel o en medios electrónicos tales como un medio magnéticamente grabado (por ejemplo, disquete) o un CD-ROM. La etiqueta o prospecto también puede incluir otra información referente a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación en el kit o artículo de fabricación.

60 Generalmente, tal información ayuda a los pacientes y médicos en el uso de las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación encerradas eficazmente y de forma segura. Por ejemplo, la siguiente información 2 referente al inhibidor de la dimerización de HER2 o agente quimioterapéutico puede suministrarse en el prospecto: farmacocinética, farmacodinámica, estudios clínicos, parámetros de eficacia, indicaciones y uso, contraindicaciones, advertencias, precauciones, reacciones adversas, sobredosis, dosificación apropiada y administración, cómo se

suministra, condiciones de almacenamiento apropiadas, referencias e información de patentes.

En una realización específica de la invención se proporciona un artículo de fabricación que comprende, envasados juntos, una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de HER, o inhibidor de la dimerización de HER, en un vehículo farmacéuticamente aceptable y una etiqueta que establece que el inhibidor o composición farmacéutica se indica para tratar un paciente con un tipo de cáncer que puede responder a un inhibidor de la dimerización de HER2, en el que el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel inferior al percentil 25 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

En una realización opcional de este aspecto inventivo, el artículo de fabricación en el presente documento comprende además un recipiente que comprende un segundo medicamento, en el que el inhibidor de la dimerización de HER2 es un primer medicamento, y artículo que comprende además instrucciones en el prospecto para tratar al paciente con el segundo medicamento, en una cantidad eficaz. El segundo medicamento puede ser cualquiera de aquellos expuestos anteriormente, siendo un segundo medicamento a modo de ejemplo otro anticuerpo para HER2 o un agente quimioterapéutico.

En otro aspecto se proporciona un artículo de fabricación que comprende, envasados juntos, una composición farmacéutica que comprende un agente quimioterapéutico (tal como gemcitabina) en un vehículo farmacéuticamente aceptable y una etiqueta que establece que el agente quimioterapéutico o composición farmacéutica se indica para tratar un paciente con un tipo de cáncer, en el que el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel superior al percentil 75 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

El prospecto está sobre o asociado al recipiente. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden formarse de varios materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente conserva o contiene una composición que es eficaz para tratar el tipo de cáncer, puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es el inhibidor de la dimerización de HER2, o agente quimioterapéutico. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar cáncer en un sujeto elegible para el tratamiento con orientación específica referente a las cantidades de dosificación e intervalos de inhibidor y cualquier otro medicamento que se proporcione. El artículo de fabricación puede comprender además un recipiente adicional que comprende un tampón diluyente farmacéuticamente aceptable tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y/o disolución de dextrosa. El artículo de fabricación puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Muchos procedimientos experimentales alternativos conocidos en la técnica pueden sustituirse satisfactoriamente con aquellos específicamente descritos en el presente documento en la práctica de la presente invención, como se describe, por ejemplo, en muchos de los excelentes manuales y libros de texto disponibles en las áreas de tecnología relevantes para la presente invención (por ejemplo, Using Antibodies, A Laboratory Manual, editado por Harlow, E. y Lane, D., 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (por ejemplo, ISBN 0-87969-544-7); Roe B. A. y col., 1996, DNA Isolation and Sequencing (Essential Techniques Series), John Wiley & Sons (por ejemplo, ISBN 0-471-97324-0); Methods in Enzymology: Chimeric Genes and Proteins, 2000, ed. J. Abelson, M. Simon, S. Emr, J. Thomer. Academic Press; Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2001, 3ª edición, por Joseph Sambrook y Peter MacCallum (el antiguamente Maniatis Cloning manual) (por ejemplo, ISBN 0-87969-577-3); Current Protocols in Molecular Biology, Ed. Fred M. Ausubel y col., John Wiley & Sons (por ejemplo, ISBN 0-471-50338-X); Current Protocols in Protein Science, Ed. John E. Coligan, John Wiley & Sons (por ejemplo, ISBN 0-471-1 1184-8); y Methods in Enzymology: Guide to purification of proteins, 1990, vol. 182, Ed. Deutscher, M.P., Academic Press, Inc. (por ejemplo, ISBN 0-12-213585-7)), o como se describe en las muchas páginas web de universidades y comerciales dedicadas a describir procedimientos experimentales en biología molecular.

#### VIII. Depósito de materiales

Las siguientes líneas celulares de hibridoma se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

| Designación de anticuerpo | ATCC nº        | 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    |

Más detalles de la invención se ilustran por los siguientes ejemplos no limitantes.

**EJEMPLO 1****Pertuzumab y gemcitabina para terapia de cáncer de ovario, carcinoma peritoneal primario o carcinoma de las trompas de Falopio resistente a platino**

Este ejemplo proporciona los resultados de un ensayo clínico de fase III que evalúa la seguridad, tolerabilidad y eficacia de pertuzumab en combinación con gemcitabina en pacientes con cáncer de ovario, carcinoma peritoneal primario o carcinoma de las trompas de Falopio resistente a platino. 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 mediante MAP y P13 cinasa. Pertuzumab se une al sitio de interacción dímero-dímero, tiene un efecto importante sobre la función de HER2 como co-receptor, previene la dimerización de EGFR/HER2 y HER3/HER2 e inhibe múltiples rutas de señalización mediadas por HER.

El efecto de pertuzumab y gemcitabina sobre la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG) se evaluó en todos los pacientes, y en el subconjunto de pacientes cuyos tumores contuvieron marcadores que indicaron la activación de HER2. El diseño/esquema del estudio se muestra en la Fig. 9.

Pacientes que habían progresado mientras que recibían, o en el plazo de 6 meses de recibir, un ciclo de quimioterapia basado en platino fueron elegibles para este estudio. Los pacientes se aleatorizaron para recibir tanto gemcitabina en combinación con pertuzumab como gemcitabina en combinación con placebo. Los pacientes tratados en el presente documento incluyeron aquellos que no habían recibido un tratamiento de ciclo de rescate previo para enfermedad resistente a platino antes de la entrada en el estudio, y aquellos que habían recibido un ciclo anterior para enfermedad resistente a platino.

La gemcitabina se administró a 1000 mg/m<sup>2</sup> en los días 1 y 8 de cada ciclo de 21 días. La gemcitabina se infundió primero durante 30 minutos. Se permitieron reducciones de dosis para toxicidad. Placebo o pertuzumab se administraron en el día 1 del ciclo de 21 días. A los sujetos aleatorizados a recibir pertuzumab se les administró una dosis de carga inicial de 840 mg (ciclo 1) seguido de 420 mg en los ciclos 2 y siguientes. A los sujetos aleatorizados a recibir placebo se les administró placebo en el mismo volumen que se administró con el brazo de pertuzumab para el ciclo 1, ciclos 2 y siguientes. Los sujetos sin enfermedad progresiva recibieron tratamiento durante hasta 17 ciclos, o 1 año. Los pacientes tuvieron reducción de dosis de gemcitabina convencional y mantuvieron dosis como resultado de citopenias. Pertuzumab también se mantuvo para cualquier dosis de gemcitabina del día 1 mantenida. Las dosis posteriores fueron a las dosis reducidas y no aumentaron. Si la reducción de dosis o el mantenimiento de una dosis se requirió en más de 4 ocasiones, o si las dosis se mantuvieron durante más de 3 semanas, entonces la gemcitabina se interrumpió y con la autorización del médico práctico y el supervisor médico, el fármaco cegado continuó hasta la progresión de la enfermedad. Si las dosis de gemcitabina se mantuvieron en el día 8, entonces la dosis del día 8 de omitió y el posterior tratamiento comenzó con el siguiente ciclo (día 22 del ciclo previo).

La gemcitabina se mantuvo y la dosis se redujo como se recomienda por la siguiente tabla:

| Cifra absoluta de granulocitos (x10 <sup>9</sup> /l) |   | Cifra de plaquetas (x10 <sup>9</sup> /l) | % de dosis completa |
|--|---|--|---------------------|
| >1000  | Y | >100.000                                 | 100                 |
| 500-999  | O | 50.000-99.000                            | 75                  |
| <500   | O | <50.000                                  | Mantenimiento       |

Las dosis posteriores para cualquier paciente que requirió reducción de dosis fueron a las dosis reducidas. Si las dosis se mantuvieron durante más de 3 semanas como resultado de citopenias, se supuso que los pacientes tenían toxicidad inaceptable y se retiró la gemcitabina. Si no hubo otras toxicidades de grado III o IV adicionales, la continuación del fármaco cegado fue a criterio del médico y supervisor médico. La toxicidad hematológica de la gemcitabina se ha relacionado con la tasa de administración de dosis. La gemcitabina se administró durante 30 minutos independientemente de la dosis total. El uso de agentes estimulantes de colonias para citopenias de grado 2 por NCI-CTC se usó a criterio del médico práctico.

Se ofreció la opción de cruzar al agente individual pertuzumab. Una dosis de carga de 840 mg se administró en el siguiente ciclo adecuado con continuación de 420 mg con ciclos posteriores cada 21 días.

La respuesta se evaluó al final de los ciclos 2, 4, 6, 8, 12 y 17. La enfermedad medible se evaluó usando los criterios de evaluación de las respuestas para tumores sólidos (RECIST), por evaluación clínica y TAC o equivalente. La respuesta para sujetos con enfermedad evaluable se evaluó según cambios en CA-125 y pruebas clínicas y radiológicas de enfermedad. Las respuestas se confirmaron 4-8 semanas después de la documentación inicial de la respuesta. Se evaluaron las siguientes medidas de desenlace.

Criterio primario de valoración de eficacia

La supervivencia libre de progresión, como se ha determinado por la evaluación del investigador usando RECIST o cambios de CA-125, tras el inicio del tratamiento en estudio asignado de todos los sujetos en cada brazo.

5 La supervivencia libre de progresión, como se ha determinado por la evaluación del investigador usando RECIST o cambios de CA-125, tras el inicio del tratamiento en estudio asignado en cada brazo en los siguientes subgrupos:

- 10 Sujetos con marcadores detectables de activación de HER2.  
Sujetos sin marcadores detectables de activación de HER2.

Criterios secundarios de valoración de eficacia

- 15 Respuesta objetiva (RP o RC)  
Duración de la respuesta  
Tiempo de supervivencia  
Libertad de progresión a los 4 meses

20 Estos criterios de valoración se evaluaron en todos los sujetos en cada brazo y en los siguientes subgrupos:

- Sujetos con marcadores detectables de activación de HER2.  
Sujetos sin marcadores detectables de activación de HER2.

25 Para prevenir o tratar posibles náuseas y vómitos, el paciente se medió previamente con antagonistas de serotonina, esteroides y/o benzodiazepinas. Para prevenir o tratar posible erupción se usaron terapias de acné convencionales, que incluyen antibióticos tópicos y/u orales. Otras posibles medicaciones concomitantes fueron cualquier medicación de venta con receta o preparaciones de venta libre usadas por un sujeto en el intervalo que empieza 7 días antes del día 1 y que continúa hasta el último día del periodo de seguimiento. Los sujetos que experimentaron elevaciones de temperatura asociadas a la infusión >38,5 °C u otros síntomas asociados a la infusión se trataron sintomáticamente con acetaminofeno, difenhidramina o meperidina. Se administraron factores de crecimiento hepatopoyéticos no experimentales para citopenias de grado 2 por NCI-CTC.

35 Las muestras de tejido incorporado en parafina fijado en formalina (FFPET) obtenidas de los pacientes en este ensayo clínico se analizaron para EGFR, HER2, HER3, dos ligandos de HER (anfiregulina y betacelulina) y G6PDH (un gen de mantenimiento) por qRT-PCR. El ensayo de qRT-PCR se realizó por TARGOS Molecular Pathology GmbH (Kassel, Alemania) usando kit de lotes de laboratorio de Roche Diagnostic. El flujo de trabajo y análisis para realizar el ensayo de qRT-PCR en las muestras clínicas se representan en las Fig. 27 y 28 en el presente documento.

40 El análisis de ARNm de EGFR, HER2, HER3, anfiregulina y betacelulina se realizó por duplicado. Para permitir el análisis cuantitativo de datos también se analizó G6PDH como referencia interna. El cebador y las sondas se diseñaron para amplificar solo ARNm, no ADN. La qRT-PCR se realizó por separado para cada marcador y G6PDH como un procedimiento de dos etapas.

45 En la primera etapa, el ADNc se transcribió de forma inversa a partir de 5 µl de ARN total usando transcriptasa inversa AMV y cebado específico para cada marcador y G6PDH. El perfil de temperatura fue 10 min/25 °C para hibridación, 60 min/42 °C para transcripción inversa y 5 min/94 °C para la inactivación de enzimas.

50 En la segunda etapa, un fragmento de 100-120 pb de marcador y ARNm de G6PDH se amplificaron a partir de 5 µl de ADNc usando el instrumento LIGHTCYCLER® (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Los amplicones se detectaron por fluorescencia usando pares específicos de sondas de hibridación marcadas (principio de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia). Todos los reactivos usados para qRT-PCR fueron de Roche Applied Science, Mannheim, Alemania. El perfil de temperatura fue 10 min/95 °C para la desnaturalización inicial y 45 ciclos de (10 s/62 °C para la hibridación, 9 s/72 °C para la extensión, 10 s/95 °C para la desnaturalización). Véase la siguiente tabla para las secuencias de cebadores/sondas usadas.

| Nombre                   | Secuencia  |
|--------------------------|--|
| Cebador de ADNc de G6PDH | 5'- tgc gga tgt cag cca ctg tg -3' (SEC ID N°: 23)                     |
| Cebador directo de G6PDH | 5'-ggg tgc atc ggg tga cct g-3' (SEC ID N°: 24)                        |
| Cebador inverso de G6PDH | 5'-agc cac tgt gag gcg gga -3' (SEC ID N°: 25)                         |
| Sonda Fluos de G6PDH     | 5'-ggt gtt ttc ggg cag aag gcc atc c-Fluos-3' (SEC ID N°: 26)          |
| Sonda LC Red de G6PDH    | 5'-LCred 640-aac agc cac cag atg gtg ggg tag atc tt-3' (SEC ID N°: 27) |
|                          |  |

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Cebador de ADNc de EGFR         | 5'- ccg tca atg tag tgg gca cac-3' (SEC ID N°: 28)                       |
| Cebador directo de EGFR         | 5'- ggg tga gcc aag gga gtt tg -3' (SEC ID N°: 29)                       |
| Cebador inverso de EGFR         | 5'- gca cac tgg ata cag ttg tct ggt c -3' (SEC ID N°: 30)                |
| Sonda LC Fluos de EGFR          | 5'- tgt gca ggt gat gtt cat ggc ctg agg-Fluos -3' (SEC ID N°: 31)        |
| Sonda LC Red de EGFR            | 5'-LCred 640-cac tct ggg tgg cac tjt atg cac tc -3' (SEC ID N°: 32)      |
| Cebador de ADNc de HER2         | 5'-gga cct gcc tca ctt ggt tg-3' (SEC ID N°: 33)                         |
| Cebador directo de HER2         | 5'-cag gtg gtg cag gga aac ct-3' (SEC ID N°: 34)                         |
| Cebador inverso de HER2         | 5'-ctg cct cac ttg gtt gtg agc-3' (SEC ID N°: 35)                        |
| Sonda Fluos de HER2             | 5'-caa tgc cag cct gtc ctt cct gca g-Fluos -3' (SEC ID N°: 36)           |
| Sonda LC Red de HER2            | 5'-LCred 640-tat cca gga ggt gca ggg cta cgt gc-3' (SEC ID N°: 37)       |
| Cebador de ADNc de HER3         | 5'-gtg tcc atg tga caa agc tta tcg-3' (SEC ID N°: 38)                    |
| Cebador directo de HER3         | 5'-gat ggg aag ttt gcc atc ttc g-3' (SEC ID N°: 39)                      |
| Cebador inverso de HER3         | 5'-tct caa tat aaa cac ccc ctg aca g-3' (SEC ID N°: 40)                  |
| Sonda Fluos de HER3             | 5'-aac acc aac tcc agc cac gct ctg-Fluos -3' (SEC ID N°: 41)             |
| Sonda LC Red de HER3            | 5'-LCred 640-agc tcc gct tga ctc agc tca ccg-3' (SEC ID N°: 42)          |
| Cebador de ADNc de anfiregulina | 5'-ctt gtc gaa gtt tc-3' (SEC ID N°: 43)                                 |
| Cebador directo de anfiregulina | 5'- cca tag ctg cct tta tgt ctg c-3' (SEC ID N°: 44)                     |
| Cebador inverso de anfiregulina | 5'- ctt tcg ttc ctc agc ttc tcc ttc-3' (SEC ID N°: 45)                   |
| Sonda Fluos de anfiregulina     | 5'-tga tcc tca cag ctg ttg ctg tta-Fluos-3' (SEC ID N°: 46)              |
| Sonda LC Red de anfiregulina    | 5'-LC red tac agt cca gct tag aag aca ata cgt cag gaa-3' (SEC ID N°: 47) |
| Cebador de ADNc de betacelulina | 5'-gtc aac tct ctc aca c -3' (SEC ID N°: 48)                             |
| Cebador directo de betacelulina | 5'-tct agg tgc ccc aag c-3' (SEC ID N°: 49)                              |
| Cebador inverso de betacelulina | 5'- tag cct tca tca cag aca cag-3' (SEC ID N°: 50)                       |
| Sonda Fluos de betacelulina     | 5'-gca tta ctg cat caa agg gag atg ccg-Fluos -3' (SEC ID N°: 51)         |
| Sonda LC Red de betacelulina    | 5'-LCred 640-tcg tgg tgg ccg agc aga cg -3' (SEC ID N°: 52)              |

Un calibrador ARN (ARN purificado de la línea celular HT29) se incluyó en cada ejecución para permitir la cuantificación relativa, se usaron controles positivos y negativos para comprobar el flujo de trabajo y reactivos.

5 El análisis de datos se realizó usando el software LIGHTCYCLER® Relative Quantification (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) según las instrucciones del fabricante. El resultado fue un “cociente normalizado al calibrador” de cada marcador para cada muestra de paciente.

10 Los valores de qRT-PCR estuvieron disponibles para 119/130 pacientes (92 %). El intervalo dinámico fue: EGFR- aproximadamente 10 veces, HER2 - aproximadamente 10 veces, HER3 - aproximadamente 20 veces. Se usó el principio de “cuantificación relativa”. La expresión génica (nivel de ARNm) en una muestra se cuantificó relativamente con referencia a la expresión de un gen de mantenimiento de la misma muestra (referencia = G6PDH). Esta expresión génica relativa se normaliza entonces a la expresión génica relativa en el calibrador. Para cada marcador se calcula un “cociente normalizado al calibrador” como sigue:

15

$$\text{Cociente normalizado al calibrador} = \frac{\text{Concentración de diana (muestra)}}{\text{Concentración de referencia}} \div \frac{\text{Concentración de diana (calibrador)}}{\text{Concentración de referencia}}$$

Diana = gen de interés

Referencia = gen de mantenimiento (G6PDH)

Calibrador = ARN de la línea de células de cáncer colorrectal HT29

5 Los resultados de eficacia se evaluaron a 7,1 meses de mediana de seguimiento (intervalo 1,3-20,3). Hubo 101 eventos de supervivencia libre de progresión (SLP) en ese momento. Las Fig. 10A y B representan SLP en todos los pacientes tratados con tanto gemcitabina y placebo como gemcitabina y pertuzumab. Los valores de p se estimaron usando el modelo de Cox estratificado y la prueba del orden logarítmico estratificada por factores de estratificación por aleatorización (ECOG PS, número de tratamientos previos para enfermedad resistente a platino y capacidad de medición de la enfermedad).

15 La SLP por estado de pHER2 predicho se muestra en las Fig. 11A y B, comparando SLP en pacientes predichos negativos para pHER2 y aquellos predichos positivos para pHER2. Se desarrolló un algoritmo predictivo usando 80 muestras de cáncer de ovario comercialmente obtenidas. Una combinación de expresión de HER2, HER3 y anfiregulina predice el 30 % más alto de muestras de pHER con una exactitud del 80 %. Los pacientes se predijeron positivos para pHER2 si anfiregulina, HER2 y HER3 fueron superiores e iguales al percentil 70, otros se consideraron negativos para pHER2.

20 Las Fig. 12A y B representan la SLP basada en cortes de EGFR por qRT-PCR; las Fig. 13A y B SLP basada en cortes de HER2 por qRT-PCR; y las Fig. 14A y B SLP por cortes de HER3 por qRT-PCR. Los pacientes con HER3 bajo tuvieron mejor desenlace en términos de SLP. Estos datos se muestran en más detalle en las Fig. 15A y B. Como se muestra en aquellas figuras, la actividad de pertuzumab es la mayor en pacientes con tumores que expresan HER3 bajo y tiende a aumentar a medida que disminuye el nivel que expresa génica de HER3. Estas cifras incluyen el valor absoluto para la expresión de HER3 como se cuantifica en el ensayo de qRT-PCR.

25 Las Fig. 16A y B ilustran SLP por subgrupos de HER3. Estos datos muestran que aquí puede haber una interacción negativa entre pertuzumab y gemcitabina en pacientes con tumores que expresan HER3 alto.

30 Las Fig. 17A y B son adicionalmente tablas que resumen los datos para SLP por subgrupos de HER3 para tanto expresión de HER3 alto como expresión de HER3 bajo. Las Fig. 18A y B representan SLP por subgrupos de HER3 basándose en cuatro percentiles diferentes. Los pacientes en el percentil 0 a menos de 50, y particularmente el percentil 0 a 25 para la expresión de HER3, tienen un cociente de riesgos instantáneos (HR) mejorado para SLP (HR más bajos correlacionan con desenlace mejorado como se mide por SLP).

35 Las Fig. 19A y B proporcionan los datos que muestran la SLP por qRT-PCR de HER3 con una partición 50/50. Pacientes que expresan HER3 bajo (inferior al percentil 50) tienen una elevada duración de SLP como se mide en meses en comparación con pacientes que expresan HER3 alto (superior e igual al percentil 50). Esta correlación es más pronunciada en las Fig. 20A y B en las que los pacientes que expresan HER3 bajo se caracterizaron como aquellos en el percentil inferior a 25, y los pacientes que expresan HER3 alto fueron aquellos en el percentil superior o igual a 25. El valor de p para la diferencia en HR entre los dos subgrupos de diagnóstico fue 0,0007. El percentil 25 es igual a 1,19 CNR.

45 Están disponibles datos preliminares para supervivencia global (SG). Tales datos para todos los pacientes se proporcionan en las Fig. 21 A y B. Las Fig. 22A y B comparan SG por qRT-PCR de HER3 comparando la expresión de HER3 bajo (inferior al percentil 50) y la expresión de HER3 alto (superior o igual al percentil 50).

50 Las Fig. 23A y B ilustran SLP por qRT-PCR de HER3 con partición 50/50, cociente de riesgos instantáneos (HR) alto frente a bajo. El conjunto completo de datos de SLP que incluyen percentiles del 5 % al 95 % se muestran en las Fig. 24A y B.

El intervalo de expresión del cociente normalizado calibrado de HER3 se muestra en la Fig. 26. Este intervalo es aproximadamente 20-80 veces.

55 Los resultados de SLP se evaluaron adicionalmente con respecto al cociente HER2:HER3. Los resultados de estos análisis se representan adicionalmente en las Fig. 29 a 31. Como muestran estas figuras, la actividad de pertuzumab es la mayor en pacientes con un cociente HER2:HER3 alto.

### Conclusiones

60 La actividad de pertuzumab es la mayor en pacientes con cáncer que expresa HER3 bajo y tiende a aumentar a medida que disminuye el nivel de expresión génica de HER3. La actividad de pertuzumab también es la mayor en pacientes con cáncer que expresa HER2:HER3 alto y tiende a aumentar a medida que aumenta el nivel de expresión génica de HER2:HER3. La mayoría de los pacientes con nivel de expresión de HER3 bajo que respondieron a terapia con pertuzumab también tuvieron un cociente de HER2:HER3 alto.

65

Puede haber una interacción negativa entre pertuzumab y gemcitabina en pacientes con tumores que expresan HER3 alto.

5 La expresión de HER3 puede ser pronóstica de los antecedentes de la quimioterapia resultando mejor con tumores que expresan alto.

Los resultados fueron sorprendentes e inesperados.

### **Ejemplo 2**

10

#### **Pertuzumab para terapia de cáncer de ovario avanzado, resistente al tratamiento o recurrente**

15

Este ejemplo se refiere a un ensayo clínico de fase II multicéntrico, de etiqueta abierta de un único brazo de pacientes con cáncer de ovario. Los pacientes con cáncer de ovario avanzado, resistente al tratamiento o recurrente se trataron con pertuzumab, un anticuerpo para HER2 humanizado.

20

Los pacientes con cáncer de ovario recidivante se enrolaron para recibir terapia con el agente individual de “dosis baja” pertuzumab; pertuzumab se administró intravenosamente (IV) con una carga de 840 mg seguido de 420 mg cada 3 semanas.

25

Una segunda cohorte de pacientes se trató con pertuzumab de “dosis alta”; 1050 mg cada 3 semanas, administrado como un agente individual.

Las evaluaciones tumorales se obtuvieron después de 2, 4, 6, 8, 12 y 16 ciclos. La TR (RR) por RECIST fue el criterio principal de valoración. La seguridad y tolerabilidad se evaluaron adicionalmente. Los criterios secundarios de valoración fueron TTP, duración de la respuesta, duración de la supervivencia, farmacocinética (PK) y FOSI (cohorte 2).

30

Los ensayos de qRT-PCR se realizaron en tejido incorporado en parafina fijado en formalina archivado. Los datos del ensayo están disponibles para 46/117 pacientes. SLP y SG por qRT-PCR de HER3 con 25/75 seleccionada como la mejor partición se muestra en la Fig. 25. Aquí, expresores de HER3 alto estuvieron en el percentil superior e igual a 75, mientras que expresores de HER3 bajo estuvieron en el percentil inferior a 75.

35

De nuevo, pacientes con expresión de HER3 bajo tratados con pertuzumab mostraron mejores desenlaces en términos de SLP y SG.

### **Ejemplo 3**

40

#### **Pertuzumab para terapia de cáncer de ovario recurrente resistente a platino**

45

En este estudio clínico de fase II de etiqueta abierta aleatorizado, la eficacia y seguridad del tratamiento de pertuzumab en combinación con quimioterapia convencional basada en carboplatino se investigó en pacientes con cáncer de ovario recurrente sensible a platino. El tamaño de muestra objetivo es 100-500 individuos. El tamaño de muestra objetivo es 148.

#### **Criterios de inclusión:**

50

- cáncer de ovario, peritoneal primario o de las trompas de Falopio histológicamente confirmado;
- solo 1 pauta previa, que debe estar basada en platino;
- enfermedad sensible a platino que se define por un intervalo libre de progresión superior a 6 meses después de completarse la quimioterapia basada en platino.

55

#### **Criterios de exclusión:**

60

- radioterapia previa;
- tratamiento previo con una vacuna contra el cáncer o cualquier terapia dirigida;
- cirugía mayor o lesión traumática en el plazo de 4 semanas del estudio;
- historia o pruebas de metástasis del sistema nervioso central.

65

Los resultados se muestran en las Figuras 32-35. Los resultados de este ensayo confirman adicionalmente que la actividad de pertuzumab es la mayor en pacientes con cáncer que expresa HER3 bajo y tiende a aumentar a medida que disminuye el nivel de expresión génica de HER3. La actividad de pertuzumab también es la mayor en pacientes con cáncer que expresa HER2:HER3 alto y tiende a aumentar a medida que aumenta el nivel de expresión génica de HER2:HER3. La mayoría de los pacientes con nivel de expresión de HER3 bajo que respondieron a terapia de pertuzumab también tuvieron un cociente de HER2:HER3 alto.

Puede haber una interacción negativa entre pertuzumab y gemcitabina en pacientes con tumores que expresan HER3 alto.

La expresión de HER3 puede ser pronóstica de los antecedentes de la quimioterapia resultando mejor con tumores que expresan alto.

#### **Ejemplo 4**

##### **Análisis de la expresión génica de la ruta de HER en un estudio de fase II de pertuzumab + gemcitabina frente a gemcitabina + placebo en pacientes con cáncer de ovario epitelial resistente a platino**

**Antecedentes:** Un ensayo de fase II aleatorizado (N=130) de pertuzumab + gemcitabina frente a gemcitabina frente a placebo en pacientes con cáncer de ovario epitelial (COE) resistente a platino (CDDP-R) sugirió que pertuzumab podría prolongar la SLP (HR 0,66, IC del 95 % 0,43, 1,03) y que la duración de SLP puede asociarse a expresión génica de HER3 (véanse los Ejemplos 2 y 3).

**Procedimientos:** Pacientes con COE CDDP-R se aleatorizaron a G+P o G+placebo. El tratamiento se administró hasta la progresión o hasta toxicidad inaceptable. El criterio principal de valoración fue SLP. Un objetivo secundario fue evaluar los desenlaces de eficacia en pacientes con perfiles de expresión relacionados con la expresión de HER2. Un ensayo de qRT-PCR usando tejido incorporado en parafina fijado en formalina de archivo (FFPET), realizado como se ha descrito anteriormente, permitió el análisis de la expresión de ARNm de los genes de la ruta de HER, que incluyen HER1, HER2, HER3, anfiregulina y betacelulina. Los desenlaces se describieron por baja expresión génica (< mediana) y por alta expresión génica (≥ mediana).

**Resultados:** De los 5 biomarcadores probados, solo la expresión génica de HER3 sugirió un subgrupo de pacientes con un desenlace de SLP y SG diferencial basado en resultados bajos frente a altos. Los desenlaces de SLP y SG final para todos los pacientes y por desenlaces de HER3 por qRT-PCR son los siguientes:

|   | G + P | G + placebo | Cociente de riesgos instantáneos (IC del 95 %) |
|---|-------|-------------|--|
| <b>SLP (mediana de meses)</b>   |       |             |  |
| Todos los pacientes (n=130)   | 2,9   | 2,6         | 0,66* (0,43, 1,03)                             |
| HER3 bajo (N=61)  | 5,3   | 1,4         | 0,34 (0,18, 0,63)                              |
| HER3 alto (N=61)  | 2,8   | 5,5         | 1,48 (0,83, 2,63)                              |
| <b>SG (mediana de meses)</b>  |       |             |  |
| Todos los pacientes (n=130)   | 13,0  | 13,1        | 0,91* (0,58, 1,41)                             |
| HER3 bajo (N=61)  | 11,8  | 8,4         | 0,62 (0,35, 1,11)                              |
| HER3 alto (N=61)  | 16,1  | 18,2        | 1,59 (0,8, 3,2)                                |
| * Los análisis de todos los pacientes se estratificaron por estado de ECOG, capacidad de medición de la enfermedad y nº de tratamientos previos para enfermedad CDDP-R. |       |             |  |

**Conclusiones:** Este análisis exploratorio sugiere que los niveles de expresión génica de HER3 tumoral bajo pueden usarse como indicadores de pronóstico en pacientes con COE CDDP-R. El tratamiento con pertuzumab puede añadirse a la actividad clínica de la gemcitabina en pacientes cuyos tumores tienen expresión del gen HER3 bajo. Estos datos sugieren que los niveles de expresión de ARNm de HER3 pueden usarse como biomarcador de pronóstico y diagnóstico predictivo.

## REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la dimerización de HER2 para su uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer que puede responder a un inhibidor de la dimerización de HER2, tratamiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la dimerización de HER2 a un paciente que tiene el cáncer después de determinar que el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel inferior al percentil 50 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer, en donde el inhibidor de la dimerización de HER2 es un anticuerpo que se une a un sitio de unión heterodimérico de HER2.
2. El inhibidor de la dimerización de HER2 según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos ligeras variables y pesadas variables en SEC ID N° 3 y 4, respectivamente.
3. El inhibidor de la dimerización de HER2 según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de la dimerización de HER2 es pertuzumab.
4. El inhibidor de la dimerización de HER2 según la reivindicación 1 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el tratamiento comprende administrar un segundo agente terapéutico al paciente, en donde opcionalmente el segundo agente terapéutico está seleccionado del grupo que consiste en: agente quimioterapéutico, anticuerpo para HER, anticuerpo dirigido contra un antígeno asociado a tumor, compuesto antihormonal, cardioprotector, citocina, fármaco dirigido a EGFR, agente antiangiogénico, inhibidor de tirosina cinasas, inhibidor de la COX, fármaco antiinflamatorio no esteroideo, inhibidor de farnesiltransferasa, anticuerpo que se une a la proteína oncofetal CA 125, vacuna contra HER2, terapia dirigida a HER, inhibidor de Raf o de ras, doxorubicina liposómica, topotecan, taxano, inhibidor dual de tirosina cinasas, TLK286, EMD-7200, un medicamento que trata náuseas, un medicamento que previene o trata erupción cutánea o terapias de acné convencionales, un medicamento que trata o previene diarrea, un medicamento reductor de la temperatura corporal y un factor de crecimiento hepatopoyético; en el que opcionalmente el segundo agente terapéutico es
- (a) un agente quimioterapéutico, que opcionalmente:
- (i) está seleccionado del grupo que consiste en gemcitabina, carboplatino, paclitaxel, docetaxel, topotecan y doxorubicina liposómica; o
- (ii) es un antimetabolito, que es opcionalmente gemcitabina; o
- (b) trastuzumab, erlotinib o bevacizumab
5. El inhibidor de la dimerización de HER2 según la reivindicación 1 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el tratamiento comprende administrar gemcitabina.
6. Un procedimiento de selección de una terapia para un paciente con un tipo de cáncer que puede responder a un inhibidor de la dimerización de HER2, que comprende determinar la expresión de HER3 en una muestra de cáncer del paciente y seleccionar un inhibidor de la dimerización de HER2 como la terapia si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel inferior al percentil 25 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.
7. Un procedimiento de selección de una terapia para un paciente con un tipo de cáncer que puede responder a un agente quimioterapéutico, que comprende determinar la expresión de HER3 en una muestra de cáncer del paciente y seleccionar un agente quimioterapéutico como terapia si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel superior al percentil 75 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.
8. Un procedimiento para determinar un pronóstico para una respuesta clínica del paciente a un agente quimioterapéutico, usando expresión de HER3 como marcador de pronóstico, en el que el paciente tiene un tipo de cáncer que puede responder a un agente quimioterapéutico, comprendiendo el procedimiento determinar el nivel de expresión de HER3 en una muestra del cáncer del paciente, en donde el pronóstico es mejor para el paciente si el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel superior al percentil 75 de expresión de HER3 en ese tipo de cáncer, con respecto al pronóstico para el paciente si el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel inferior al percentil 25 para la expresión de HER3 en ese tipo de cáncer.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, que comprende además seleccionar una terapia para el paciente, que comprende seleccionar un agente quimioterapéutico como la terapia si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel superior al percentil 75 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.
10. El procedimiento de la reivindicación 8, que comprende además seleccionar una terapia para el paciente, que comprende seleccionar un inhibidor de la dimerización de HER2 como la terapia si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel inferior al percentil 25 para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer, en donde el inhibidor de la dimerización de HER2 es un anticuerpo que se une a HER2.

11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el agente quimioterapéutico seleccionado como la terapia es un antimetabolito, en donde el antimetabolito es opcionalmente gemcitabina.
- 5 12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el inhibidor de la dimerización es un anticuerpo que se une a HER2, y
- (i) se une al dominio II del dominio extracelular de HER2; o
  - (ii) se une a un sitio de unión heterodimérico de HER2.
- 10 13. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el inhibidor de la dimerización es un anticuerpo que se une al dominio II del dominio extracelular de HER2, en donde el anticuerpo para HER2 comprende las secuencias de aminoácidos ligeras variables y pesadas variables en SEC ID N° 3 y 4, respectivamente.
- 15 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el inhibidor de la dimerización de HER2 es pertuzumab.
- 15 15. El procedimiento de la reivindicación 8 en el que
- (a) la expresión de HER3 se determina midiendo el nivel de ARNm de HER3 o de proteína HER3;
  - 20 (b) la expresión de HER3 se determina por RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR); o
  - (c) dicha muestra se obtiene de un tejido de cáncer incorporado en parafina y fijado en formol de conservación.
16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, en el que el pronóstico se determina como
- 25 (a) supervivencia libre de progresión (SLP), y opcionalmente en donde la SLP de dicho paciente se determina que es inferior a la SLP promedio de pacientes cuyo cáncer expresa HER3 a nivel medio o superior; o
  - (b) supervivencia global (SG), y opcionalmente en donde la SG de dicho paciente se predice que es menor que la SG promedio de pacientes cuyo cáncer expresa HER3 a nivel medio o superior.
- 30 17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16, en el que el cáncer está seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de mama o cáncer de pulmón; en el que el cáncer de mama es opcionalmente cáncer de mama metastásico (CMM) y en el que el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP),
- 35 y opcionalmente en el que el cáncer está seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de las trompas de Falopio, que incluye formas resistentes a platino de dichos cánceres, y cáncer de ovario avanzado resistente al tratamiento o recurrente.
- 40 18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 17 para determinar un pronóstico para una respuesta clínica del paciente a un agente quimioterapéutico en el que dicho agente quimioterapéutico es gemcitabina.

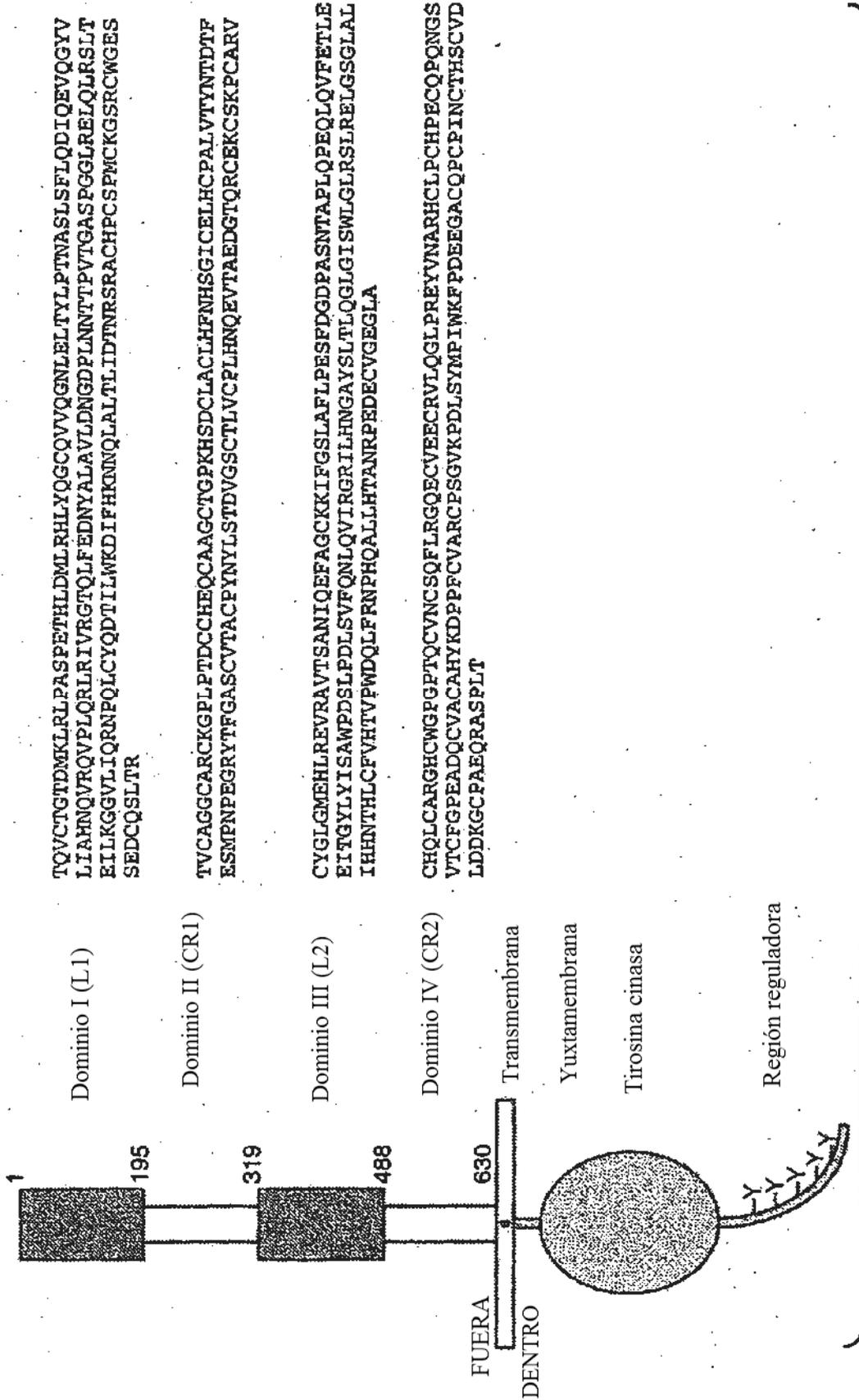


FIG. 1

Ligera variable

|        |  |                         |                          |        |    |
|--------|--|-------------------------|--------------------------|--------|----|
|        |  | 10                      | 20                       | 30     | 40 |
| 2C4    |  | DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC | [KASQDVSIGVA]            | WYQORP |    |
|        |  | ** * * * *              | *                        | *      |    |
| 574    |  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC | [KASQDVSIGVA]            | WYQOKP |    |
|        |  |                         | * * * *                  |        |    |
| kI hum |  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC | [RASQISNYLA]             | WYQOKP |    |
|        |  |                         |                          |        |    |
|        |  | 50                      | 60                       | 70     | 80 |
| 2C4    |  | GQSPKLLIY [SASYRYT]     | GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA |        |    |
|        |  | ** * * *                | * * *                    | * * *  |    |
| 574    |  | GKAPKLLIY [SASYRYT]     | GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQP   |        |    |
|        |  | * * * * *               |                          |        |    |
| kI hum |  | GKAPKLLIY [AASSLES]     | GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQP   |        |    |
|        |  |                         |                          |        |    |
|        |  | 90                      | 100                      |        |    |
| 2C4    |  | EDLAVYYC [QQYYIYPYT]    | FGGGTKLEIK (SEC ID N°:1) |        |    |
|        |  | * *                     | * *                      |        |    |
| 574    |  | EDFATYYC [QQYYIYPYT]    | FGQGTKVEIK (SEC ID N°:3) |        |    |
|        |  | * * * *                 |                          |        |    |
| kI hum |  | EDFATYYC [QQYNSLPWT]    | FGQGTKVEIK (SEC ID N°:5) |        |    |

**FIG. 2A**

Pesada variable

|         |  |                               |                 |                           |     |
|---------|--|-------------------------------|-----------------|---------------------------|-----|
|         |  | 10                            | 20              | 30                        | 40  |
| 2C4     |  | EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS     | [GFTFTDYTMD]    | WVKQS                     |     |
|         |  | ** * * *                      | * * *           | * *                       |     |
| 574     |  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS     | [GFTFTDYTMD]    | WVRQA                     |     |
|         |  |                               | * * *           |                           |     |
| III hum |  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS     | [GFTFSSYAMS]    | WVRQA                     |     |
|         |  |                               |                 |                           |     |
|         |  | 50 a                          | 60              | 70                        | 80  |
| 2C4     |  | HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG] | KASLTVDRSSRIVYM |                           |     |
|         |  | * * *                         | * * *           | * * *                     |     |
| 574     |  | PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG] | RETLSVDRSKNTLYL |                           |     |
|         |  | * * * * *                     | * * *           |                           |     |
| III hum |  | PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG] | RETISRDNKNTLYL  |                           |     |
|         |  |                               |                 |                           |     |
|         |  | abc                           | 90              | 100ab                     | 110 |
| 2C4     |  | ELRSLTFEDTAVYYCAR             | [NLGPSFYFDY]    | WGQGTILTVSS (SEC ID N°:2) |     |
|         |  | ** *                          |                 | **                        |     |
| 574     |  | QMNSLRAEDTAVYYCAR             | [NLGPSFYFDY]    | WGQGTILTVSS (SEC ID N°:4) |     |
|         |  |                               | * * * * *       |                           |     |
| III hum |  | QMNSLRAEDTAVYYCAR             | [GRVGYSLYDY]    | WGQGTILTVSS (SEC ID N°:6) |     |

**FIG. 2B**

Secuencia de aminoácidos para la cadena ligera de pertuzumab

```

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

```

**FIG. 3A**

Secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de pertuzumab

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTEMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY
      70      80      90      100     110     120
|      |      |      |      |      |      |
NQRFRGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSPFYFDYWGQGLVTVSSA
      130     140     150     160     170     180
|      |      |      |      |      |      |
STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
      190     200     210     220     230     240
|      |      |      |      |      |      |
LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPAPPELLGGP
      250     260     270     280     290     300
|      |      |      |      |      |      |
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
      310     320     330     340     350     360
|      |      |      |      |      |      |
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
      370     380     390     400     410     420
|      |      |      |      |      |      |
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
      430     440     448
|      |      |
QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

```

**FIG. 3B**

EGFR activado por ligando se heterodimeriza con HER2 - 2C4 se une al sitio de unión heterodimérico

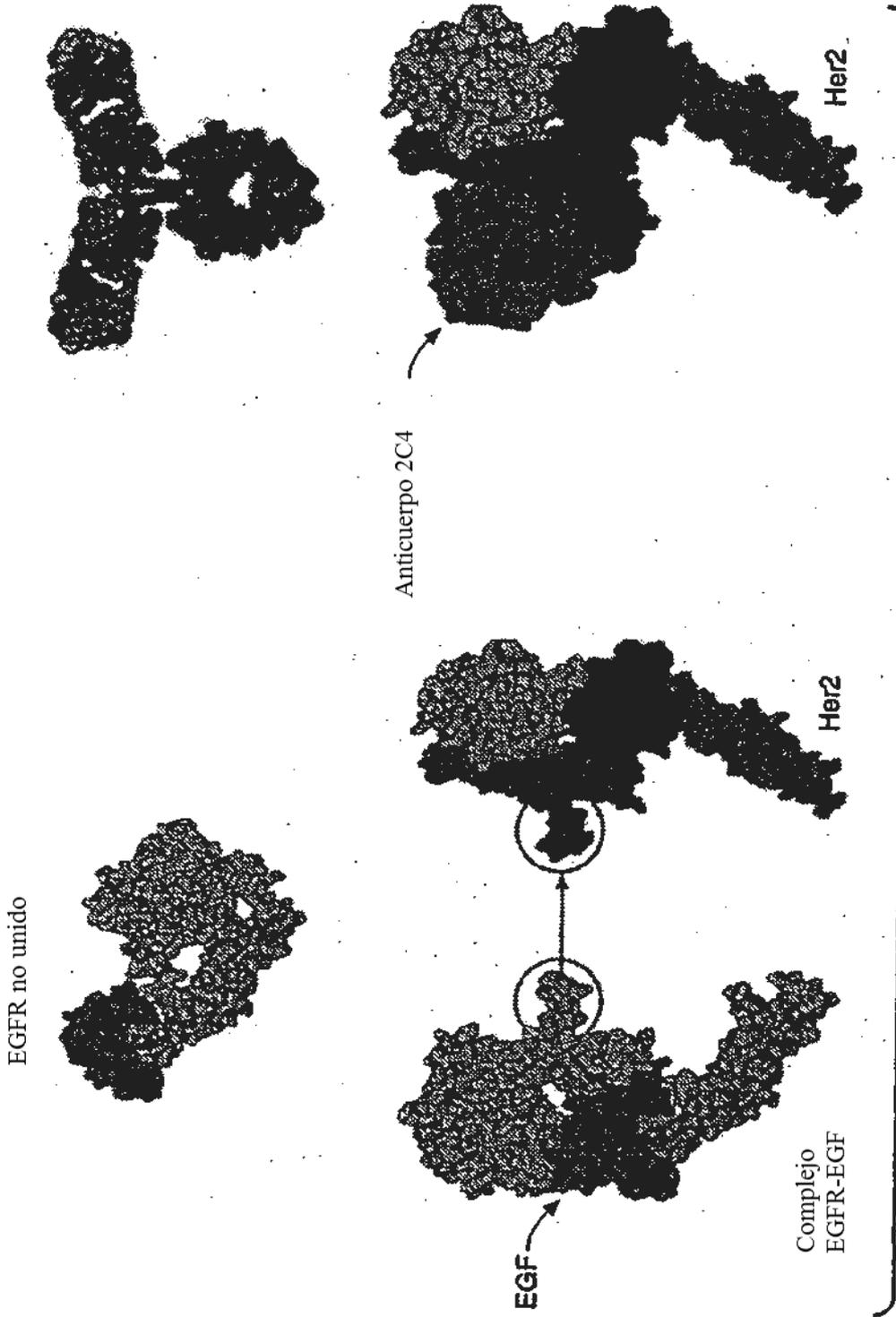


FIG. 4

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

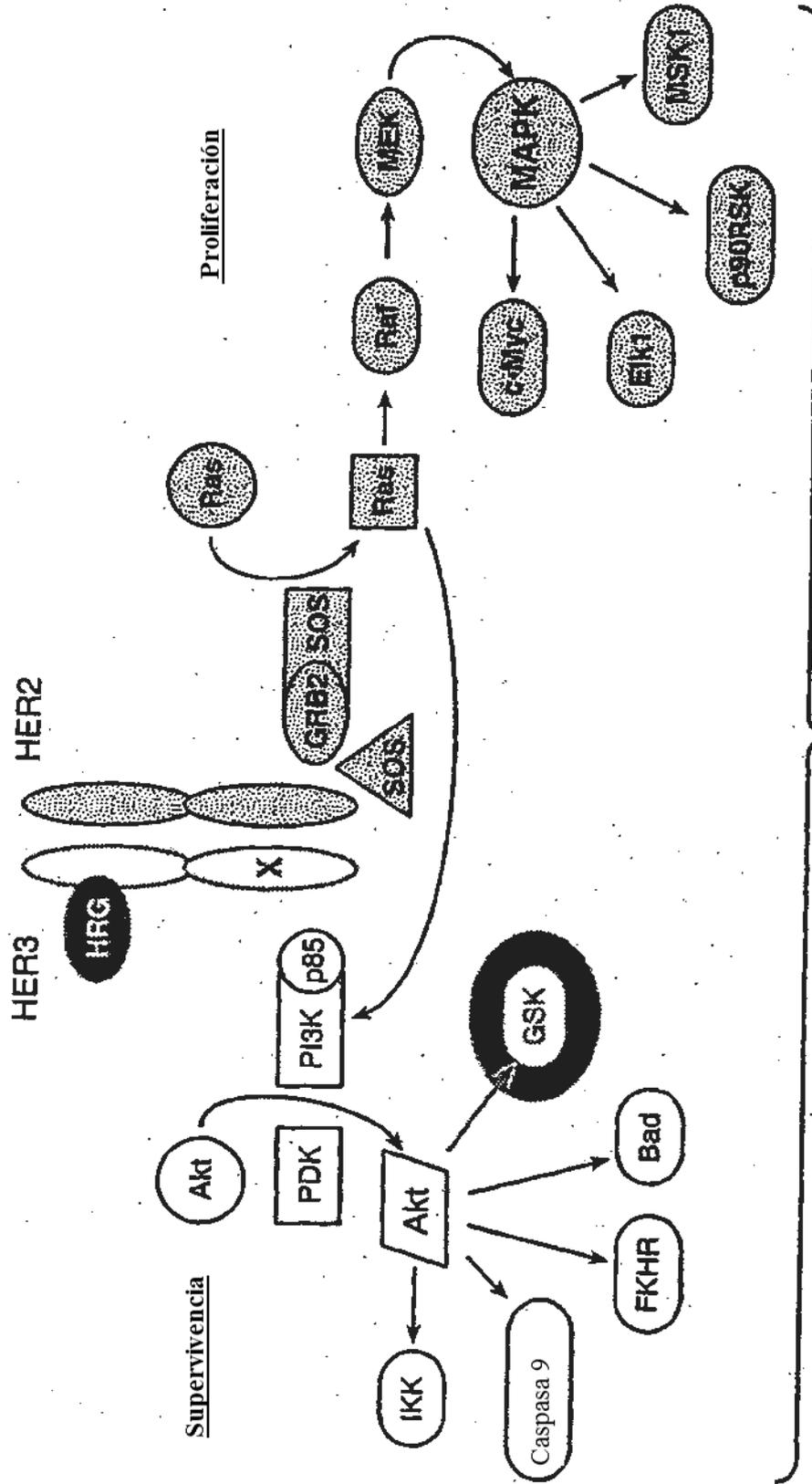
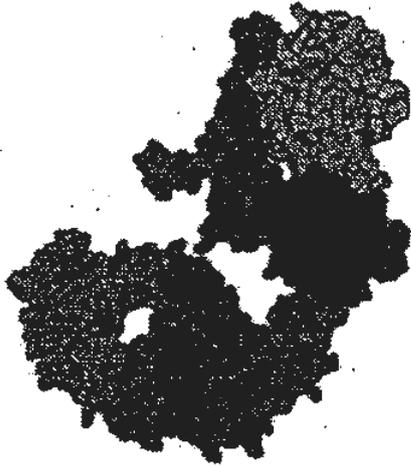


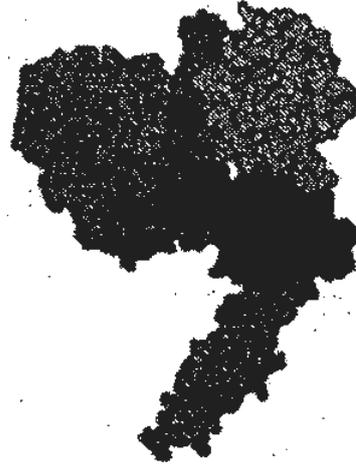
FIG. 5

**Trastuzumab  
Herceptin**



- Se une en IV próximo a JM.
- Protege contra la eliminación de receptor
- Afecta moderadamente la modulación por disminución del receptor
- Ligero efecto sobre la función de HER2 como co-receptor

**Pertuzumab  
Omnitarg**



- Se une en II en la superficie de separación de dimerización
- No previene la eliminación de receptor
- Afecta moderadamente la modulación por disminución del receptor
- Efecto importante sobre la función de HER2 como co-receptor

**FIG. 6**



Cadena pesada

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRRQAPGKGL 45  
 30  
 46 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED 90  
 75  
 91 TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSPVFLAPSS 135  
 120  
 136 KSTSGGTAALGCLVKDYRPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 180  
 165  
 181 GLYSSLSSVTVPSSSLGTTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK 225  
 210  
 226 THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTRLMI<sup>2</sup>SRTPETCVVDVS 270  
 255  
 271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<sup>2</sup>NS<sup>2</sup>TYRVVSVLTVLHQD 315  
 300  
 316 WLN<sup>2</sup>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPRPEPQVYTLPPSREE 360  
 345  
 361 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG 405  
 390  
 406 SFFLYSKLTVDKSRWQQGQGNVFPSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 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 P S G S G T D F T L T I S S L Q P 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 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 EVQLVESGGGLVQP... 30 45  
 46 EWVADVNPN... 75 90  
 91 TAVYYCAR... 120 135  
 136 STSGGTAAL... 165 180  
 181 LYSLSV... 210 225  
 226 HTPPCPA... 255 270  
 271 EDPEVKFN... 300 315  
 316 LNKGEYK... 345 360  
 361 TKNQVSL... 390 405  
 406 FFLYSKLT... 435 449

FIG. 8B

**FIG. 9**

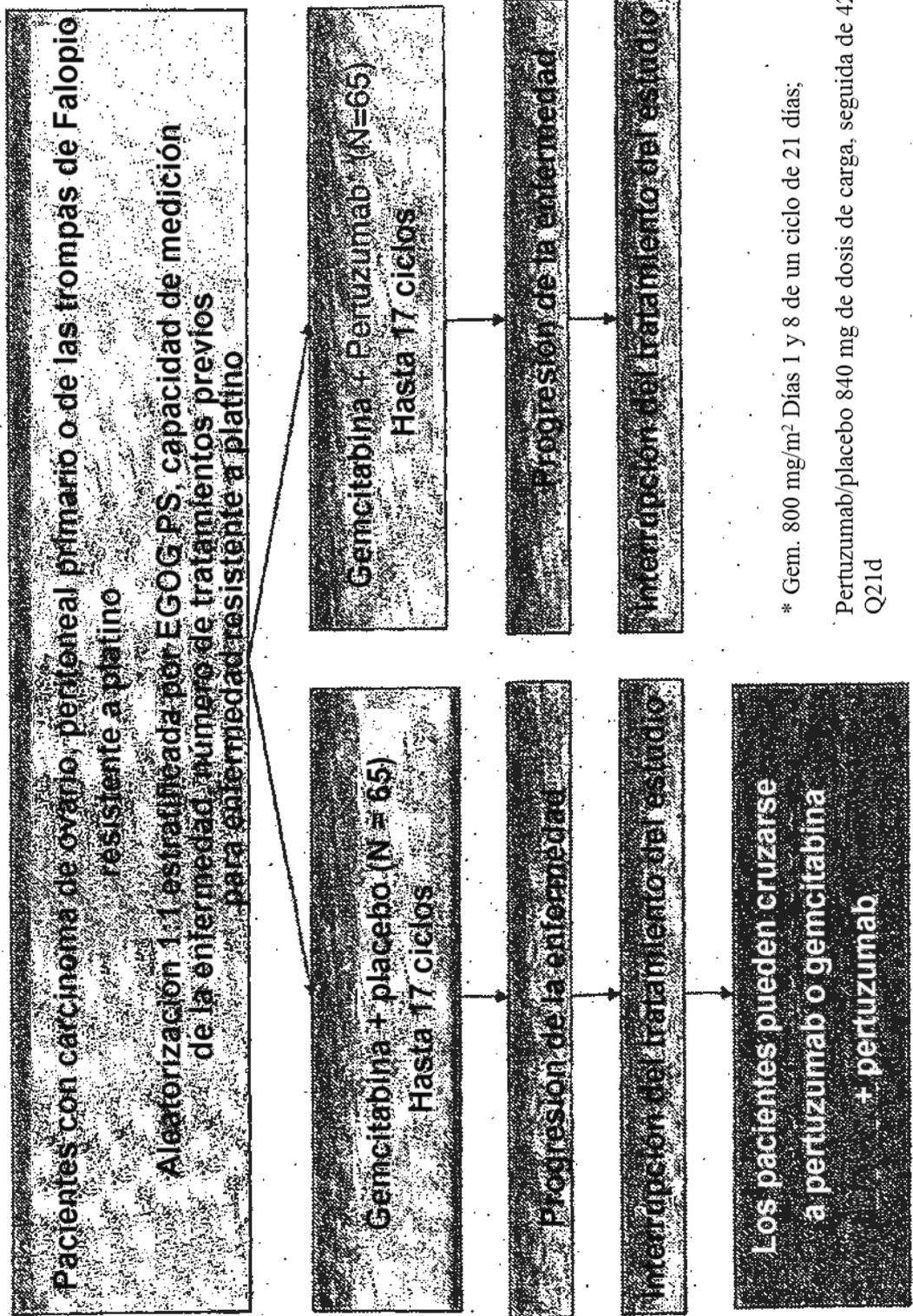


FIG. 10A

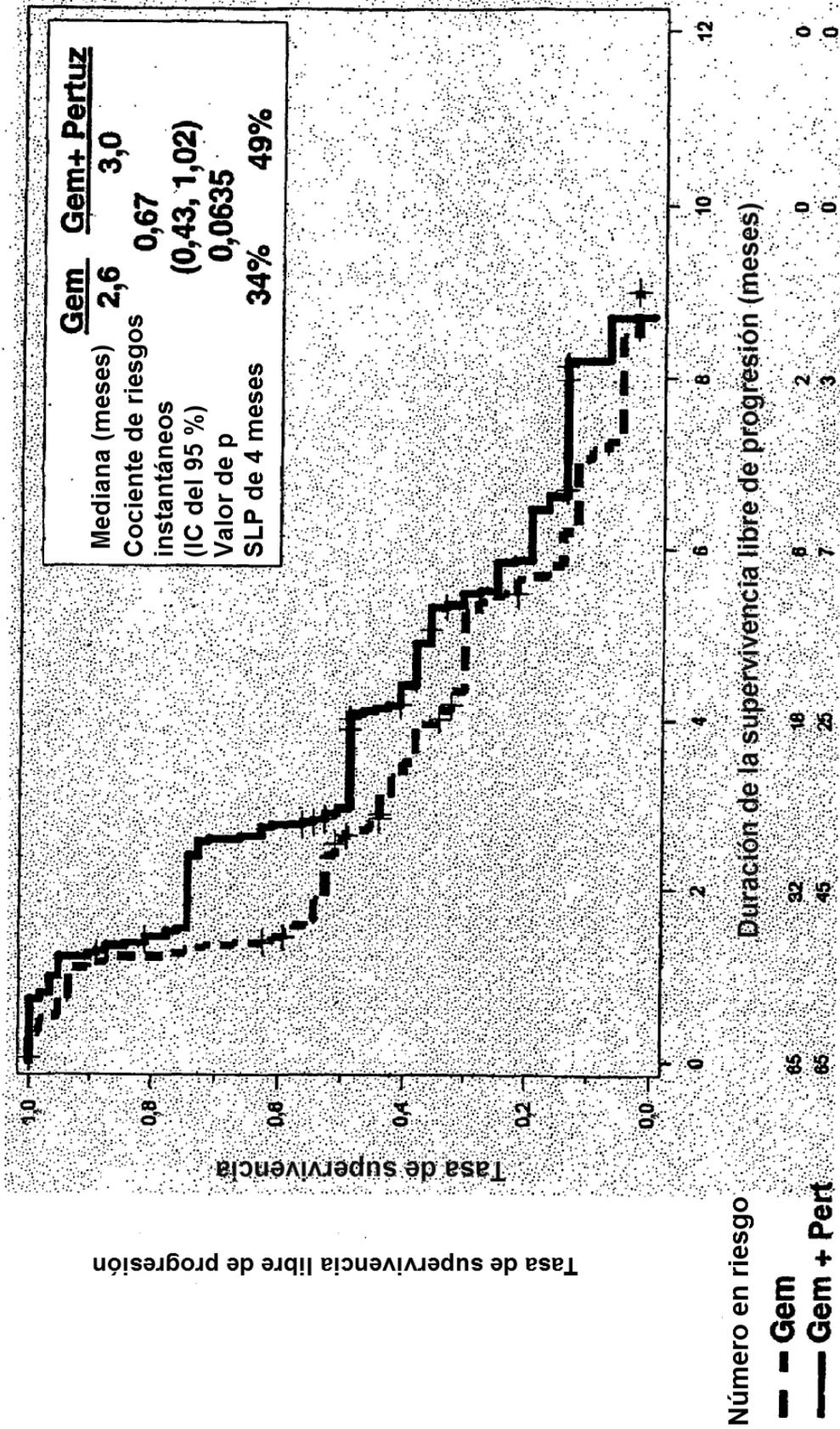
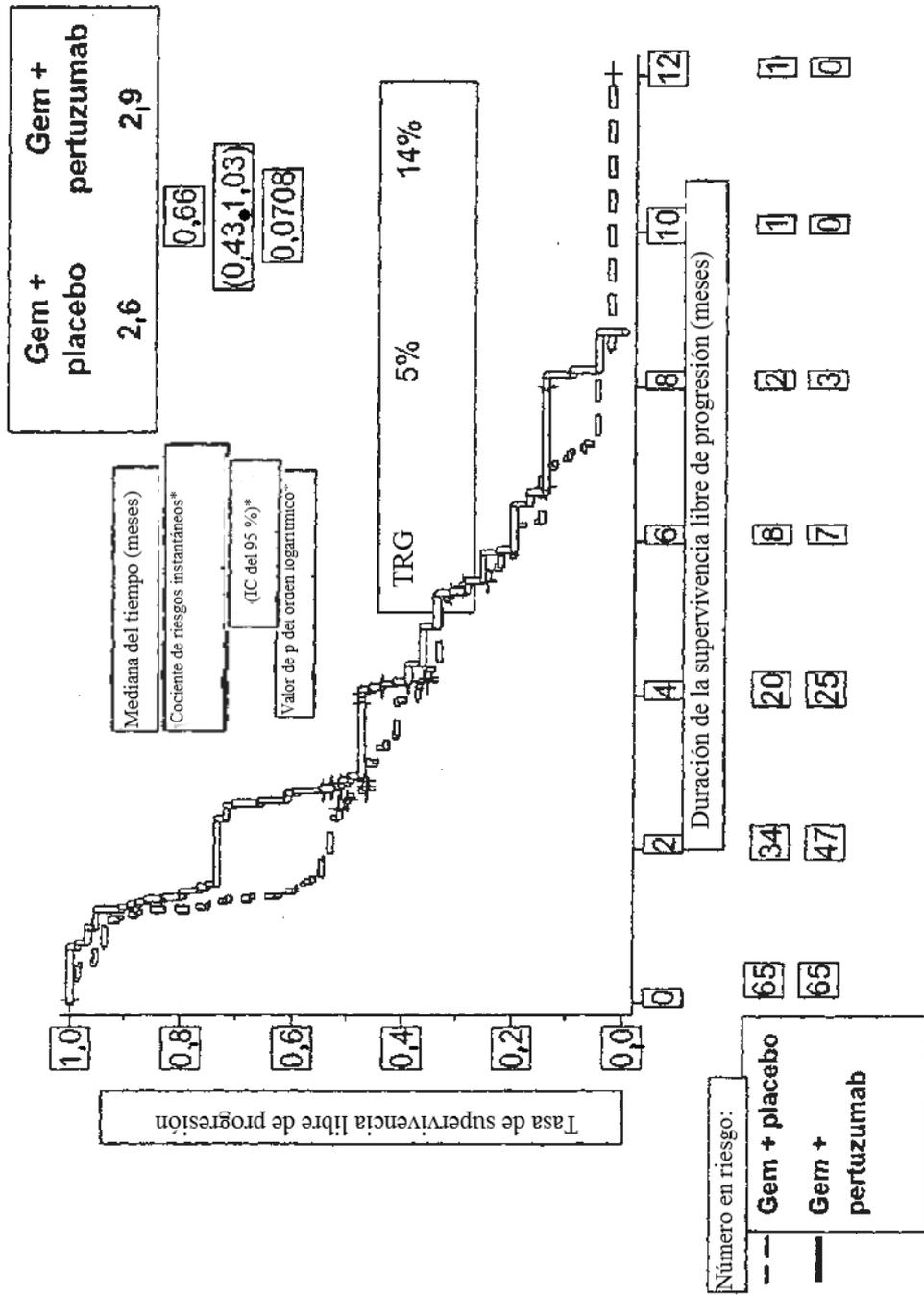


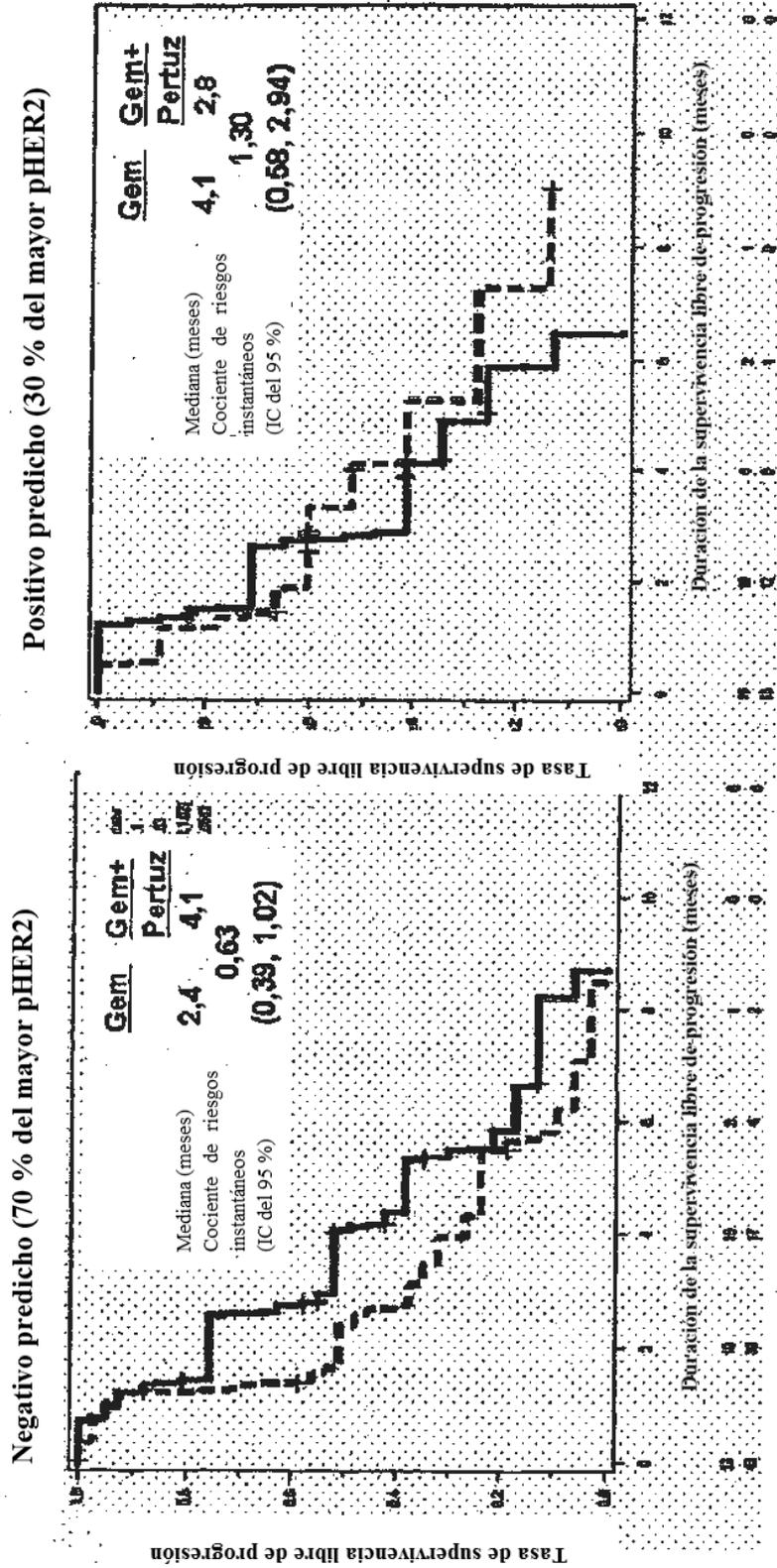
FIG. 10B

SUPERVIVENCIA SIN PROGRESIÓN



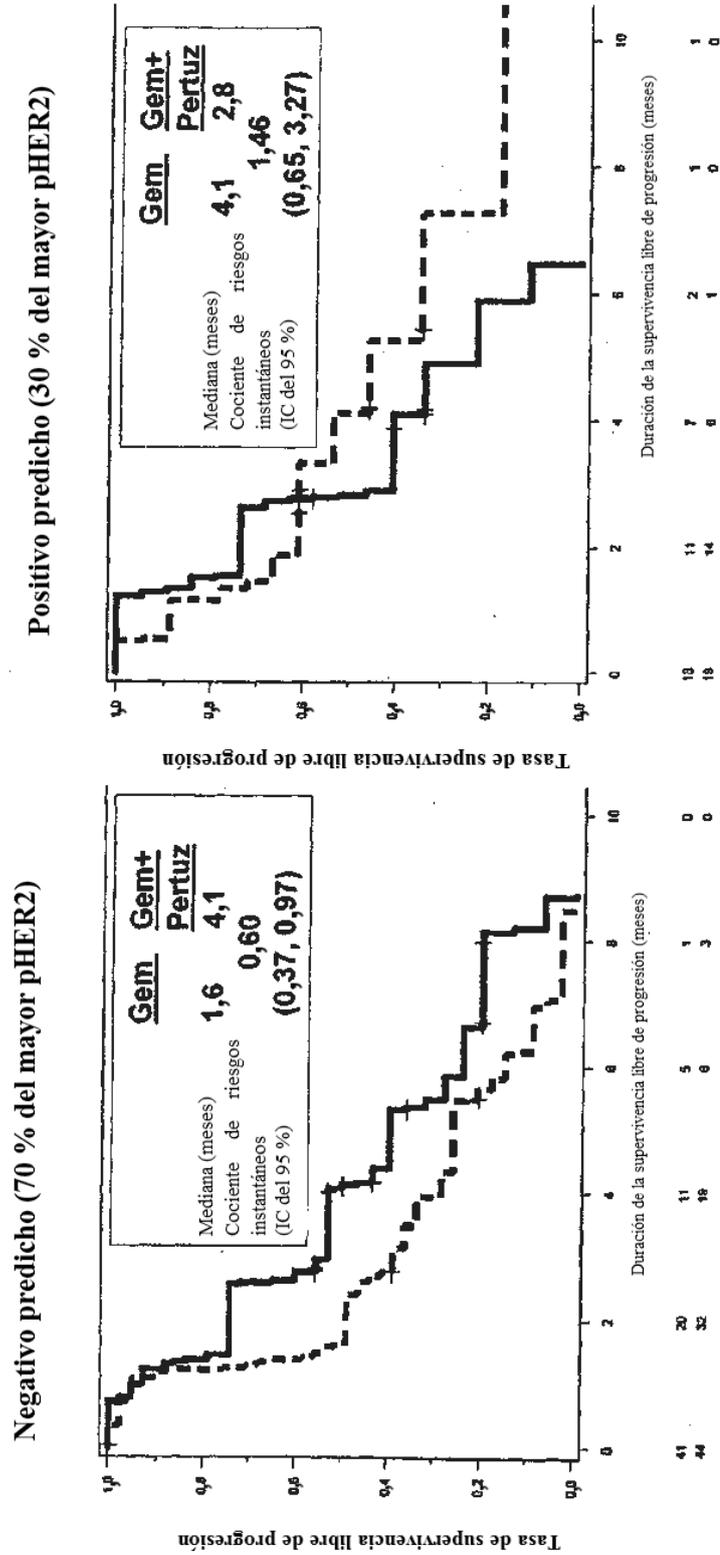
\*Estimado usando el modelo de Cox estratificado y la prueba del orden logarítmico estratificada por factores de estratificación por aleatorización (ECOG PS, número, número de tratamientos previos para enfermedad resistente a platino y capacidad de medición de la enfermedad).

FIG. 11A



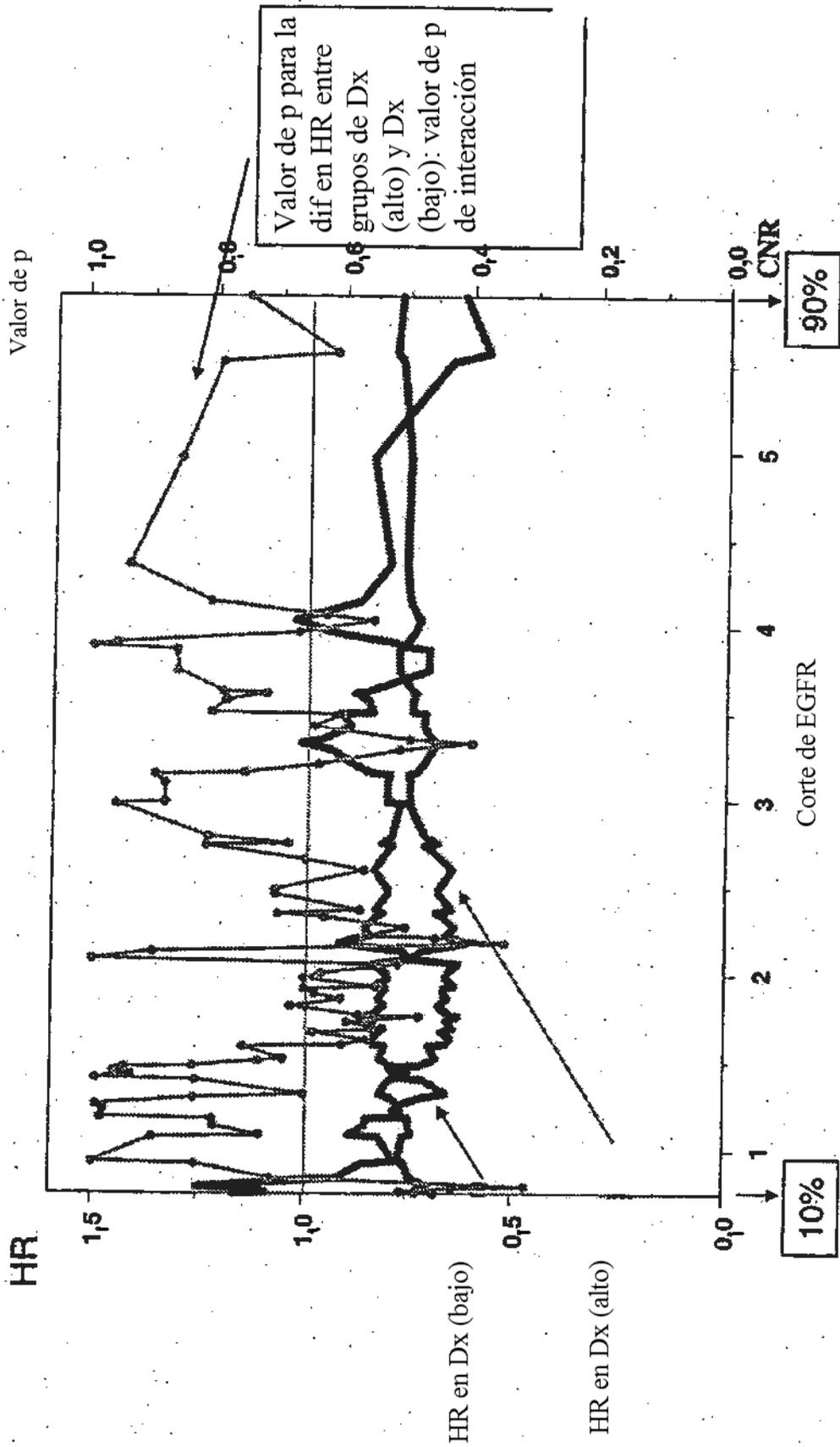
Nota: Dx (+): la puntuación suma de anfi, Her2, Her3 ≥ percentil 70, Dx (-): Otros

FIG. 11B



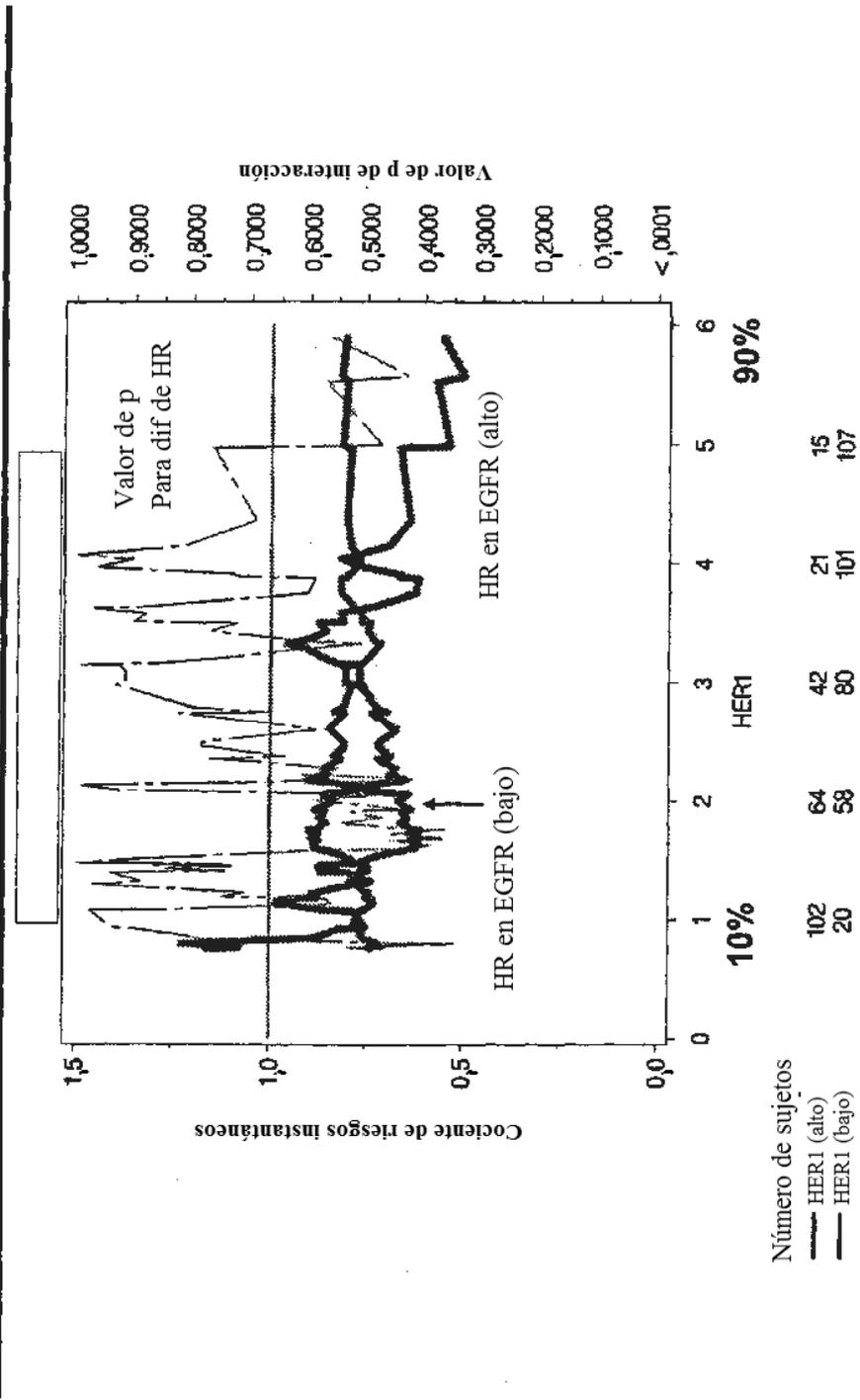
Nota: Dx (+): la puntuación suma de anfi, Her2, Her3 ≥ percentil 70, Dx (-): Otros

FIG. 12A



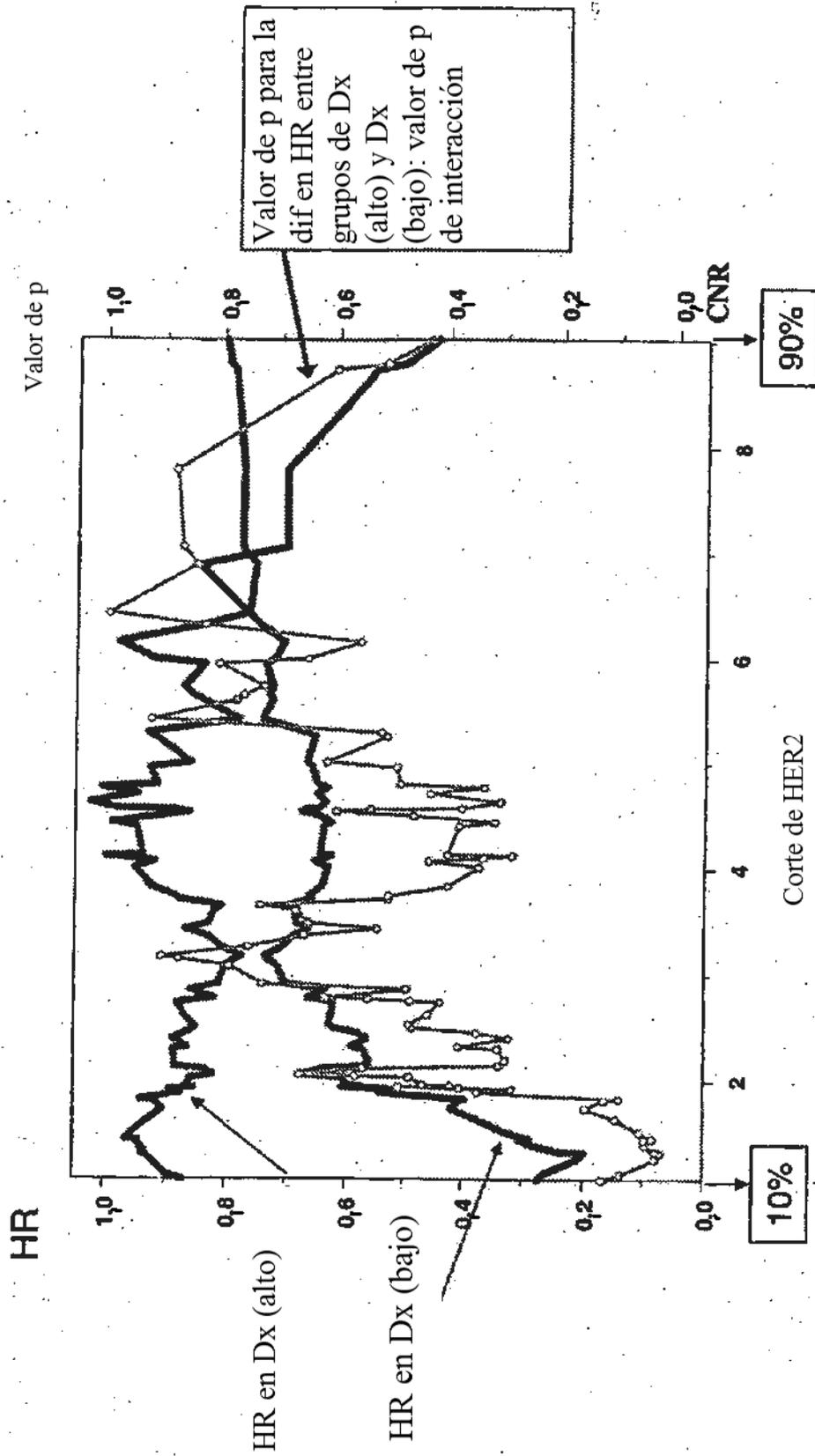
Los valores de p no se ajustaron para comparaciones múltiples.

**FIG. 12B**  
**Análisis exploratorio:**  
**TOC3258g: SLP por cortes de EGFR por qRT-PCR**



Los valores de p no se ajustaron para comparaciones múltiples.

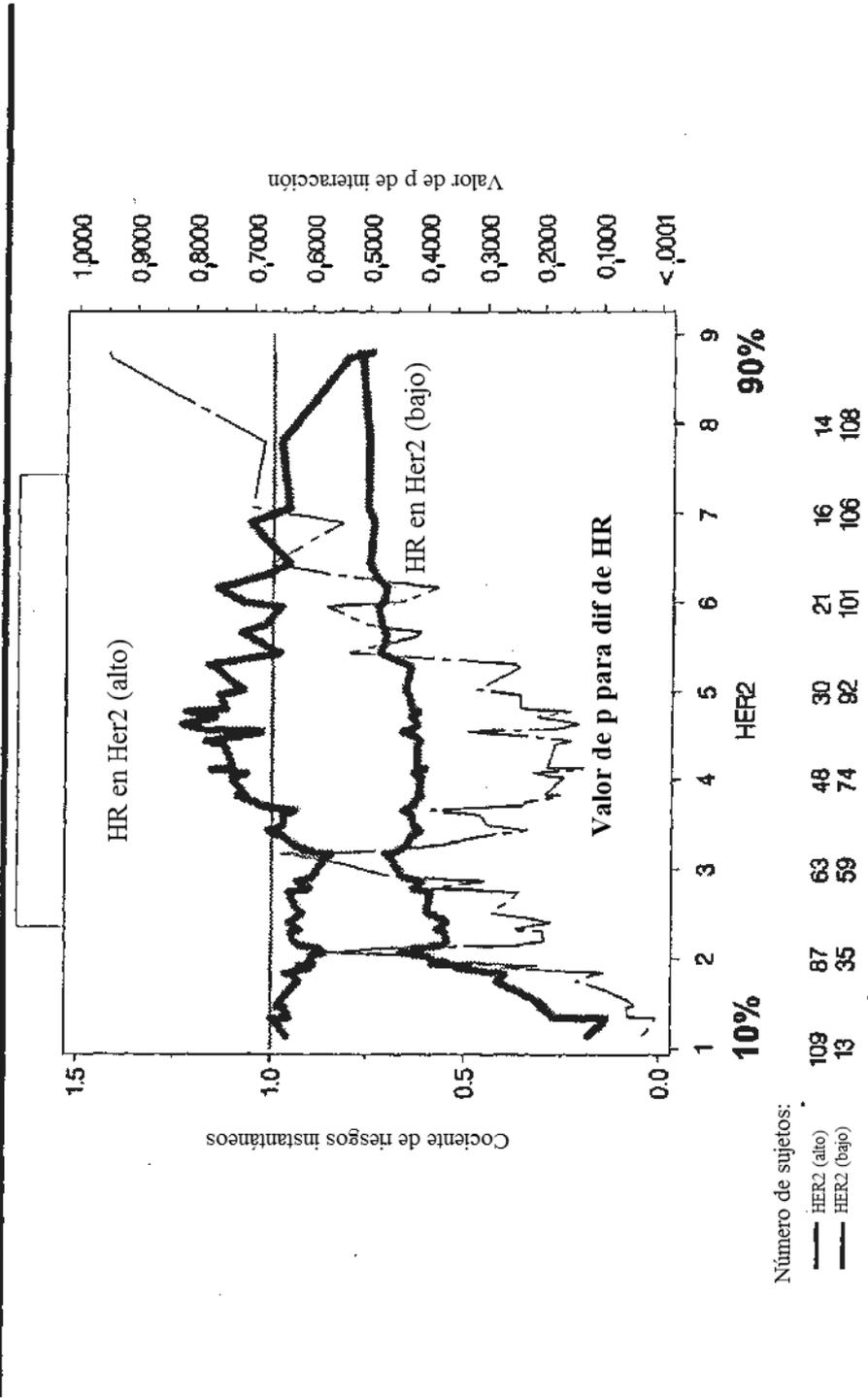
FIG. 13A



Los valores de p no se ajustaron para comparaciones múltiples.

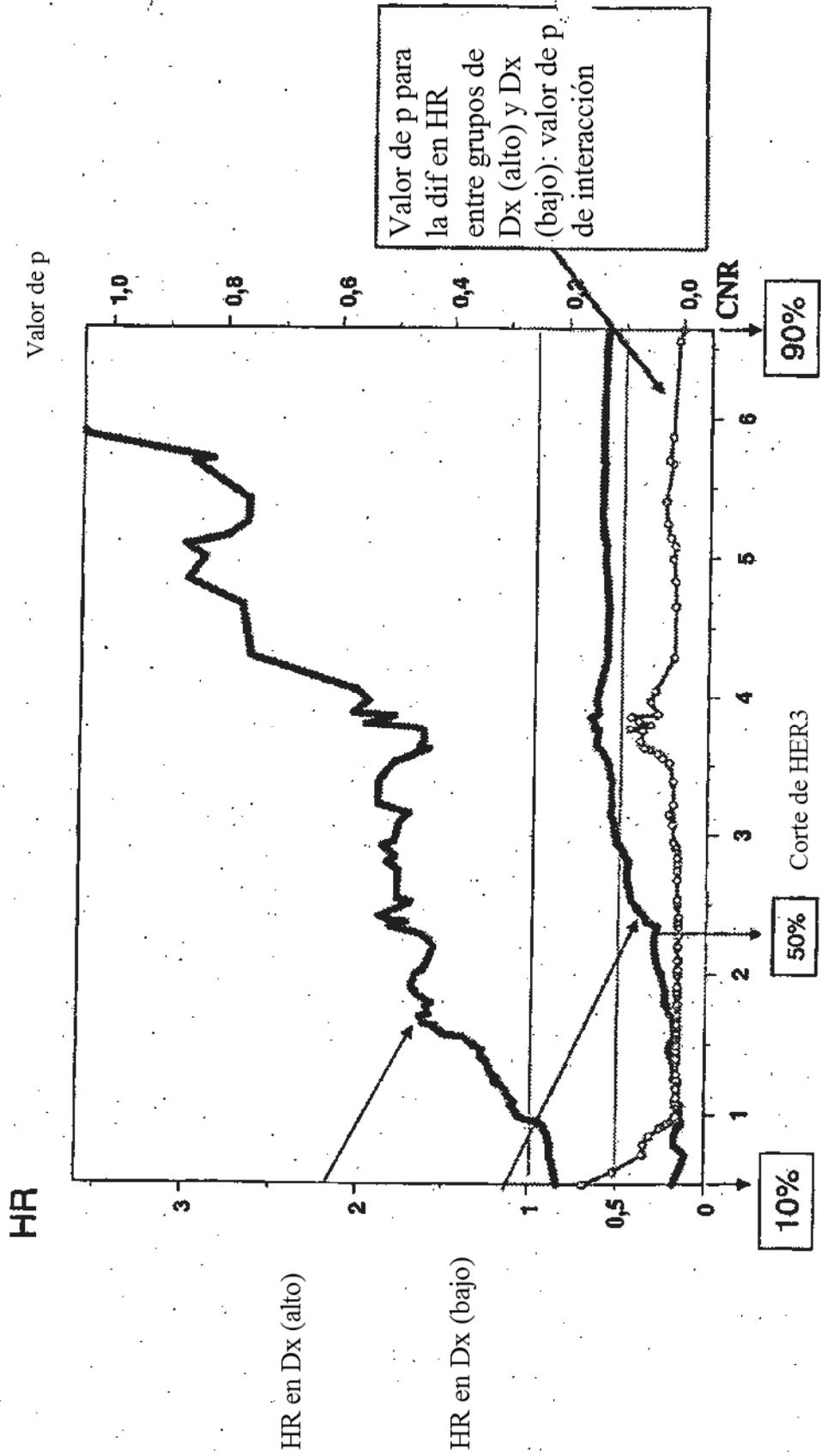
FIG. 13B

TOC3258g: SLP por cortes de HER2 por qRT-PCR



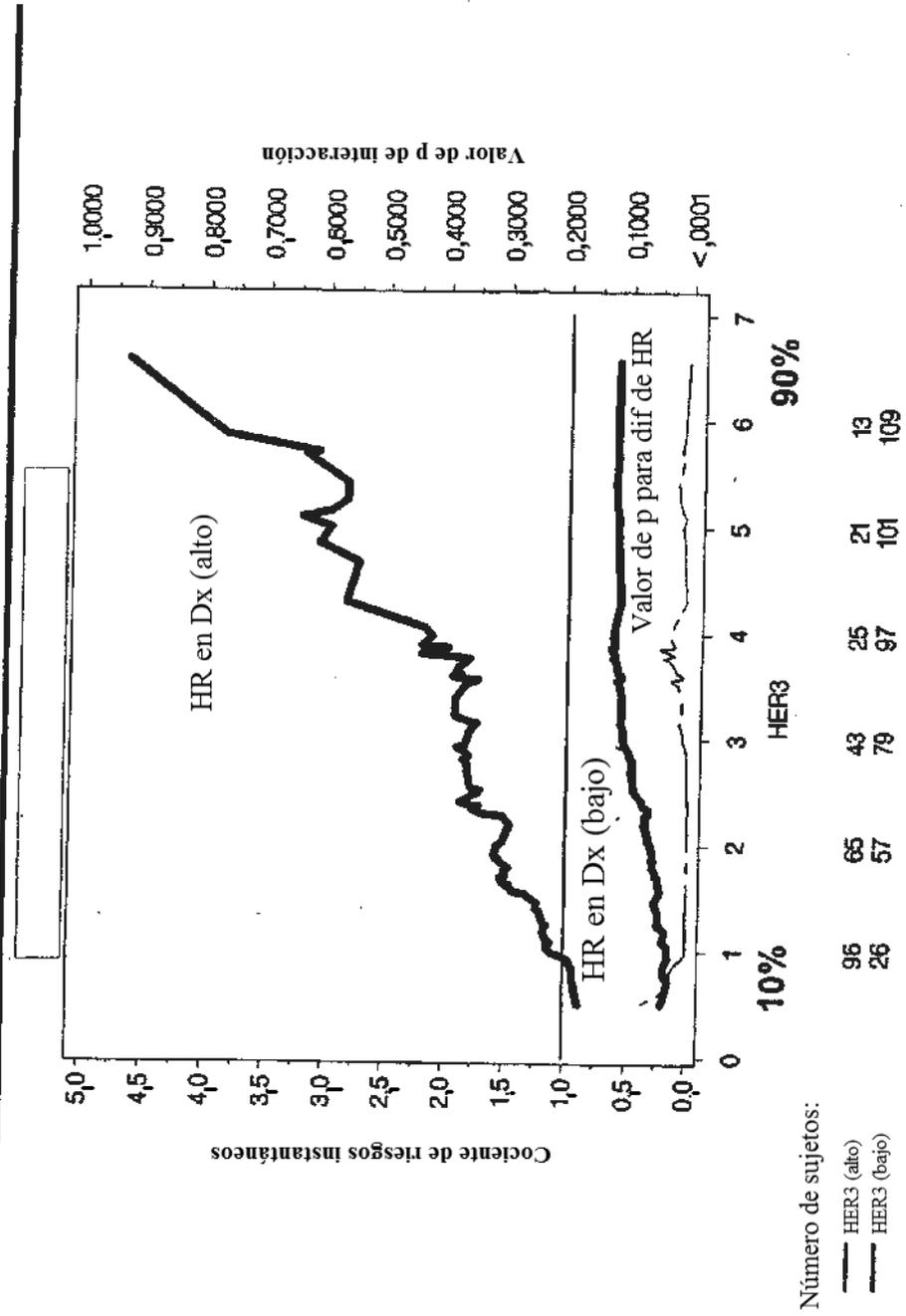
Los valores de p no se ajustaron para comparaciones múltiples.

FIG. 14A



Los valores de p no se ajustaron para comparaciones múltiples.

**FIG. 14B**  
**TOC3258g: SLP por cortes de HER3 por qRT-PCR**



Los valores de p no se ajustaron para comparaciones múltiples.

FIG. 15A

| Corte     |            | Expresión de HER3 bajo |               |                   |                                  |
|-----------|------------|------------------------|---------------|-------------------|----------------------------------|
| Percentil | Valor abs. | N                      | Nº de eventos | HR (IC del 95 %)  | Valor de p del orden logarítmico |
| 20        | 0,99       | 23                     | 16            | 0,09 (0,02, 0,42) | 0,0002                           |
| 25        | 1,19       | 28                     | 21            | 0,13 (0,04, 0,45) | 0,0002                           |
| 30        | 1,4        | 35                     | 28            | 0,18 (0,06, 0,52) | 0,0004                           |
| 35        | 1,57       | 41                     | 32            | 0,16 (0,06, 0,43) | <0,0001                          |
| 40        | 1,71       | 47                     | 36            | 0,19 (0,08, 0,47) | <0,0001                          |
| 45        | 1,88       | 53                     | 40            | 0,23 (0,11, 0,50) | <0,0001                          |
| 50        | 2,28       | 59                     | 45            | 0,30 (0,17, 0,53) | 0,0002                           |
| 55        | 2,41       | 65                     | 52            | 0,36 (0,20, 0,65) | 0,0005                           |
| 60        | 3,14       | 77                     | 63            | 0,57 (0,34, 0,95) | 0,0299                           |
| 70        | 3,59       | 83                     | 69            | 0,62 (0,38, 1,00) | 0,0488                           |
| 75        | 3,8        | 89                     | 75            | 0,67 (0,42, 1,06) | 0,0898                           |
| 80        | 4,29       | 95                     | 78            | 0,59 (0,37, 0,92) | 0,0196                           |

HR frente al percentil de expresión más bajo

Percentil de expresión de HER3 más bajo

Los valores de p no se ajustaron para comparaciones múltiples.

FIG. 15B

SLP por niveles de HER3 por qRT-PCR

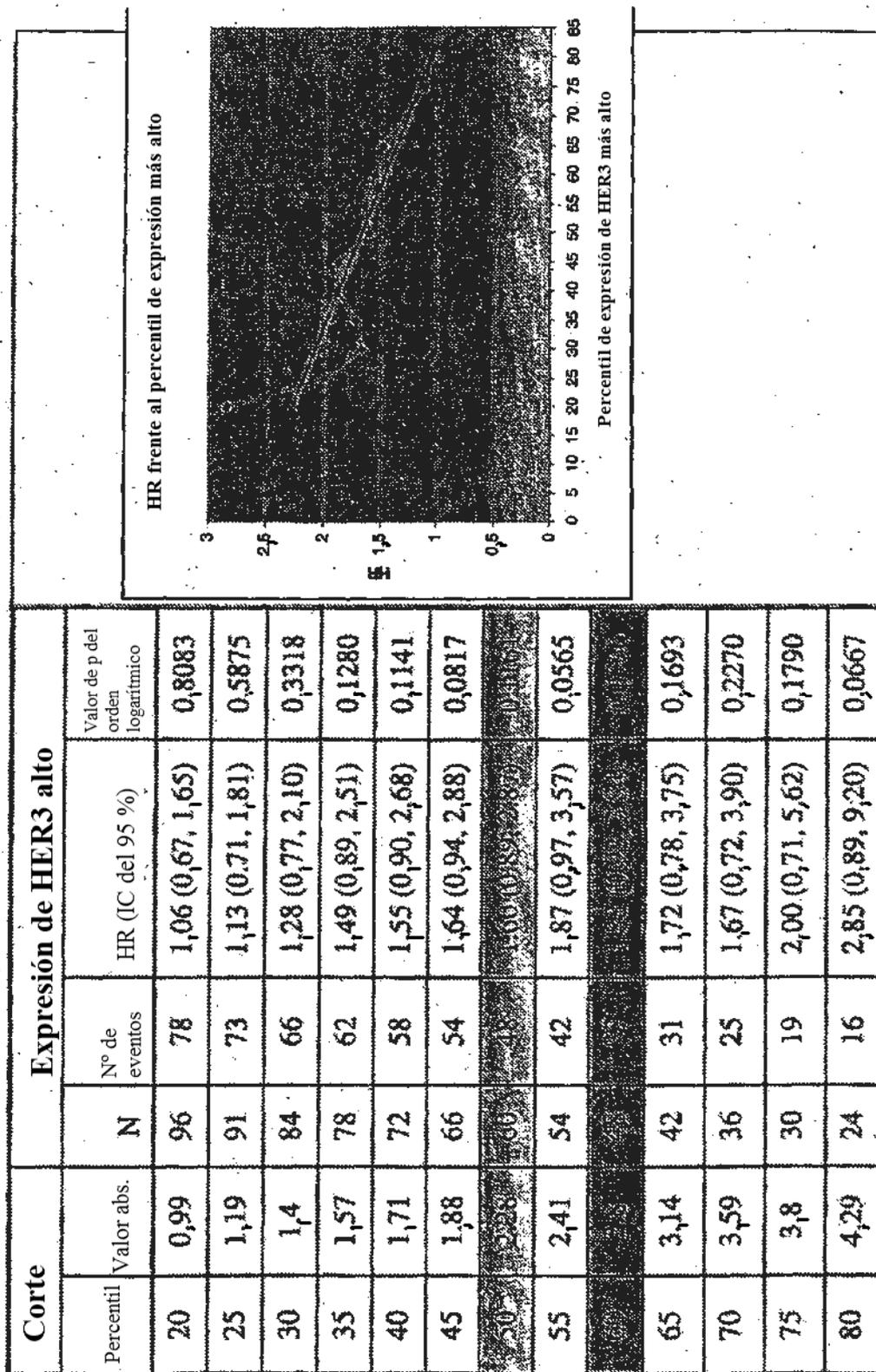
| Valor de corte |            | Expresión de HER3 bajo |               |                   |        | Valor de p del orden logarítmico |
|----------------|------------|------------------------|---------------|-------------------|--------|----------------------------------|
| Percentil      | Valor abs. | N                      | Nº de eventos | HR (IC del 95 %)  |        |                                  |
| 25             | 1,19       | 30                     | 23            | 0,13 (0,04, 0,41) | <,0001 |                                  |
| 30             | 1,39       | 36                     | 29            | 0,22 (0,09, 0,56) | 0,0005 |                                  |
| 35             | 1,56       | 42                     | 33            | 0,20 (0,09, 0,48) | <,0001 |                                  |
| 40             | 1,70       | 48                     | 38            | 0,22 (0,10, 0,50) | <,0001 |                                  |
| 45             | 1,87       | 54                     | 42            | 0,29 (0,14, 0,58) | 0,0002 |                                  |
| 50             | 2,24       | 61                     | 48            | 0,34 (0,18, 0,63) | 0,0004 |                                  |
| 55             | 2,38       | 66                     | 53            | 0,36 (0,20, 0,65) | 0,0005 |                                  |
| 60             | 2,75       | 73                     | 59            | 0,48 (0,28, 0,84) | 0,0080 |                                  |
| 65             | 3,08       | 79                     | 65            | 0,56 (0,34, 0,94) | 0,0255 |                                  |
| 70             | 3,56       | 85                     | 71            | 0,62 (0,38, 1,00) | 0,0459 |                                  |
| 75             | 3,77       | 91                     | 76            | 0,65 (0,41, 1,03) | 0,0650 |                                  |

HR frente al percentil de expresión más bajo

| Percentil | HR   |
|-----------|------|
| 25        | 0,13 |
| 30        | 0,22 |
| 35        | 0,20 |
| 40        | 0,22 |
| 45        | 0,29 |
| 50        | 0,34 |
| 55        | 0,36 |
| 60        | 0,48 |
| 65        | 0,56 |
| 70        | 0,62 |
| 75        | 0,65 |

FIG. 16A



Los valores de p no se ajustaron para comparaciones múltiples.

FIG. 16B

**SLP por niveles de HER3 por qRT-PCR**

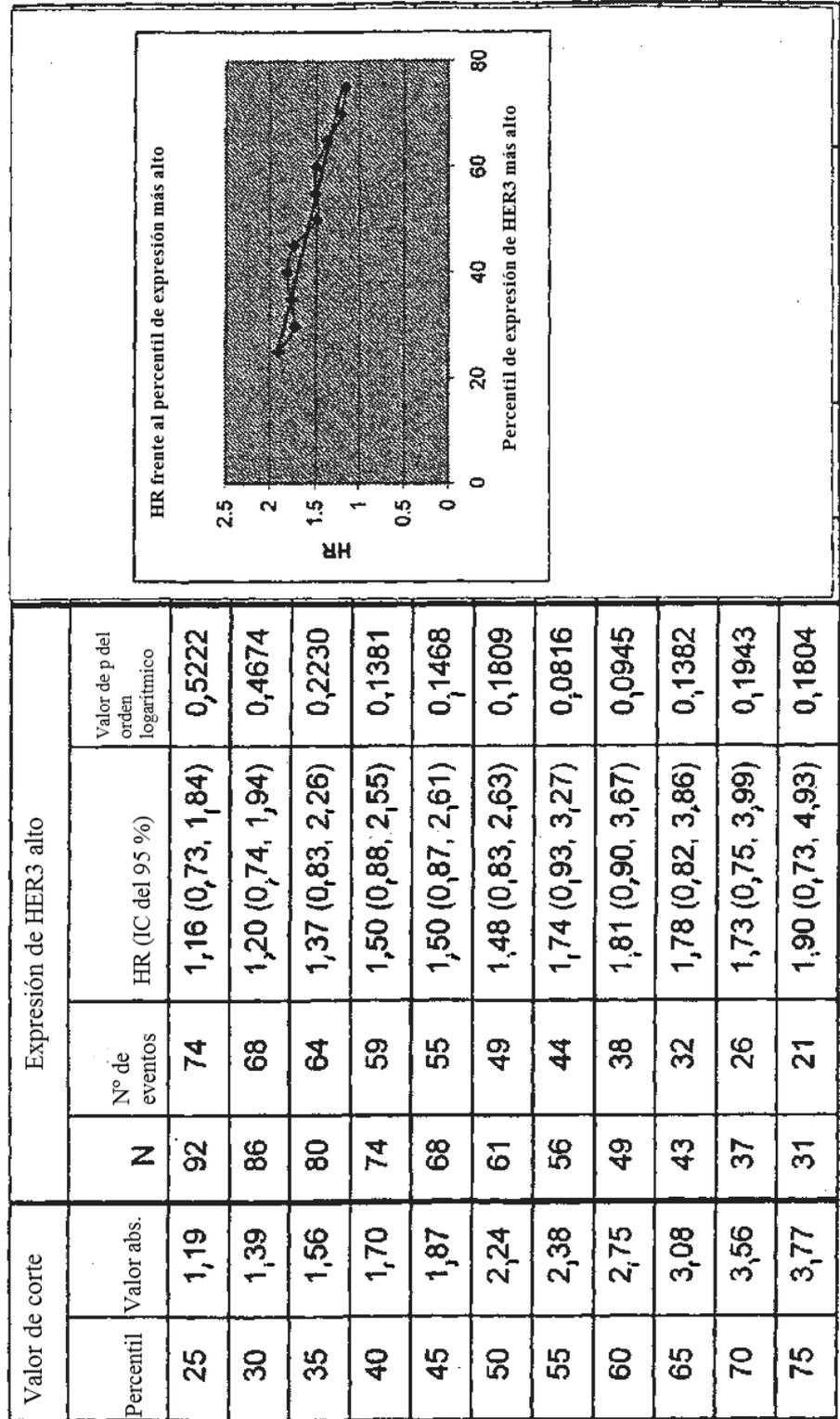


FIG. 17A

| Corte     |            | Expresión de HER3 alto |               |                   |                                  |    | Expresión de HER3 bajo |                   |                                  |  |  |
|-----------|------------|------------------------|---------------|-------------------|----------------------------------|----|------------------------|-------------------|----------------------------------|--|--|
| Percentil | Valor abs. | N                      | Nº de eventos | HR (IC del 95 %)  | Valor de p del orden logarítmico | N  | Nº de eventos          | HR (IC del 95 %)  | Valor de p del orden logarítmico |  |  |
| 20        | 0,99       | 96                     | 78            | 1,06 (0,67, 1,65) | 0,8083                           | 23 | 16                     | 0,09 (0,02, 0,42) | 0,0002                           |  |  |
| 30        | 1,19       | 91                     | 73            | 1,13 (0,71, 1,81) | 0,5875                           | 28 | 21                     | 0,13 (0,04, 0,45) | 0,0002                           |  |  |
| 35        | 1,4        | 84                     | 66            | 1,28 (0,77, 2,10) | 0,3318                           | 35 | 28                     | 0,18 (0,06, 0,52) | 0,0004                           |  |  |
| 40        | 1,57       | 78                     | 62            | 1,49 (0,89, 2,51) | 0,1280                           | 41 | 32                     | 0,16 (0,06, 0,43) | <,0001                           |  |  |
| 45        | 1,71       | 72                     | 58            | 1,55 (0,90, 2,68) | 0,1141                           | 47 | 36                     | 0,19 (0,08, 0,47) | <,0001                           |  |  |
| 50        | 1,88       | 66                     | 54            | 1,64 (0,94, 2,88) | 0,0817                           | 53 | 40                     | 0,23 (0,11, 0,50) | <,0001                           |  |  |
| 55        | 2,06       | 60                     | 48            | 1,80 (0,89, 2,87) | 0,1060                           | 59 | 36                     | 0,36 (0,16, 0,86) | 0,0002                           |  |  |
| 60        | 2,26       | 58                     | 42            | 1,87 (0,97, 3,57) | 0,0565                           | 65 | 52                     | 0,36 (0,20, 0,65) | 0,0005                           |  |  |
| 65        | 3,14       | 42                     | 31            | 1,72 (0,78, 3,75) | 0,1693                           | 77 | 63                     | 0,57 (0,34, 0,95) | 0,0299                           |  |  |
| 70        | 3,59       | 36                     | 25            | 1,67 (0,72, 3,90) | 0,2270                           | 83 | 69                     | 0,62 (0,38, 1,00) | 0,0488                           |  |  |
| 75        | 3,8        | 30                     | 19            | 2,00 (0,71, 5,62) | 0,1790                           | 89 | 75                     | 0,67 (0,42, 1,06) | 0,0898                           |  |  |
| 80        | 4,29       | 24                     | 16            | 2,85 (0,89, 9,20) | 0,0667                           | 95 | 78                     | 0,59 (0,37, 0,92) | 0,0196                           |  |  |

Los valores de p no se ajustaron para comparaciones múltiples.

FIG. 17B

**SLP por niveles de HER3 por qRT-PCR**

| Valor de corte |             | Expresión de HER3 alto |               |                   |                                  | Expresión de HER3 bajo |               |                   |                                  |
|----------------|-------------|------------------------|---------------|-------------------|----------------------------------|------------------------|---------------|-------------------|----------------------------------|
| Percentil      | Valor abs.  | N                      | Nº de eventos | HR (IC del 95 %)  | Valor de p del orden logarítmico | N                      | Nº de eventos | HR (IC del 95 %)  | Valor de p del orden logarítmico |
|                | <b>KM</b> ↑ | 92                     | 74            | 1,16 (0,73, 1,84) | 0,5222                           | 30                     | 23            | 0,13 (0,04, 0,41) | <,0001                           |
| 30             | 1,39        | 86                     | 68            | 1,20 (0,74, 1,94) | 0,4674                           | 36                     | 29            | 0,22 (0,09, 0,56) | 0,0005                           |
| 35             | 1,56        | 80                     | 64            | 1,37 (0,83, 2,26) | 0,2230                           | 42                     | 33            | 0,20 (0,09, 0,48) | <,0001                           |
| 40             | 1,70        | 74                     | 59            | 1,50 (0,88, 2,55) | 0,1381                           | 48                     | 38            | 0,22 (0,10, 0,50) | <,0001                           |
| 45             | 1,87        | 68                     | 55            | 1,50 (0,87, 2,61) | 0,1468                           | 54                     | 42            | 0,29 (0,14, 0,58) | 0,0002                           |
|                | <b>KM</b> ↑ | 61                     | 49            | 1,48 (0,83, 2,63) | 0,1809                           | 61                     | 48            | 0,34 (0,18, 0,63) | 0,0004                           |
| 55             | 2,38        | 56                     | 44            | 1,74 (0,93, 3,27) | 0,0816                           | 66                     | 53            | 0,36 (0,20, 0,65) | 0,0005                           |
| 60             | 2,75        | 49                     | 38            | 1,81 (0,90, 3,67) | 0,0945                           | 73                     | 59            | 0,48 (0,28, 0,84) | 0,0080                           |
| 65             | 3,08        | 43                     | 32            | 1,78 (0,82, 3,86) | 0,1382                           | 79                     | 65            | 0,56 (0,34, 0,94) | 0,0255                           |
| 70             | 3,56        | 37                     | 26            | 1,73 (0,75, 3,99) | 0,1943                           | 85                     | 71            | 0,62 (0,38, 1,00) | 0,0459                           |
| 75             | 3,77        | 31                     | 21            | 1,90 (0,73, 4,93) | 0,1804                           | 91                     | 76            | 0,65 (0,41, 1,03) | 0,0650                           |

FIG. 18A

| HER3 por qRT-PCR    | n  | Nº de eventos | Tratamiento<br>HR (IC del 95 %) | Valor de p del orden logarítmico |
|---------------------|----|---------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 0 – < percentil 25  | 28 | 21            | 0,13 (0,04, 0,45)               | 0,0002                           |
| 25 – < percentil 50 | 31 | 25            | 0,42 (0,17, 1,00)               | 0,0465                           |
| 50 – < percentil 75 | 30 | 29            | 2,11 (0,94, 4,75)               | 0,0631                           |
| 75 – percentil 100  | 30 | 19            | 2,00 (0,71, 5,62)               | 0,1790                           |

Los valores de p no se ajustaron para comparaciones múltiples.

FIG. 18B

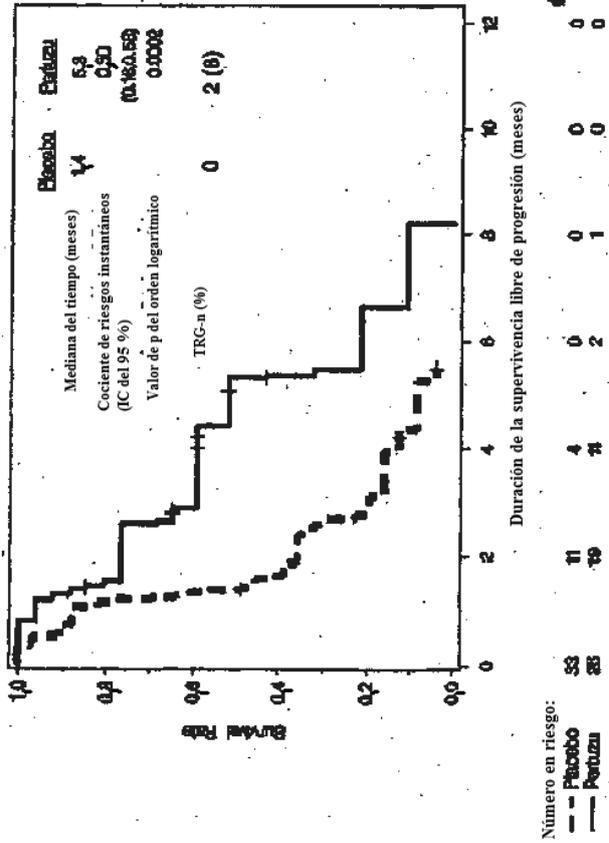
## Análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) por cuartiles de expresión de HER3

| HER3 por qRT-PCR     | N  | Nº de eventos | HR (IC del 95 %)  | Valor de p del orden logarítmico |
|----------------------|----|---------------|-------------------|----------------------------------|
| 0 – < percentil 25   | 30 | 23            | 0,13 (0,04, 0,41) | <,0001                           |
| 25 – < percentil 50  | 31 | 25            | 0,66 (0,29, 1,48) | 0,3181                           |
| 50 – < percentil 75  | 30 | 28            | 1,59 (0,73, 3,44) | 0,2318                           |
| 75 – < percentil 100 | 31 | 21            | 1,90 (0,73, 4,93) | 0,1804                           |

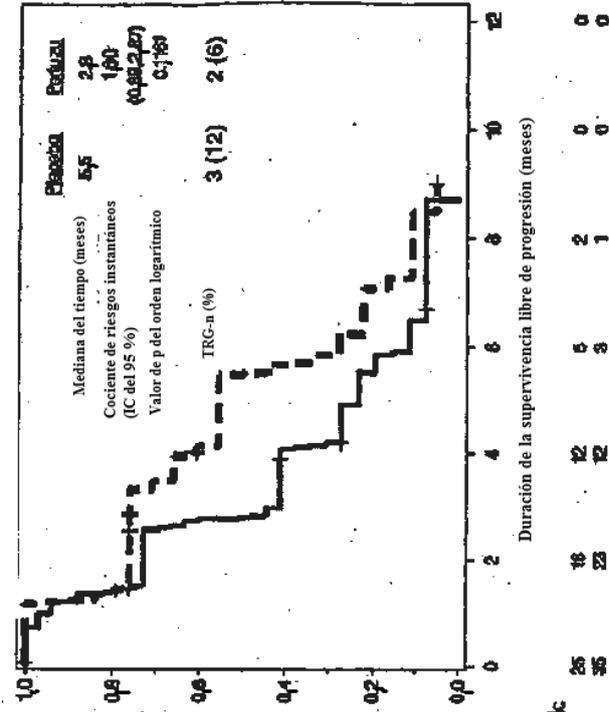
FIG. 19A

|                                    |                                  |
|------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Todos los pacientes</b>         |                                  |
| Mediana (meses)                    | <b>Gem 2,6</b> <b>Pertuz 3,0</b> |
| Cocientes de riesgos instantáneos* | <b>0,67</b>                      |
| (IC del 95 %)                      | <b>(0,43, 1,02)</b>              |
| Valor de p*                        | <b>0,0635</b>                    |
| TRG-n (%)                          | <b>3 (5)</b> <b>5 (8)</b>        |

Expresión de HER3 bajo  
(<= percentil 50, N=59)



Expresión de HER3 alto  
(>= percentil 50, N=60)



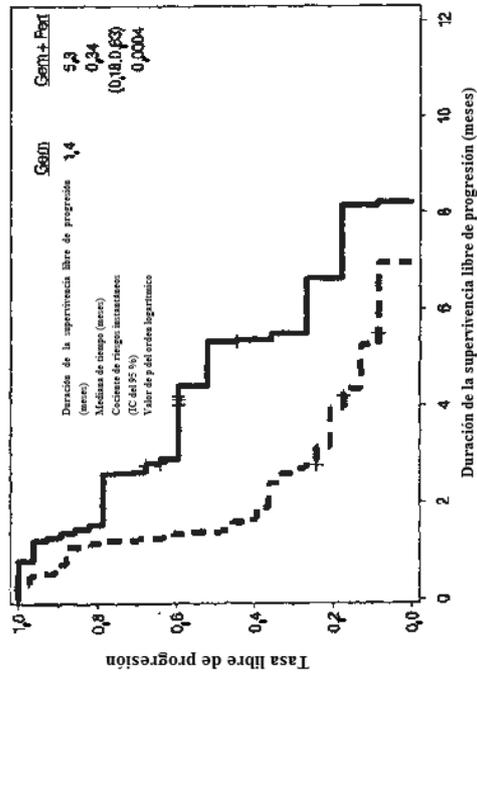
El valor de p para la diferencia en HR entre dos subgrupos de dx es 0,0001  
Nota: percentil 50 = 2,28 CNR

FIG. 19B

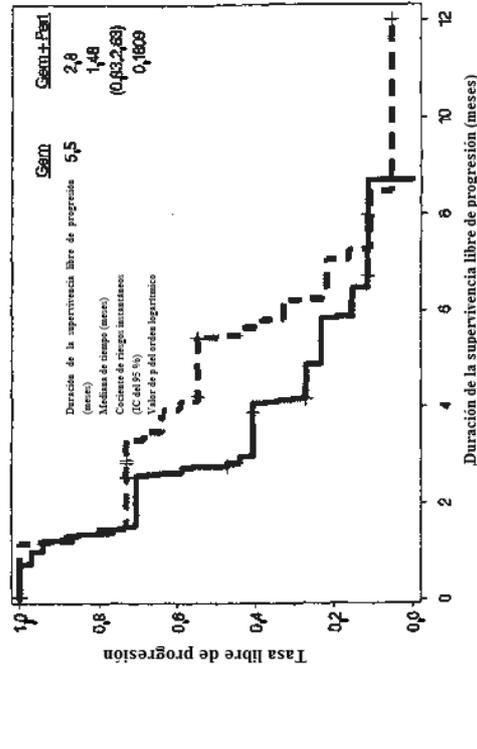
SLP por qRT-PCR de HER3  
Partición 50/50

| Todos los pacientes                              | Gem  | Gem+Peri     |
|--|------|--------------|
| Mediana (meses)                                  | 2,6  | 2,9          |
| Cocientes de riesgos instantáneos* (IC del 95 %) | 0,86 | (0,43, 1,03) |
| Valor de p*                                      |      | 0,07         |

Expresión de HER3 bajo  
(< percentil 50, N=61)



Expresión de HER3 alto  
(< percentil 50, N=61)



El valor de p para la diferencia en HR entre dos subgrupos de dx es 0,0005  
Nota: percentil 50 = 2,24 CNR

FIG. 20A

Expresión de HER3 bajo  
(< percentil 25, N=28)

Expresión de HER3 alto  
(≥ percentil 25, N=91)

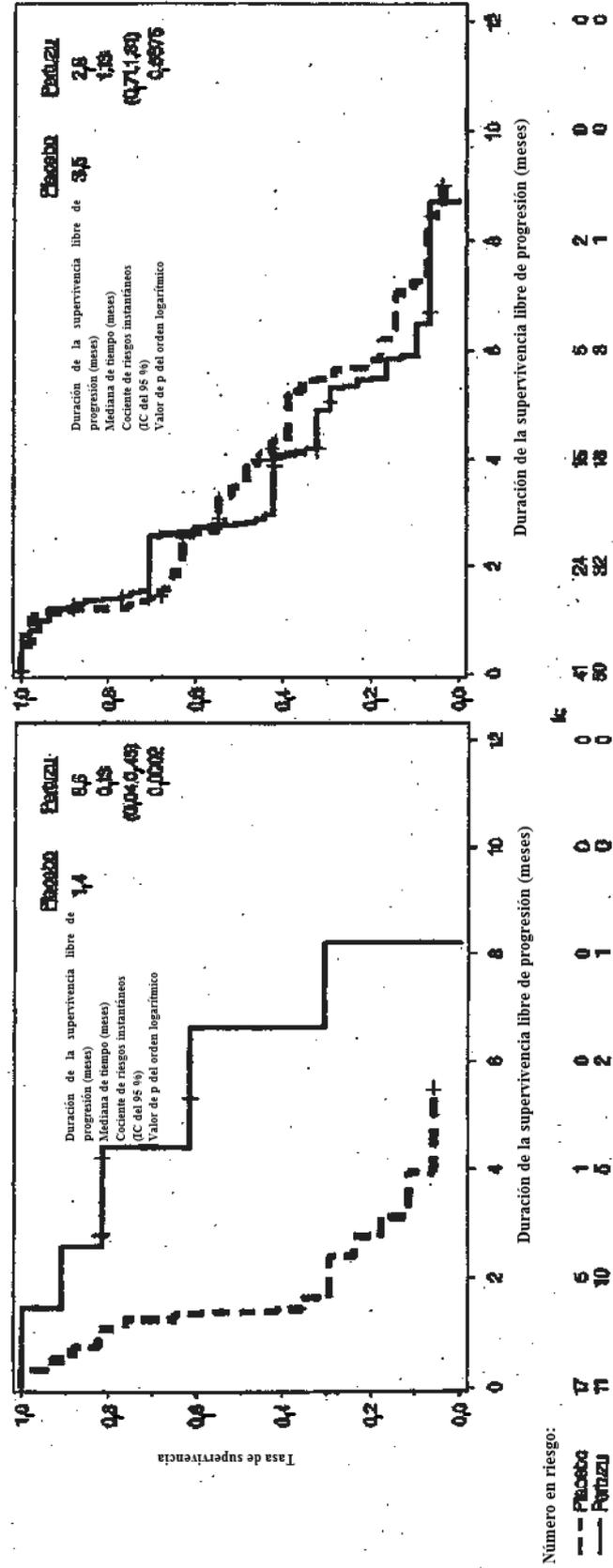
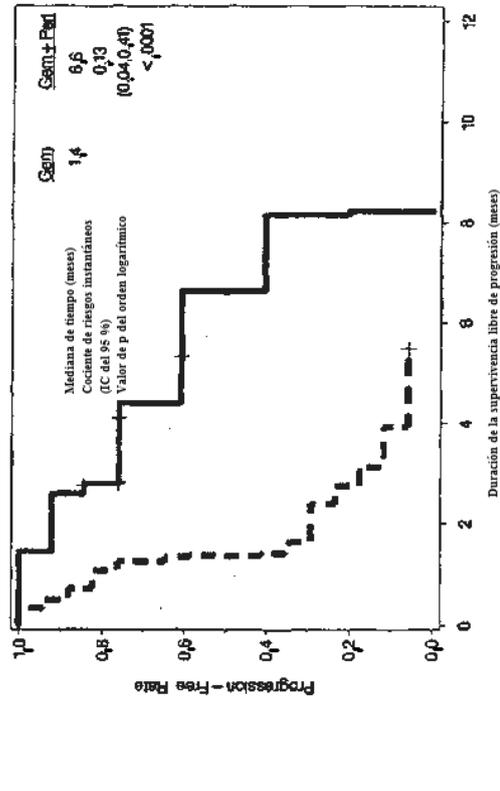


FIG. 20B

SLP por qRT-PCR de HER3  
Partición 25/75

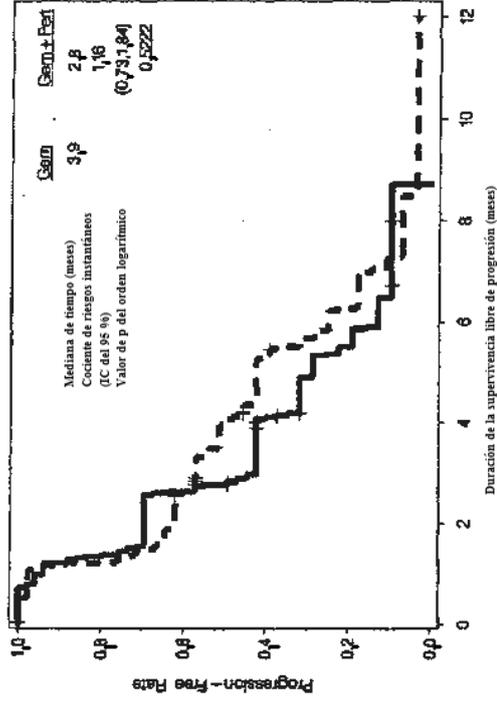
| Todos los pacientes                              |     | Gem               | Gem+Perfús |
|--|-----|-------------------|------------|
| Mediana (meses)                                  | 2,6 | 2,9               |            |
| Cocientes de riesgos instantáneos* (IC del 95 %) |     | 0,66 (0,43, 1,03) |            |
| Valor de p*                                      |     | 0,07              |            |

Expresión de HER3 bajo  
(<= percentil 25, N=30)



| Número en riesgo |    | 0  | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 |
|------------------|----|----|---|---|---|---|----|----|
| - - - Gem        | 17 | 5  | 1 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  |
| — Gem+Perf       | 13 | 12 | 7 | 3 | 2 | 0 | 0  | 0  |

Expresión de HER3 alto  
(>= percentil 25, N=92)

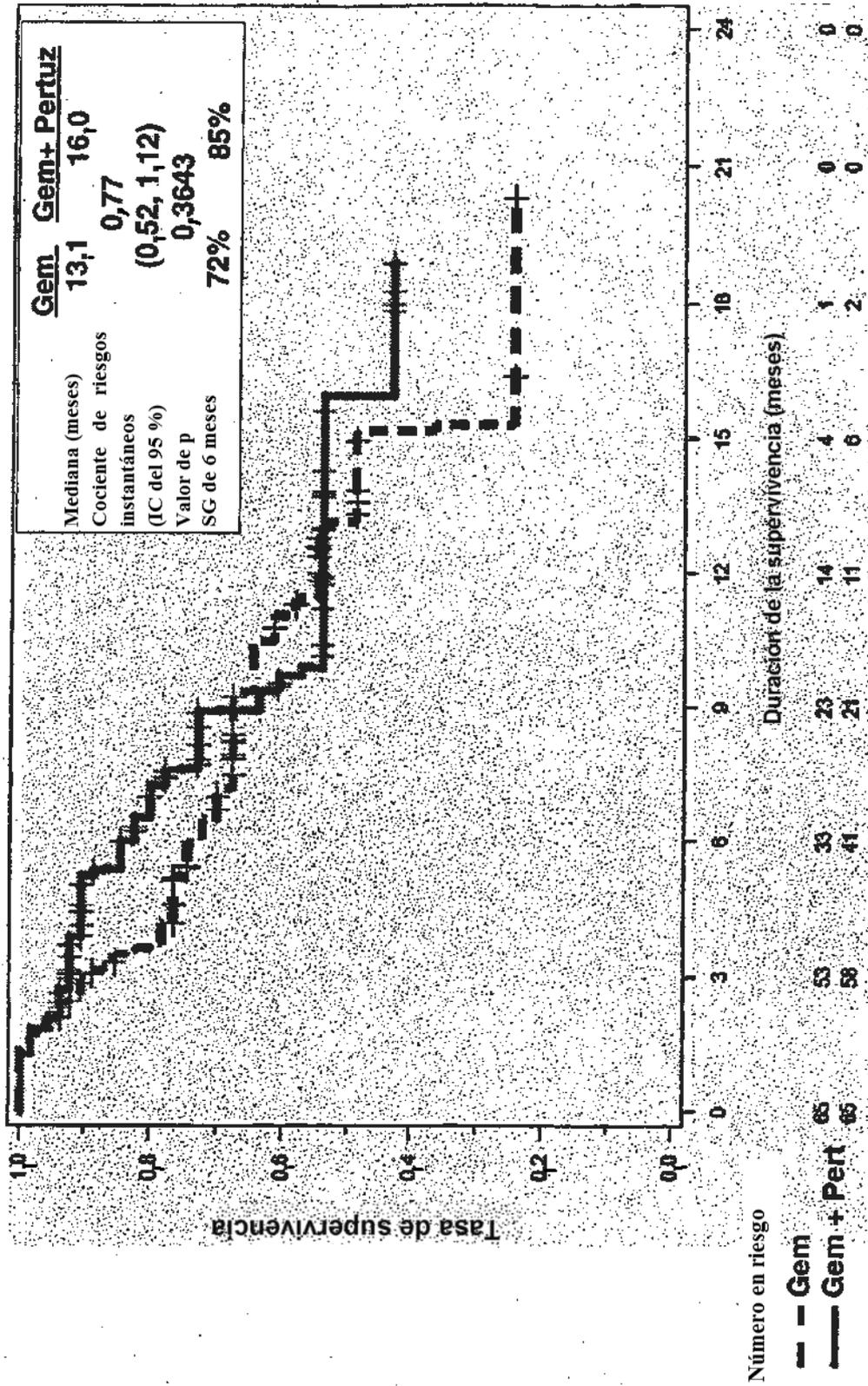


| Número en riesgo |    | 0  | 2  | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 |
|------------------|----|----|----|---|---|---|----|----|
| - - - Gem        | 42 | 26 | 17 | 7 | 2 | 1 | 0  | 0  |
| — Gem+Perf       | 50 | 34 | 18 | 4 | 1 | 0 | 0  | 0  |

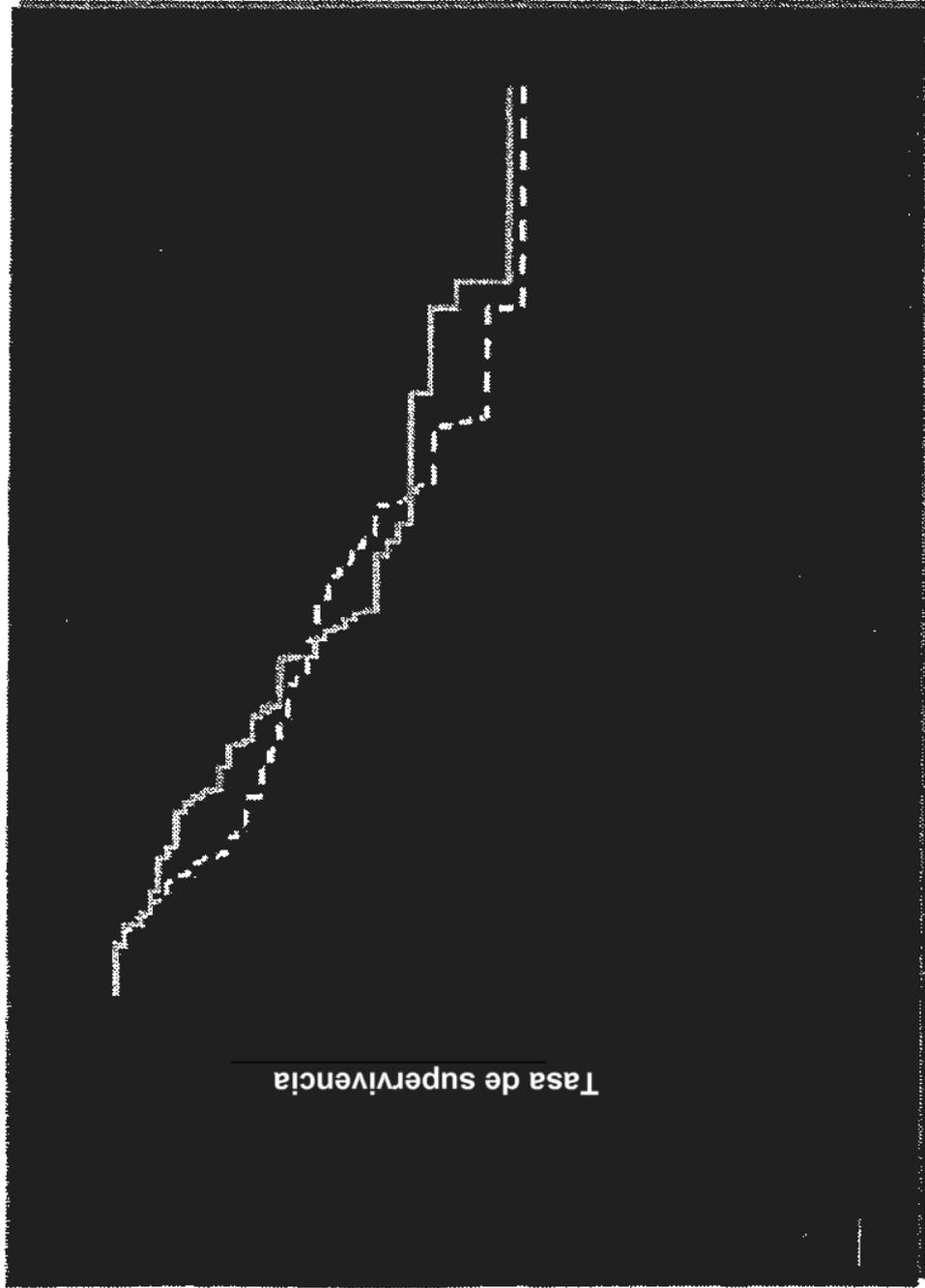
El valor de p para la diferencia en HR entre dos subgrupos de dx es 0,0003

Nota: percentil 25 = 1,19 CNR.

FIG. 21A



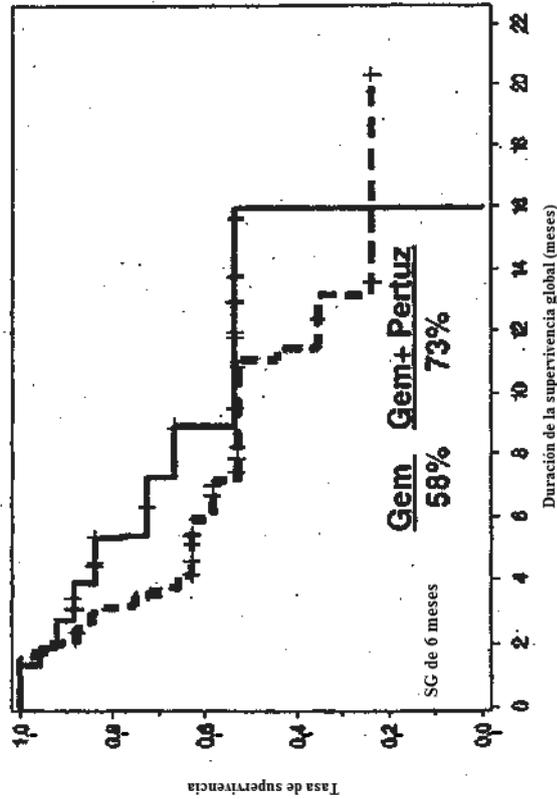
**Supervivencia global preliminar**  
**(71 muertes a partir del 20 de abril de 2007)**  
**FIG. 21B**



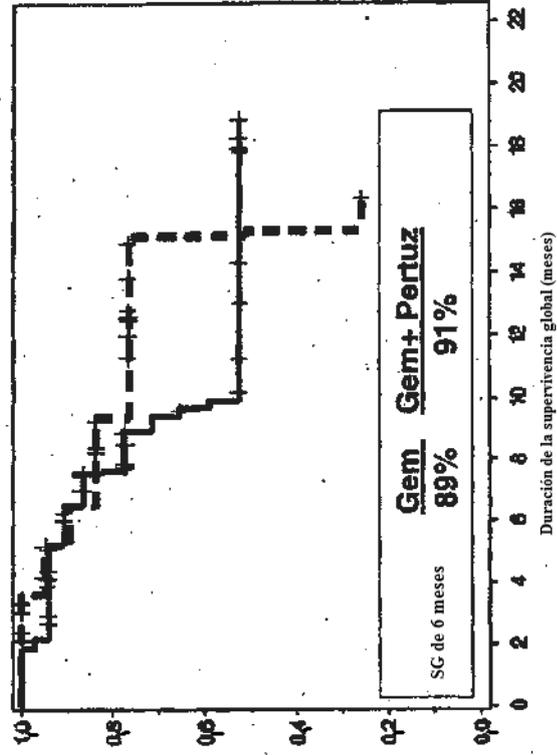
\*Estimado usando el modelo de Cox estratificado y la prueba del orden logarítmico estratificada por factores de estratificación por aleatorización (ECOG PS, número de tratamientos previos para enfermedad resistente a platino y capacidad de medición de la enfermedad).

FIG. 22A

Expresión de HER3 (bajo)  
(< percentil 50)



Expresión de HER3 (alto)  
(> percentil 50)



Número en riesgo

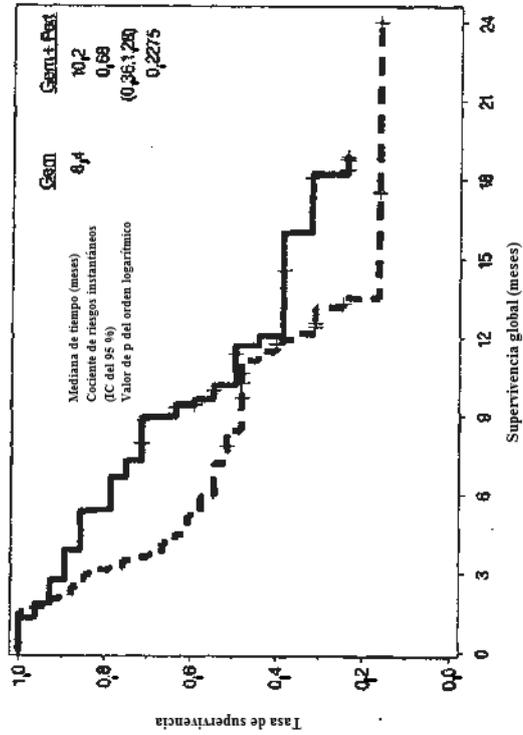
|              | 0  | 2  | 4  | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 | 18 | 20 | 22 |
|--------------|----|----|----|---|---|----|----|----|----|----|----|----|
| --- Gem      | 28 | 21 | 18 | 8 | 7 | 4  | 1  | 1  | 1  | 1  | 0  | 0  |
| — Gem+Pertuz | 26 | 19 | 11 | 7 | 6 | 2  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |

Nota: percentil 50 = 2,28 CNR.

|                          |                   |
|--------------------------|-------------------|
| <b>Los 130 pacientes</b> |                   |
| <u>Gem</u>               | <u>Gem+Pertuz</u> |
| 72%                      | 85%               |
| SG de 6 meses            |                   |

**FIG. 22B**  
**SG preliminar por qRT-PCR de HER3 Partición 50/50**

**Expresión de HER3 (bajo)**  
 (< percentil 50, N=61)



**Expresión de HER3 (alto)**  
 (> percentil 50, N=61)

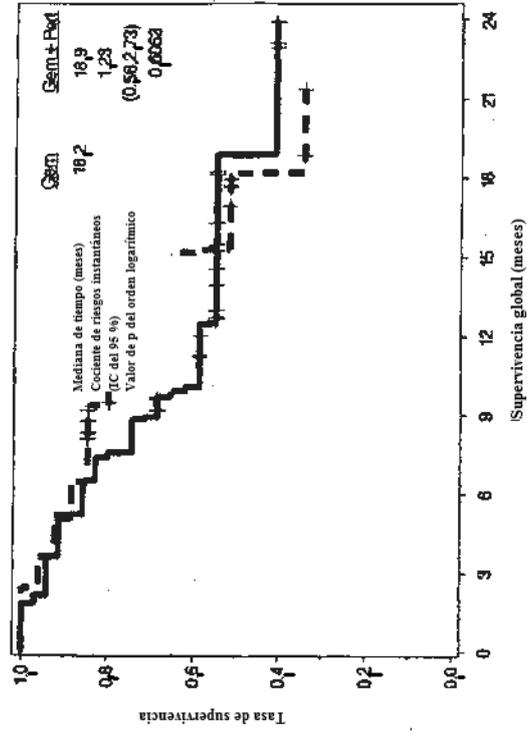


FIG. 23A

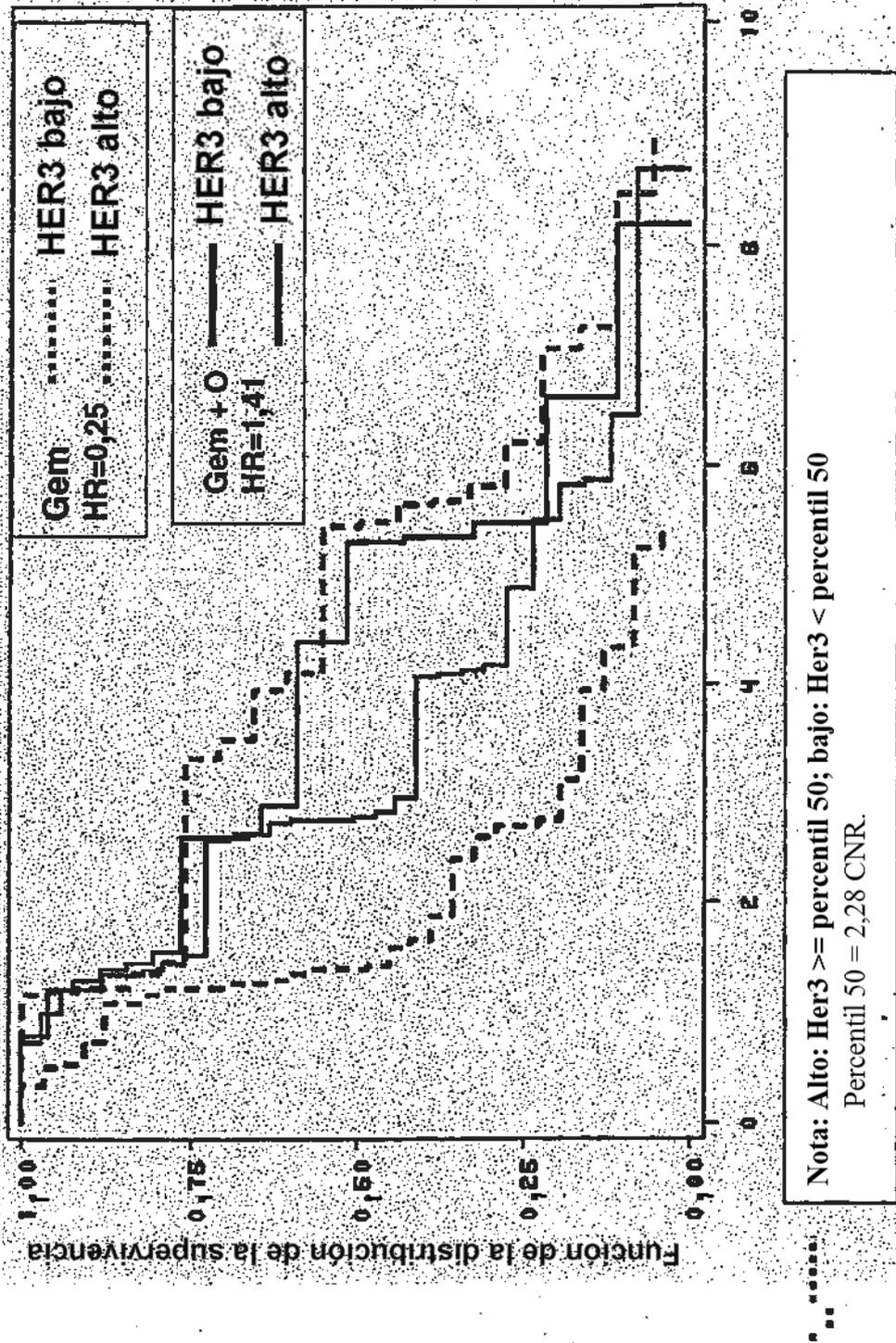


FIG. 23B

# SLP por HER3

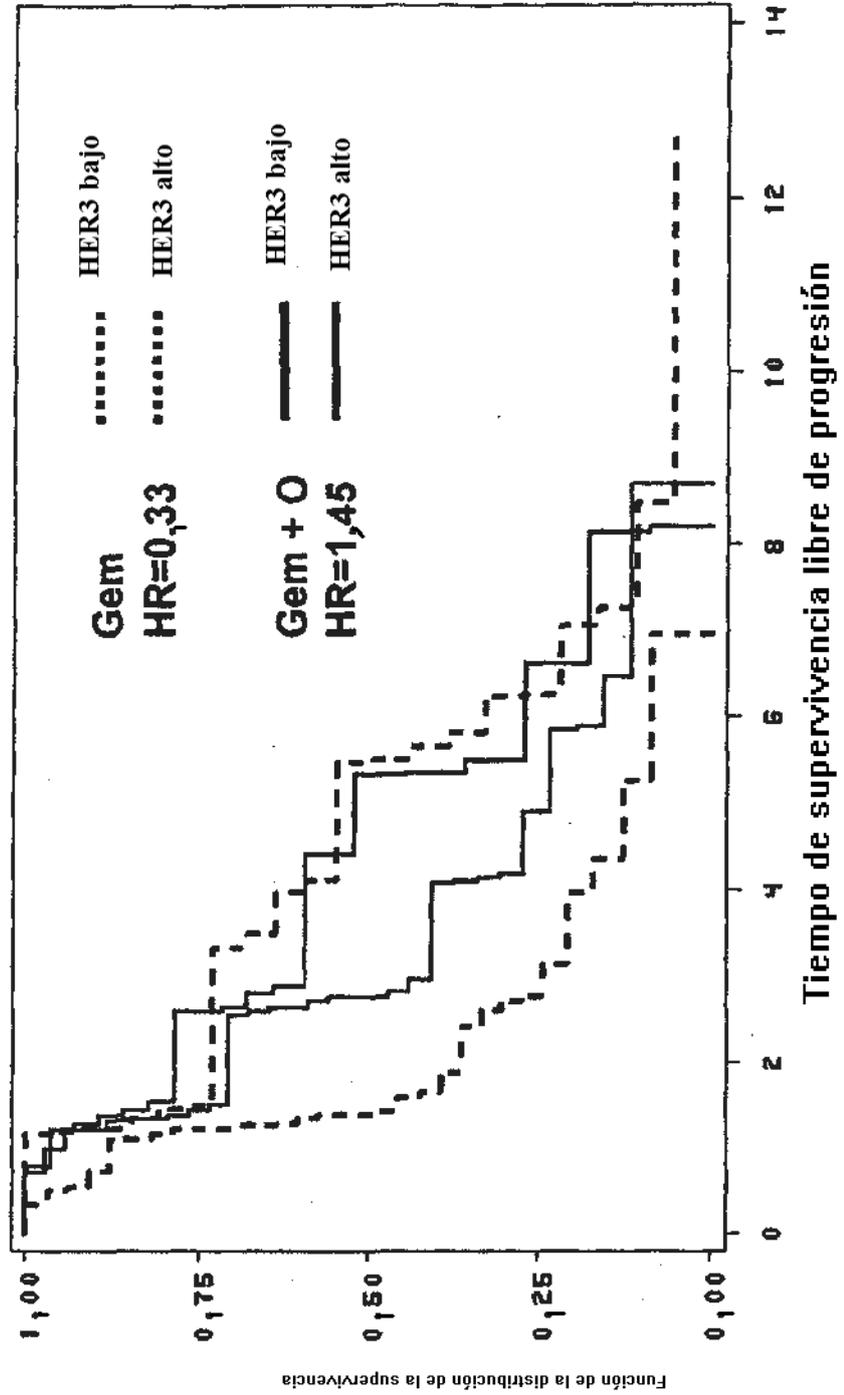


FIG. 24A

*Pertuzumab en cáncer de ovario resistente a platino, SLP por HER3 de qRT-PCR*

| Cutoff Value | HER3high G |         |                   | HER3low G |         |                   | HER3low map |         |                    | Gain + Chromatid (n=81) |    |         | Alone (n=58)      |        |         | Logrank P-value | Logrank P-value | P-value |
|--------------|------------|---------|-------------------|-----------|---------|-------------------|-------------|---------|--------------------|-------------------------|----|---------|-------------------|--------|---------|-----------------|-----------------|---------|
|              | N          | Eventos | HR (95%CI)        | N         | Eventos | HR (95%CI)        | #           | Eventos | HR (95%CI)         | Dx(+)                   | #  | Eventos | Dx(+)             | #      | Eventos |                 |                 |         |
| 0            | 114        | 9       | 0.81 (0.53, 1.1)  | 8         | 3       | 0.00 (0.1, 1.28)  | 44          | 1       | 1.1 (0.21, 1.46)   | 0.8559                  | 47 | 2       | 0.32 (0.07, 1.36) | 0.1073 | 0.11    | 0.11            | 0.11            |         |
| 1            | 108        | 11      | 0.84 (0.55, 1.1)  | 7         | 1       | 0.02 (0.00, 0.60) | 44          | 2       | 2.54 (0.35, 18.1)  | 0.0049                  | 43 | 0       | 0.64 (0.30, 1.1)  | 0.4723 | 0.2021  | 0.2021          | 0.2021          |         |
| 5            | 102        | 8       | 0.92 (0.60, 1.42) | 7         | 1       | 0.02 (0.00, 0.60) | 43          | 4       | 3.68 (1.18, 11.46) | 0.0048                  | 46 | 1       | 0.49 (0.26, 0.9)  | 0.0001 | 0.0001  | 0.0001          | 0.0001          |         |
| 25           | 91         | 7       | 1.13 (0.71, 1.83) | 23        | 18      | 0.09 (0.03, 0.42) | 4           | 4       | 0.82 (0.22, 3.1)   | 0.0002                  | 33 | 0       | 0.40 (0.25, 0.80) | 0.0007 | 0.0007  | 0.0007          | 0.0007          |         |
| 100          | 8          | 73      | 0.67 (0.47, 0.97) | 26        | 1       | 0.13 (0.01, 0.45) | 4           | 5       | 2.7 (0.91, 8.1)    | 0.0004                  | 27 | 2       | 0.27 (0.1, 0.76)  | 0.0004 | 0.0004  | 0.0004          | 0.0004          |         |
| 30           | 84         | 73      | 1.26 (0.71, 2.1)  | 35        | 28      | 0.18 (0.06, 0.53) | 7           | 6       | 2.25 (1.00, 5.08)  | 0.0004                  | 21 | 28      | 0.27 (0.1, 0.76)  | 0.0004 | 0.0004  | 0.0004          | 0.0004          |         |
| 35           | 78         | 66      | 1.49 (0.84, 2.56) | 40        | 32      | 0.23 (0.08, 0.63) | 36          | 1       | 2.39 (0.04, 5.18)  | 0.0004                  | 21 | 28      | 0.27 (0.1, 0.76)  | 0.0004 | 0.0004  | 0.0004          | 0.0004          |         |
| 50           | 54         | 54      | 1.89 (0.81, 4.37) | 62        | 62      | 0.38 (0.03, 0.67) | 28          | 3       | 1.33 (0.71, 2.44)  | 0.0004                  | 14 | 35      | 0.28 (0.12, 0.63) | 0.0004 | 0.0004  | 0.0004          | 0.0004          |         |
| 65           | 42         | 84      | 1.72 (0.78, 3.8)  | 63        | 63      | 0.57 (0.34, 0.96) | 22          | 0       | 0.4 (0.1, 1.3)     | 0.0004                  | 9  | 40      | 0.38 (0.17, 0.76) | 0.0004 | 0.0004  | 0.0004          | 0.0004          |         |
| 70           | 38         | 25      | 0.67 (0.39, 1.1)  | 77        | 69      | 0.82 (0.49, 1.3)  | 7           | 23      | 0.82 (0.44, 1.5)   | 0.468                   | 0  | 41      | 0.33 (0.17, 0.7)  | 0.0023 | 0.0023  | 0.0023          | 0.0023          |         |
| 75           | 34         | 9       | 2.00 (0.72, 5.62) | 63        | 75      | 0.97 (0.59, 1.6)  | 14          | 34      | 1.77 (0.40, 7.8)   | 0.0004                  | 6  | 44      | 0.39 (0.1, 1.07)  | 0.0004 | 0.0004  | 0.0004          | 0.0004          |         |
| 80           | 28         | 6       | 2.05 (0.69, 6.13) | 78        | 78      | 0.1 (0.01, 0.92)  | 1           | 3       | 1.40 (0.70, 2.8)   | 0.0004                  | 4  | 46      | 0.32 (0.1, 0.94)  | 0.0004 | 0.0004  | 0.0004          | 0.0004          |         |
| 85           | 28         | 6       | 2.05 (0.69, 6.13) | 78        | 78      | 0.1 (0.01, 0.92)  | 1           | 3       | 1.40 (0.70, 2.8)   | 0.0004                  | 4  | 46      | 0.32 (0.1, 0.94)  | 0.0004 | 0.0004  | 0.0004          | 0.0004          |         |
| 90           | 28         | 6       | 2.05 (0.69, 6.13) | 78        | 78      | 0.1 (0.01, 0.92)  | 1           | 3       | 1.40 (0.70, 2.8)   | 0.0004                  | 4  | 46      | 0.32 (0.1, 0.94)  | 0.0004 | 0.0004  | 0.0004          | 0.0004          |         |
| 95           | 28         | 6       | 2.05 (0.69, 6.13) | 78        | 78      | 0.1 (0.01, 0.92)  | 1           | 3       | 1.40 (0.70, 2.8)   | 0.0004                  | 4  | 46      | 0.32 (0.1, 0.94)  | 0.0004 | 0.0004  | 0.0004          | 0.0004          |         |
| 100          | 28         | 6       | 2.05 (0.69, 6.13) | 78        | 78      | 0.1 (0.01, 0.92)  | 1           | 3       | 1.40 (0.70, 2.8)   | 0.0004                  | 4  | 46      | 0.32 (0.1, 0.94)  | 0.0004 | 0.0004  | 0.0004          | 0.0004          |         |

Noe Th dLog-ran P0 u s 0.270 i a form con

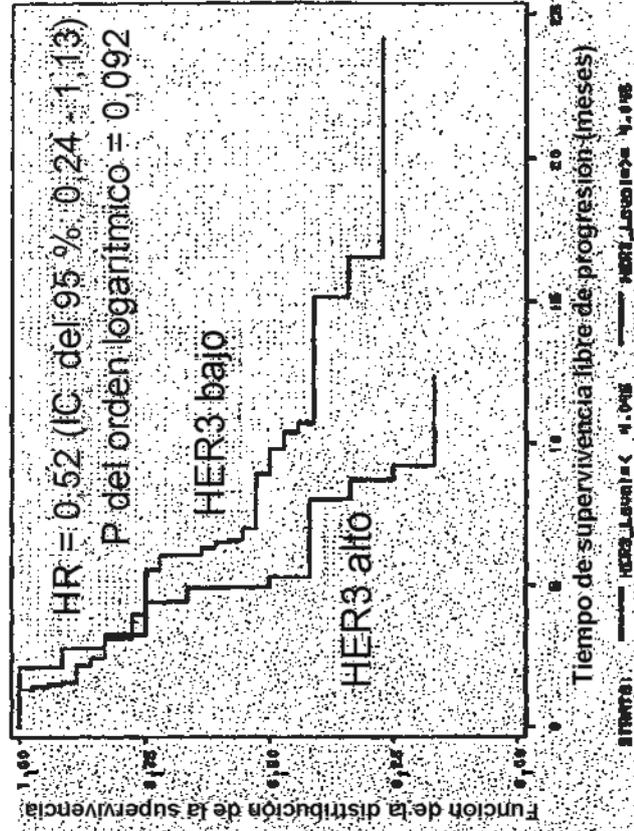
**FIG. 24B**  
**Pertuzumab en cáncer de ovario resistente a platino,**  
**SLP por HER3 de qRT-PCR**

| Valor de corte<br>Percentil | Grupo de dx (alto) |                  |                                  | Grupo de dx (bajo) |                  |                                  | Gem + Pertuzumab (n=63)    |                            |                  | Gem sola (n=59)                  |                            |                            |                  |                           |                   |                   |        |         |
|-----------------------------|--------------------|------------------|----------------------------------|--------------------|------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|--------|---------|
|                             | Nº de eventos      | HR (IC del 95 %) | Valor de p del orden logarítmico | Nº de eventos      | HR (IC del 95 %) | Valor de p del orden logarítmico | Nº de eventos en Dx (alto) | Nº de eventos en Dx (bajo) | HR (IC del 95 %) | Valor de p del orden logarítmico | Nº de eventos en Dx (alto) | Nº de eventos en Dx (bajo) | HR (IC del 95 %) | Valor de p de interacción |                   |                   |        |         |
| 20                          | 99                 | 58               | 1,09 (0,70, 1,70)                | 0,6973             | 24               | 17                               | 0,08 (0,02, 0,37)          | <0,0001                    | 42               | 5                                | 3,20 (1,25, 8,23)          | 0,0109                     | 38               | 12                        | 0,47 (0,24, 0,93) | 0,0272            | 0,0007 |         |
| 25                          | 1,19               | 92               | 74                               | 1,16 (0,73, 1,84)  | 0,5222           | 30                               | 23                         | 0,13 (0,04, 0,41)          | <0,0001          | 40                               | 7                          | 2,24 (1,03, 5,30)          | 0,0360           | 34                        | 16                | 0,38 (0,20, 0,72) | 0,0020 | 0,0003  |
| 30                          | 1,39               | 86               | 68                               | 1,20 (0,74, 1,94)  | 0,4674           | 36                               | 29                         | 0,22 (0,09, 0,56)          | 0,0005           | 39                               | 8                          | 2,03 (0,93, 4,39)          | 0,0683           | 29                        | 21                | 0,44 (0,24, 0,79) | 0,0046 | 0,0014  |
| 35                          | 1,56               | 80               | 64                               | 1,37 (0,83, 2,26)  | 0,2230           | 42                               | 33                         | 0,20 (0,09, 0,48)          | <0,0001          | 36                               | 9                          | 2,19 (1,05, 4,58)          | 0,0330           | 26                        | 24                | 0,37 (0,21, 0,67) | 0,0007 | 0,0001  |
| 40                          | 1,70               | 74               | 59                               | 1,50 (0,88, 2,55)  | 0,1381           | 48                               | 38                         | 0,22 (0,10, 0,50)          | <0,0001          | 37                               | 10                         | 2,14 (1,06, 4,34)          | 0,0312           | 22                        | 28                | 0,35 (0,19, 0,63) | 0,0004 | <0,0001 |
| 45                          | 1,87               | 68               | 55                               | 1,50 (0,87, 2,61)  | 0,1468           | 54                               | 42                         | 0,29 (0,14, 0,58)          | 0,0002           | 34                               | 13                         | 1,84 (0,97, 3,51)          | 0,0617           | 21                        | 29                | 0,35 (0,19, 0,65) | 0,0005 | 0,0002  |
| 50                          | 2,24               | 61               | 49                               | 1,48 (0,83, 2,63)  | 0,1809           | 61                               | 48                         | 0,34 (0,16, 0,63)          | 0,0004           | 29                               | 18                         | 1,45 (0,80, 2,62)          | 0,2230           | 20                        | 30                | 0,33 (0,18, 0,62) | 0,0003 | 0,0005  |
| 55                          | 2,38               | 56               | 44                               | 1,74 (0,93, 3,27)  | 0,0816           | 66                               | 53                         | 0,36 (0,20, 0,65)          | 0,0005           | 28                               | 18                         | 1,45 (0,80, 2,62)          | 0,2230           | 16                        | 35                | 0,31 (0,16, 0,60) | 0,0002 | 0,0004  |
| 60                          | 2,75               | 49               | 38                               | 1,81 (0,90, 3,67)  | 0,0945           | 73                               | 59                         | 0,48 (0,28, 0,84)          | 0,0080           | 27                               | 20                         | 1,33 (0,74, 2,38)          | 0,3459           | 11                        | 39                | 0,37 (0,19, 0,73) | 0,0030 | 0,0030  |
| 65                          | 3,08               | 43               | 32                               | 1,78 (0,82, 3,86)  | 0,1382           | 79                               | 65                         | 0,56 (0,34, 0,94)          | 0,0255           | 23                               | 24                         | 1,14 (0,64, 2,04)          | 0,6516           | 9                         | 41                | 0,36 (0,18, 0,76) | 0,0050 | 0,0112  |
| 70                          | 3,56               | 37               | 28                               | 1,73 (0,75, 3,99)  | 0,1943           | 85                               | 71                         | 0,62 (0,38, 1,00)          | 0,0459           | 18                               | 28                         | 0,89 (0,49, 1,62)          | 0,6916           | 8                         | 42                | 0,33 (0,15, 0,71) | 0,0028 | 0,0296  |
| 75                          | 3,77               | 31               | 21                               | 1,90 (0,73, 4,93)  | 0,1804           | 91                               | 76                         | 0,65 (0,41, 1,03)          | 0,0650           | 15                               | 32                         | 0,88 (0,47, 1,66)          | 0,6992           | 6                         | 44                | 0,33 (0,14, 0,79) | 0,0086 | 0,0427  |
| 80                          | 4,05               | 25               | 18                               | 2,33 (0,82, 6,64)  | 0,1053           | 97                               | 79                         | 0,64 (0,41, 1,00)          | 0,0493           | 13                               | 34                         | 1,04 (0,54, 2,03)          | 0,9069           | 5                         | 45                | 0,32 (0,13, 0,83) | 0,0136 | 0,0291  |

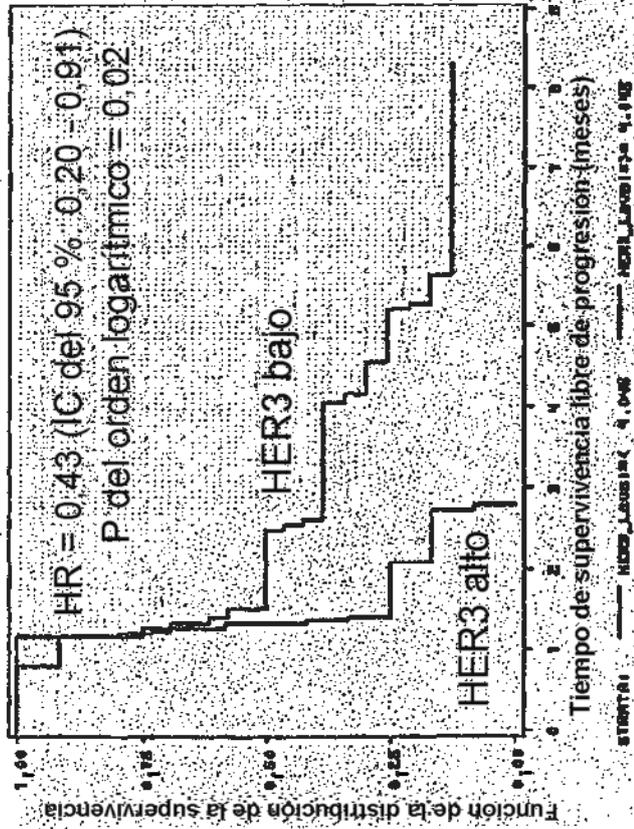
Nota: los HR y los valores de la p del orden logarítmico no se ajustaron para comparación múltiple.

FIG. 25

Supervivencia global



Supervivencia libre de progresión

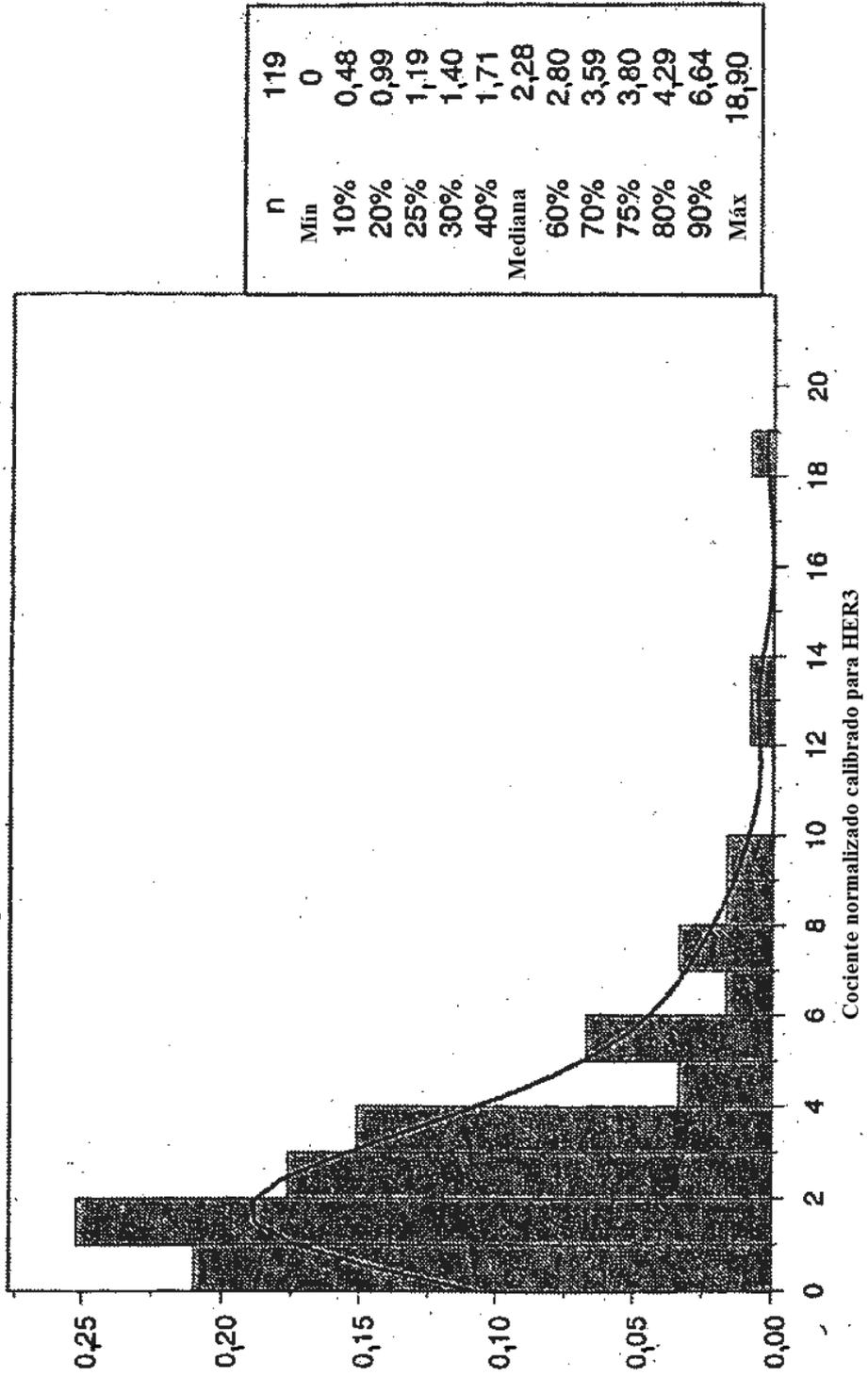


HER3 alto: HER3 > = percentil 75  
HER3 bajo: HER3 < percentil 75  
Percentil 75 = 4,045

FIG. 26A

*Cociente normalizado calibrado para HER3*

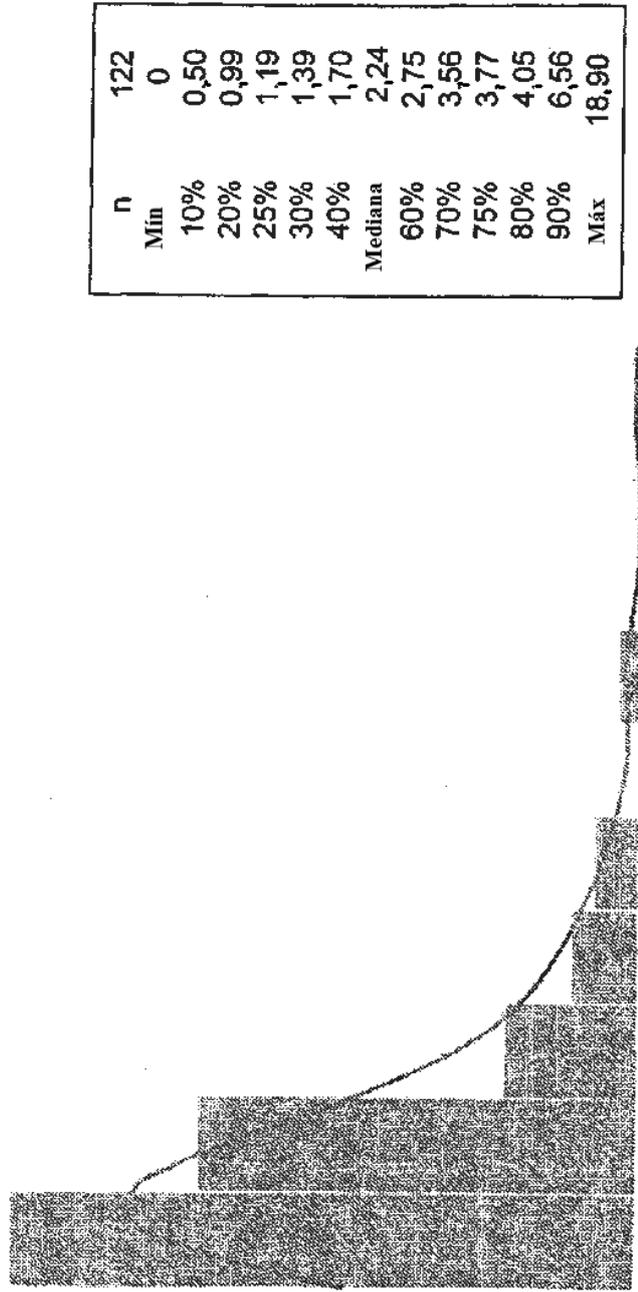
*El intervalo de expresión es ~ 20-80 veces*



CP están entre ~ 23 y 30 para la mayoría de las muestras

# Cociente normalizado calibrado para HER3

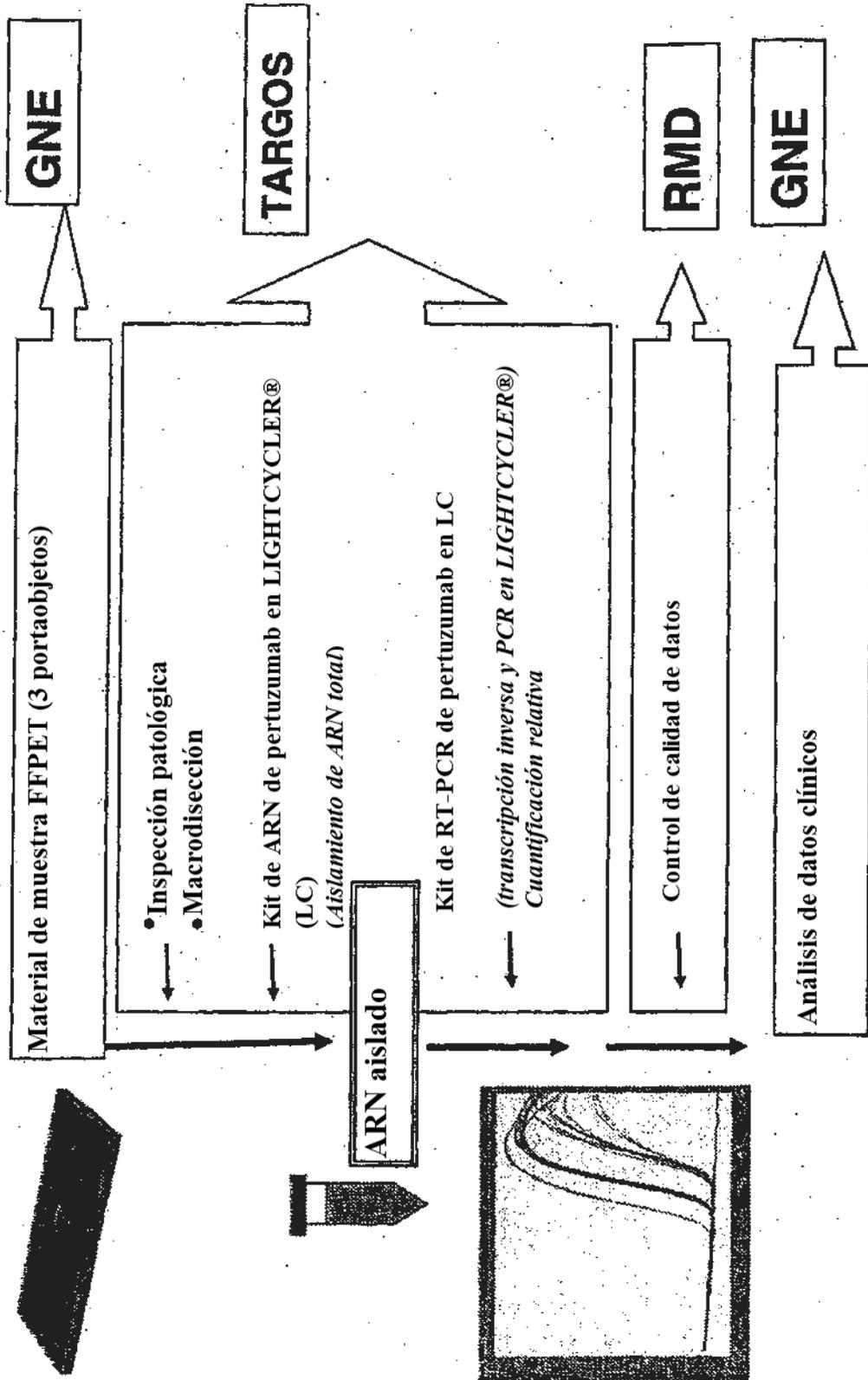
El intervalo de expresión es ~ 20-80 veces



CP están entre ~ 23 y 30 para la mayoría de las muestras

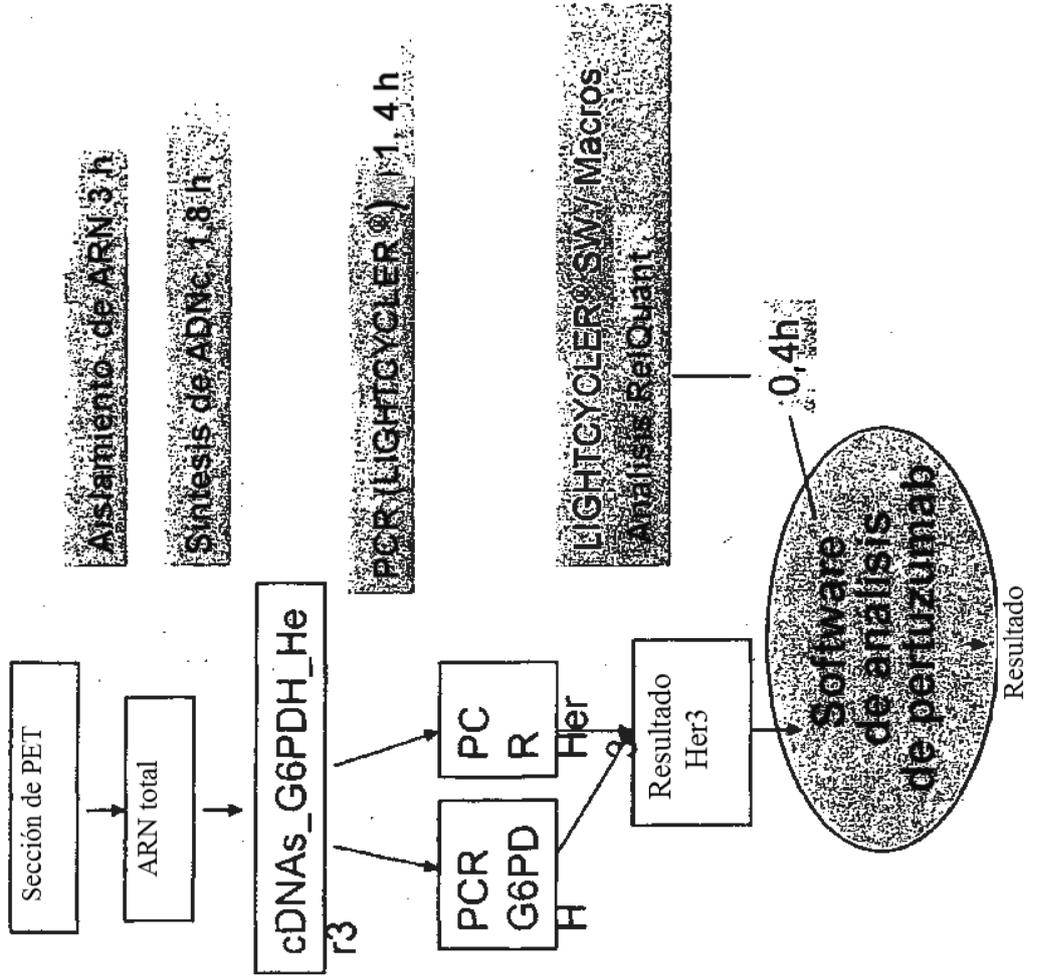
FIG. 26B

FIG. 27  
Ensayos de IVD por qRT-PCR de pertuzumab con LIGHTCYCLER®



*Ensayo de IVD de pertuzumab  
Flujo de trabajo y análisis  
1 marcado + 1 referencia*

**FIG. 28**



**FIGURA 29A**

**SLP por HER2/HER3 por qRT-PCR (percentil)**

| Percentil | Valor abs. | Grupo de dx (alto) |               |                   |                                  | Grupo de dx (bajo) |               |                   |                                  | Casos + Omnitarg (n=60)    |                  |                                  |                            | Gem sola (n=58)  |                                  |                           |        |        |
|-----------|------------|--------------------|---------------|-------------------|----------------------------------|--------------------|---------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------|------------------|----------------------------------|----------------------------|------------------|----------------------------------|---------------------------|--------|--------|
|           |            | N                  | Nº de eventos | HR (IC del 95 %)  | Valor de p del orden logaritmico | N                  | Nº de eventos | HR (IC del 95 %)  | Valor de p del orden logaritmico | Nº de eventos en Dx (nato) | HR (IC del 95 %) | Valor de p del orden logaritmico | Nº de eventos en Dx (nato) | HR (IC del 95 %) | Valor de p del orden logaritmico | Valor de p de interacción |        |        |
| 20        | 0,74       | 95                 | 72            | 0,69 (0,39, 1,02) | 0,0616                           | 23                 | 21            | 2,04 (0,66, 7,13) | 0,2475                           | 26                         | 18               | 0,57 (0,31, 1,06)                | 0,0734                     | 46               | 3                                | 1,39 (0,43, 4,55)         | 0,5881 | 0,1823 |
| 25        | 0,82       | 89                 | 67            | 0,46 (0,27, 0,76) | 0,0021                           | 29                 | 26            | 2,65 (1,10, 7,37) | 0,0249                           | 24                         | 20               | 0,53 (0,29, 0,97)                | 0,0370                     | 43               | 6                                | 4,07 (1,41, 11,74)        | 0,0055 | 0,0005 |
| 30        | 0,90       | 83                 | 62            | 0,41 (0,24, 0,69) | 0,0007                           | 35                 | 31            | 2,52 (1,13, 5,62) | 0,0197                           | 22                         | 22               | 0,46 (0,25, 0,84)                | 0,0104                     | 40               | 9                                | 3,04 (1,33, 6,94)         | 0,0056 | 0,0002 |
| 35        | 1,06       | 77                 | 60            | 0,39 (0,22, 0,66) | 0,0005                           | 41                 | 33            | 2,51 (1,14, 5,54) | 0,0189                           | 20                         | 24               | 0,49 (0,26, 0,90)                | 0,0192                     | 40               | 9                                | 3,41 (1,50, 7,73)         | 0,0019 | 0,0001 |
| 40        | 1,13       | 71                 | 55            | 0,39 (0,22, 0,69) | 0,0009                           | 47                 | 36            | 1,91 (0,85, 3,83) | 0,0640                           | 18                         | 26               | 0,62 (0,28, 0,96)                | 0,0340                     | 37               | 12                               | 2,76 (1,36, 5,69)         | 0,0034 | 0,0004 |
| 45        | 1,26       | 65                 | 50            | 0,31 (0,16, 0,61) | 0,0003                           | 53                 | 43            | 1,93 (0,89, 3,77) | 0,0492                           | 14                         | 30               | 0,54 (0,28, 1,03)                | 0,0584                     | 36               | 13                               | 2,21 (1,57, 6,56)         | 0,0007 | 0,0001 |
| 50        | 1,53       | 59                 | 47            | 0,31 (0,15, 0,61) | 0,0004                           | 59                 | 46            | 1,71 (0,91, 3,21) | 0,0937                           | 13                         | 31               | 0,57 (0,30, 1,10)                | 0,0926                     | 34               | 15                               | 2,94 (1,50, 5,77)         | 0,0010 | 0,0003 |
| 55        | 1,70       | 54                 | 45            | 0,34 (0,17, 0,68) | 0,0015                           | 64                 | 46            | 1,44 (0,78, 2,66) | 0,2293                           | 13                         | 31               | 0,66 (0,34, 1,28)                | 0,2161                     | 32               | 17                               | 2,55 (1,34, 4,83)         | 0,0028 | 0,0022 |
| 60        | 1,86       | 48                 | 40            | 0,27 (0,12, 0,57) | 0,0003                           | 70                 | 53            | 1,35 (0,77, 2,37) | 0,2885                           | 12                         | 32               | 0,60 (0,31, 1,18)                | 0,1346                     | 28               | 21                               | 2,60 (1,41, 4,81)         | 0,0015 | 0,0009 |
| 65        | 2,15       | 42                 | 34            | 0,27 (0,12, 0,62) | 0,0010                           | 76                 | 59            | 1,10 (0,65, 1,86) | 0,7119                           | 11                         | 33               | 0,58 (0,28, 1,12)                | 0,0974                     | 23               | 26                               | 1,91 (1,00, 3,27)         | 0,0447 | 0,0084 |
| 70        | 2,49       | 36                 | 29            | 0,21 (0,08, 0,54) | 0,0004                           | 82                 | 64            | 1,13 (0,69, 1,87) | 0,6280                           | 8                          | 36               | 0,52 (0,24, 1,12)                | 0,0895                     | 21               | 28                               | 2,07 (1,14, 3,76)         | 0,0145 | 0,0032 |
| 75        | 2,62       | 30                 | 24            | 0,13 (0,04, 0,46) | 0,0003                           | 88                 | 68            | 1,08 (0,67, 1,75) | 0,7534                           | 6                          | 38               | 0,46 (0,19, 1,10)                | 0,0766                     | 18               | 31                               | 2,11 (1,12, 3,96)         | 0,0167 | 0,0085 |
| 80        | 2,92       | 24                 | 20            | 0,10 (0,02, 0,43) | 0,0002                           | 94                 | 73            | 1,06 (0,67, 1,70) | 0,7686                           | 4                          | 40               | 0,42 (0,15, 1,19)                | 0,0940                     | 16               | 33                               | 2,60 (1,36, 4,87)         | 0,0026 | 0,0022 |

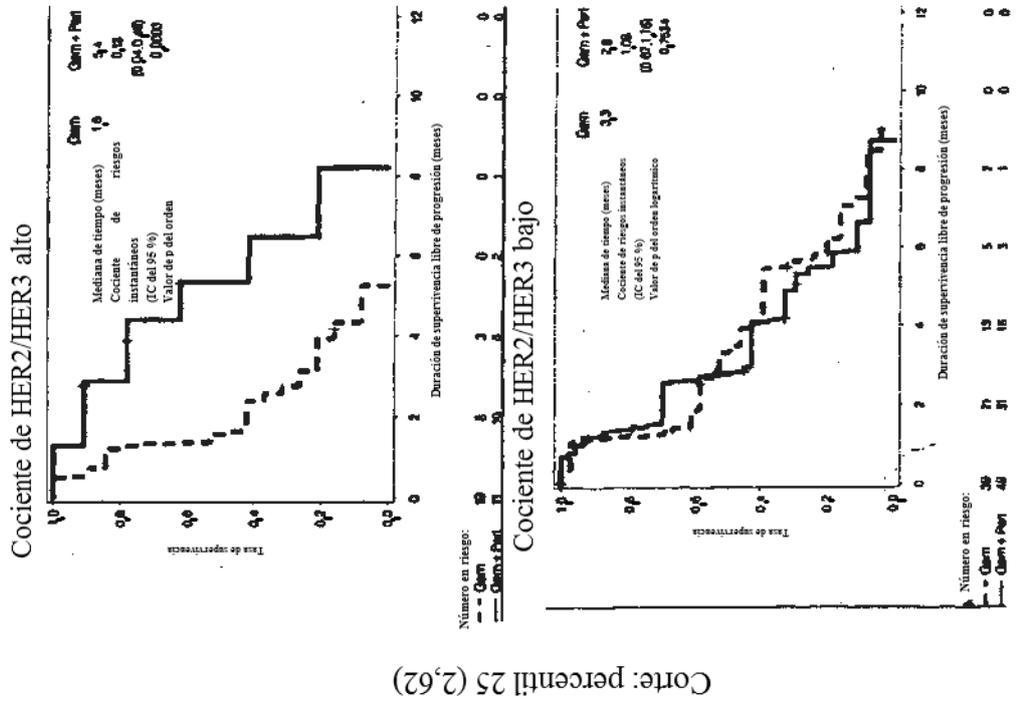
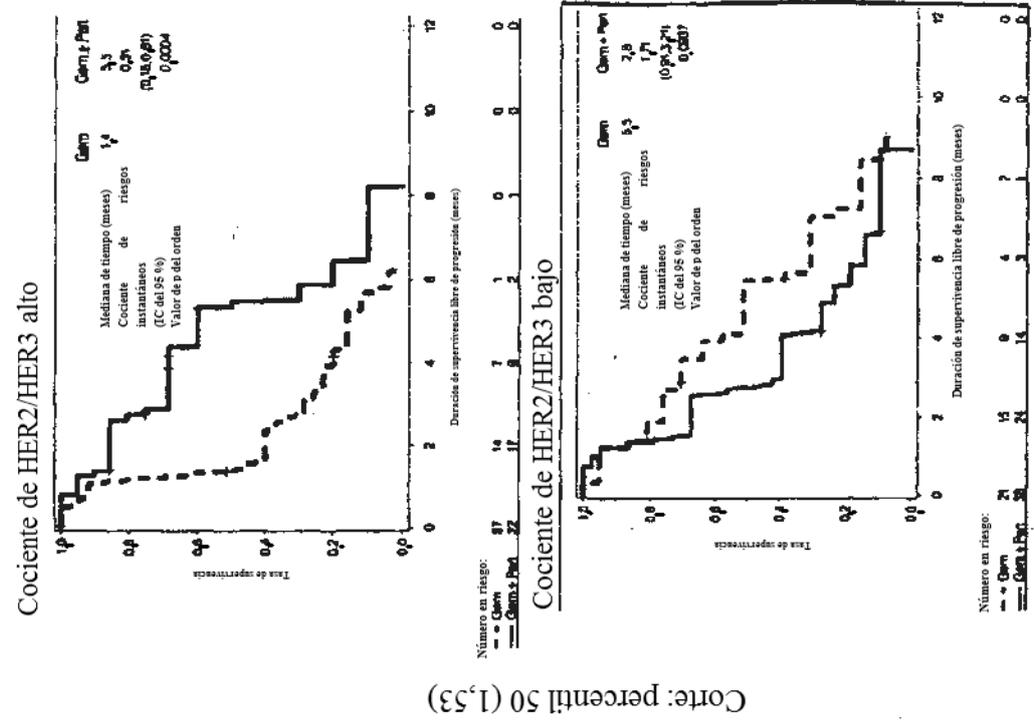
FIG. 29B

***Cáncer de ovario resistente a platino: SLP por cociente de HER2/HER3 por qRT-PCR***

| Valor de corte |            | Grupo de dx (bajo) |                   |                                  |               | Grupo de dx (alto) |                                  |                            |                 | Gem sola (n=59)                  |                            |                 |                                  |                           |                    |        |        |
|----------------|------------|--------------------|-------------------|----------------------------------|---------------|--------------------|----------------------------------|----------------------------|-----------------|----------------------------------|----------------------------|-----------------|----------------------------------|---------------------------|--------------------|--------|--------|
| Percentil      | Valor abs. | Nº de eventos      | HR (IC del 95%)   | Valor de p del orden logarítmico | Nº de eventos | HR (IC del 95%)    | Valor de p del orden logarítmico | Nº de eventos en Dx (alto) | HR (IC del 95%) | Valor de p del orden logarítmico | Nº de eventos en Dx (bajo) | HR (IC del 95%) | Valor de p del orden logarítmico | Valor de p de interacción |                    |        |        |
| 20             | 0,76       | 97                 | 0,67 (0,42, 1,06) | 0,0884                           | 24            | 21                 | 1,70 (0,56, 5,19)                | 0,3418                     | 29              | 17                               | 0,74 (0,40, 1,37)          | 0,3323          | 46                               | 4                         | 1,73 (0,62, 4,87)  | 0,2958 | 0,1685 |
| 25             | 0,83       | 91                 | 0,50 (0,31, 0,82) | 0,0050                           | 30            | 25                 | 2,53 (0,99, 6,49)                | 0,0452                     | 27              | 19                               | 0,68 (0,37, 1,24)          | 0,2026          | 44                               | 6                         | 4,34 (1,51, 12,43) | 0,0033 | 0,0022 |
| 30             | 0,91       | 85                 | 0,48 (0,29, 0,80) | 0,0042                           | 36            | 30                 | 1,98 (0,89, 4,40)                | 0,0876                     | 25              | 21                               | 0,65 (0,36, 1,17)          | 0,1529          | 41                               | 9                         | 2,92 (1,28, 6,66)  | 0,0075 | 0,0030 |
| 35             | 1,06       | 79                 | 0,45 (0,26, 0,77) | 0,0026                           | 42            | 33                 | 1,99 (0,94, 4,24)                | 0,0691                     | 23              | 23                               | 0,63 (0,35, 1,13)          | 0,1204          | 40                               | 10                        | 2,96 (1,37, 6,42)  | 0,0039 | 0,0015 |
| 40             | 1,13       | 73                 | 0,40 (0,23, 0,71) | 0,0011                           | 48            | 38                 | 1,76 (0,89, 3,47)                | 0,0979                     | 21              | 25                               | 0,65 (0,36, 1,17)          | 0,1512          | 37                               | 13                        | 2,87 (1,44, 5,71)  | 0,0017 | 0,0011 |
| 45             | 1,26       | 67                 | 0,35 (0,19, 0,65) | 0,0006                           | 54            | 43                 | 1,78 (0,93, 3,41)                | 0,0780                     | 17              | 29                               | 0,66 (0,36, 1,21)          | 0,1782          | 36                               | 14                        | 3,49 (1,70, 7,14)  | 0,0003 | 0,0004 |
| 50             | 1,54       | 61                 | 0,32 (0,17, 0,63) | 0,0005                           | 60            | 47                 | 1,63 (0,88, 3,02)                | 0,1154                     | 15              | 31                               | 0,64 (0,34, 1,19)          | 0,1566          | 34                               | 16                        | 3,15 (1,60, 6,19)  | 0,0005 | 0,0005 |
| 55             | 1,73       | 55                 | 0,36 (0,18, 0,70) | 0,0018                           | 68            | 50                 | 1,37 (0,77, 2,45)                | 0,2828                     | 15              | 31                               | 0,72 (0,39, 1,35)          | 0,3116          | 31                               | 19                        | 2,64 (1,41, 4,94)  | 0,0016 | 0,0033 |
| 60             | 2,04       | 49                 | 0,29 (0,14, 0,60) | 0,0005                           | 72            | 55                 | 1,35 (0,78, 2,34)                | 0,2830                     | 13              | 33                               | 0,62 (0,33, 1,20)          | 0,1585          | 28                               | 22                        | 2,68 (1,47, 4,93)  | 0,0009 | 0,0010 |
| 65             | 2,17       | 43                 | 0,28 (0,12, 0,61) | 0,0007                           | 78            | 61                 | 1,13 (0,68, 1,88)                | 0,6512                     | 13              | 33                               | 0,62 (0,33, 1,20)          | 0,1585          | 22                               | 28                        | 2,16 (1,18, 3,96)  | 0,0104 | 0,0053 |
| 70             | 2,50       | 37                 | 0,19 (0,07, 0,48) | 0,0001                           | 84            | 66                 | 1,16 (0,71, 1,90)                | 0,5512                     | 10              | 36                               | 0,58 (0,28, 1,18)          | 0,1290          | 20                               | 30                        | 2,84 (1,40, 4,96)  | 0,0018 | 0,0010 |
| 75             | 2,65       | 31                 | 0,10 (0,03, 0,37) | <0,0001                          | 90            | 71                 | 1,12 (0,70, 1,80)                | 0,8370                     | 7               | 39                               | 0,42 (0,18, 0,94)          | 0,0314          | 18                               | 32                        | 2,23 (1,19, 4,21)  | 0,0100 | 0,0010 |
| 80             | 2,99       | 25                 | 0,11 (0,03, 0,40) | <0,0001                          | 96            | 75                 | 1,06 (0,67, 1,67)                | 0,8088                     | 6               | 40                               | 0,45 (0,19, 1,08)          | 0,0694          | 15                               | 35                        | 2,46 (1,28, 4,74)  | 0,0055 | 0,0015 |

Nota: los HR y los valores de la p del orden logarítmico no se ajustaron para comparación múltiple.

FIGURA 30A



**FIG. 30B**  
**TOC3258g: SLP por cociente de HER2/HER3**

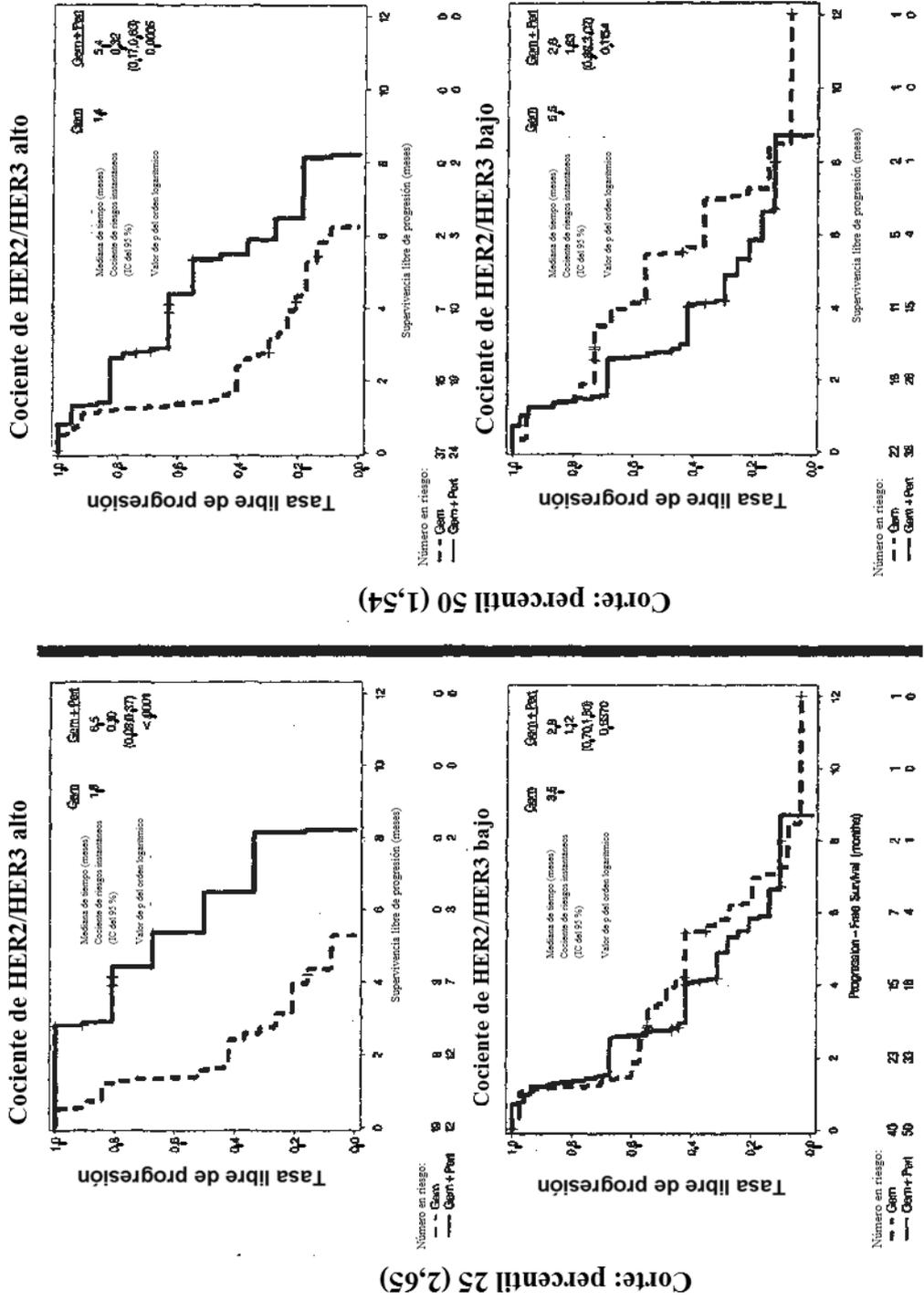


FIG. 31A

| Cociente de HER2/HER3 por qRT-PCR | Total |               | Gem sola |               |                 | Gem + Omnitarg |               |                 | Valor de p del orden logarítmico |                  |
|-----------------------------------|-------|---------------|----------|---------------|-----------------|----------------|---------------|-----------------|----------------------------------|------------------|
|                                   | N     | Nº de eventos | N        | Nº de eventos | Mediana (meses) | N              | Nº de eventos | Mediana (meses) |                                  | HR (IC del 95 %) |
| 0 - < percentil 25                | 29    | 26            | 7        | 6             | 5.5             | 22             | 20            | 2.6             | 2,85 (1,10, 7,37)                | 0,0249           |
| 25 - < percentil 50               | 30    | 20            | 14       | 9             | 3.7             | 16             | 11            | 4.2             | 1,02 (0,41, 2,54)                | 0,9649           |
| 50 - < percentil 75               | 29    | 23            | 18       | 16            | 1.3             | 11             | 7             | 5.5             | 0,61 (0,25, 1,52)                | 0,2978           |
| 75 - percentil 100                | 30    | 24            | 19       | 18            | 1.6             | 11             | 6             | 5.4             | 0,13 (0,04, 0,46)                | 0,0003           |

FIG. 31B

## Análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) por cuartiles de HER2/HER3

| HER2/HER3 por qRT-PCR | N  | Nº de eventos | HR (IC del 95 %)  | Valor de p del orden logarítmico |
|-----------------------|----|---------------|-------------------|----------------------------------|
| 0 – < percentil 25    | 30 | 25            | 2,53 (0,99, 6,49) | 0,0452                           |
| 25 – < percentil 50   | 30 | 22            | 1,28 (0,52, 3,15) | 0,5952                           |
| 50 – < percentil 75   | 30 | 24            | 0,76 (0,32, 1,83) | 0,5618                           |
| 75 – < percentil 100  | 31 | 25            | 0,10 (0,03, 0,37) | <,0001                           |

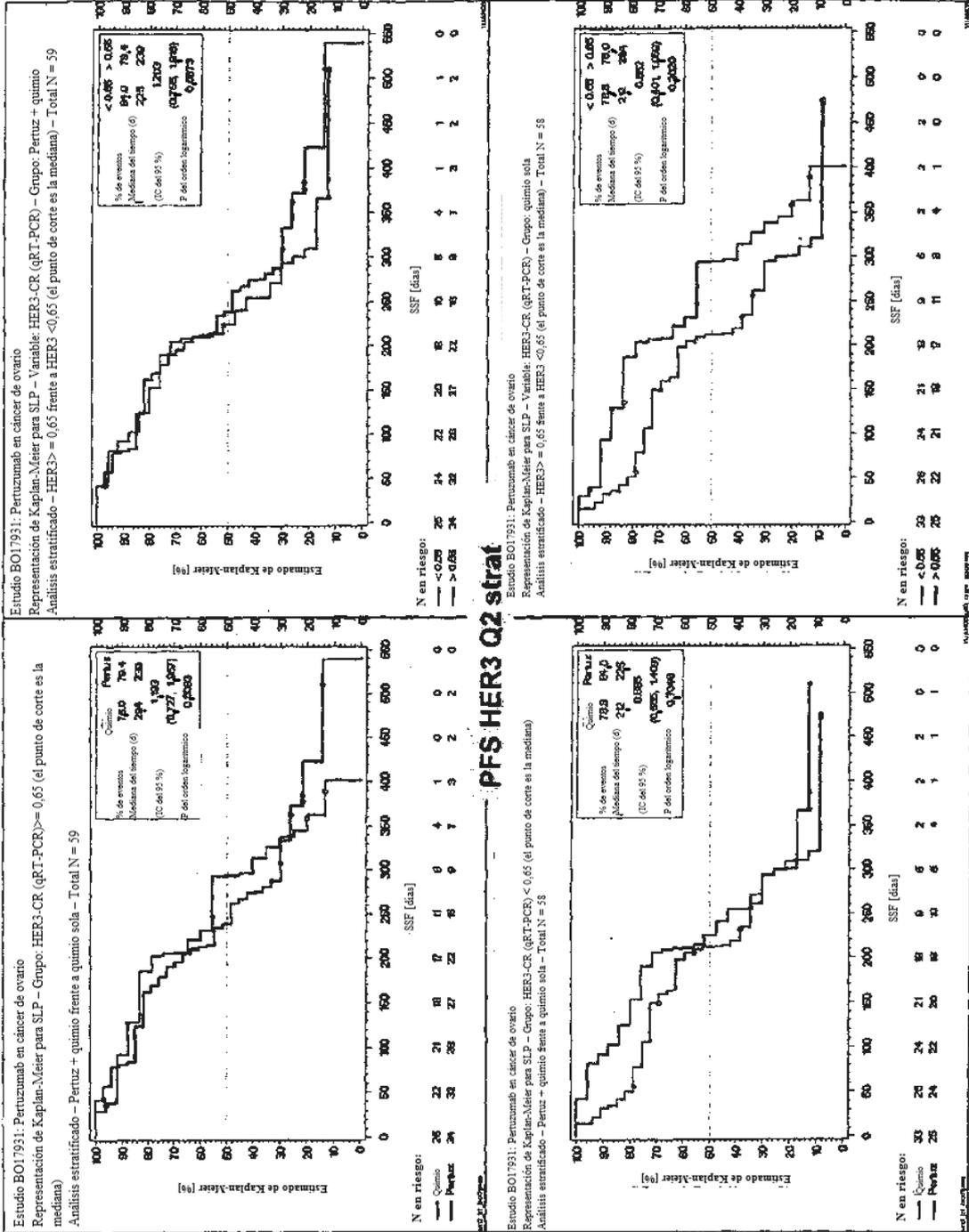
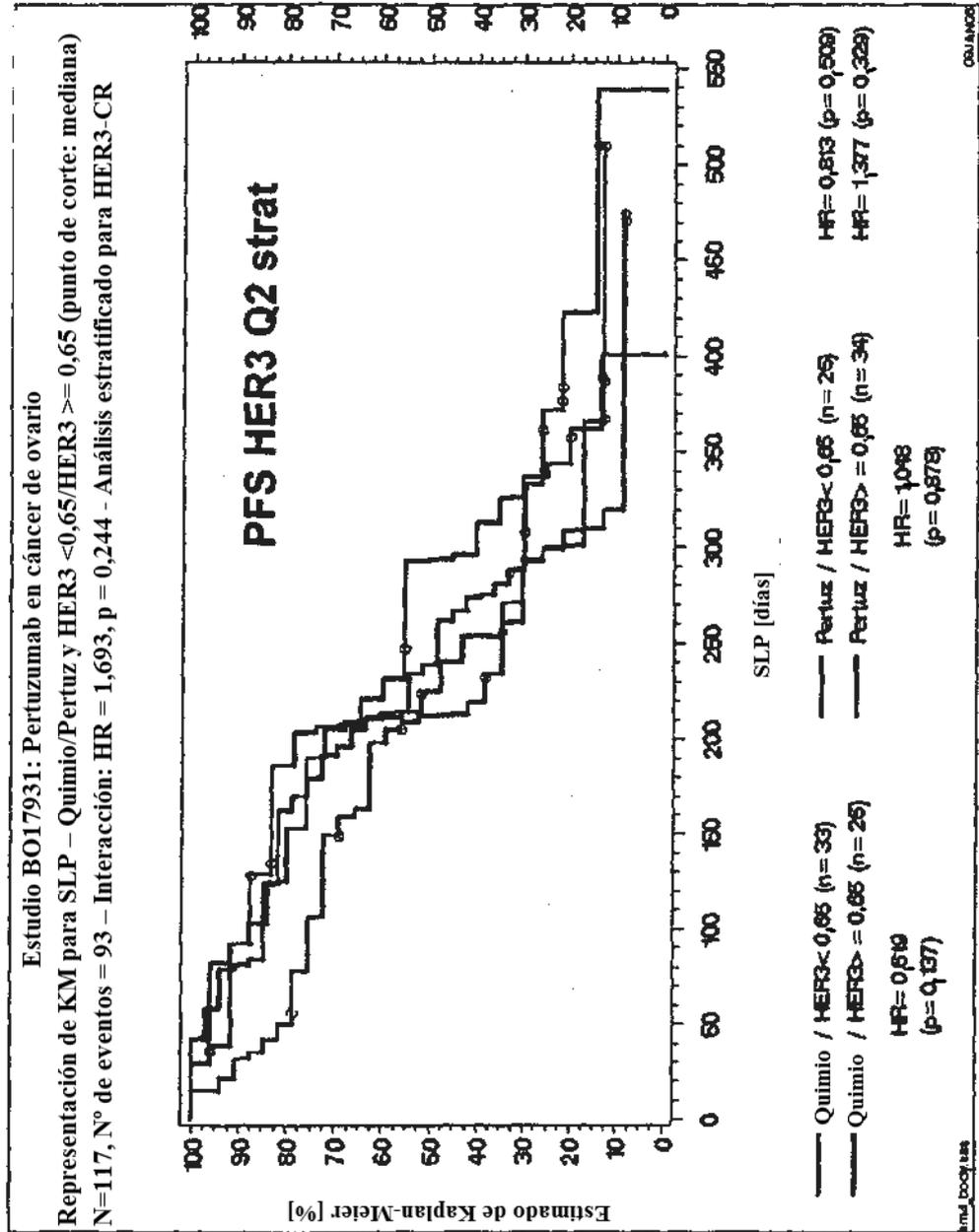


FIG. 33



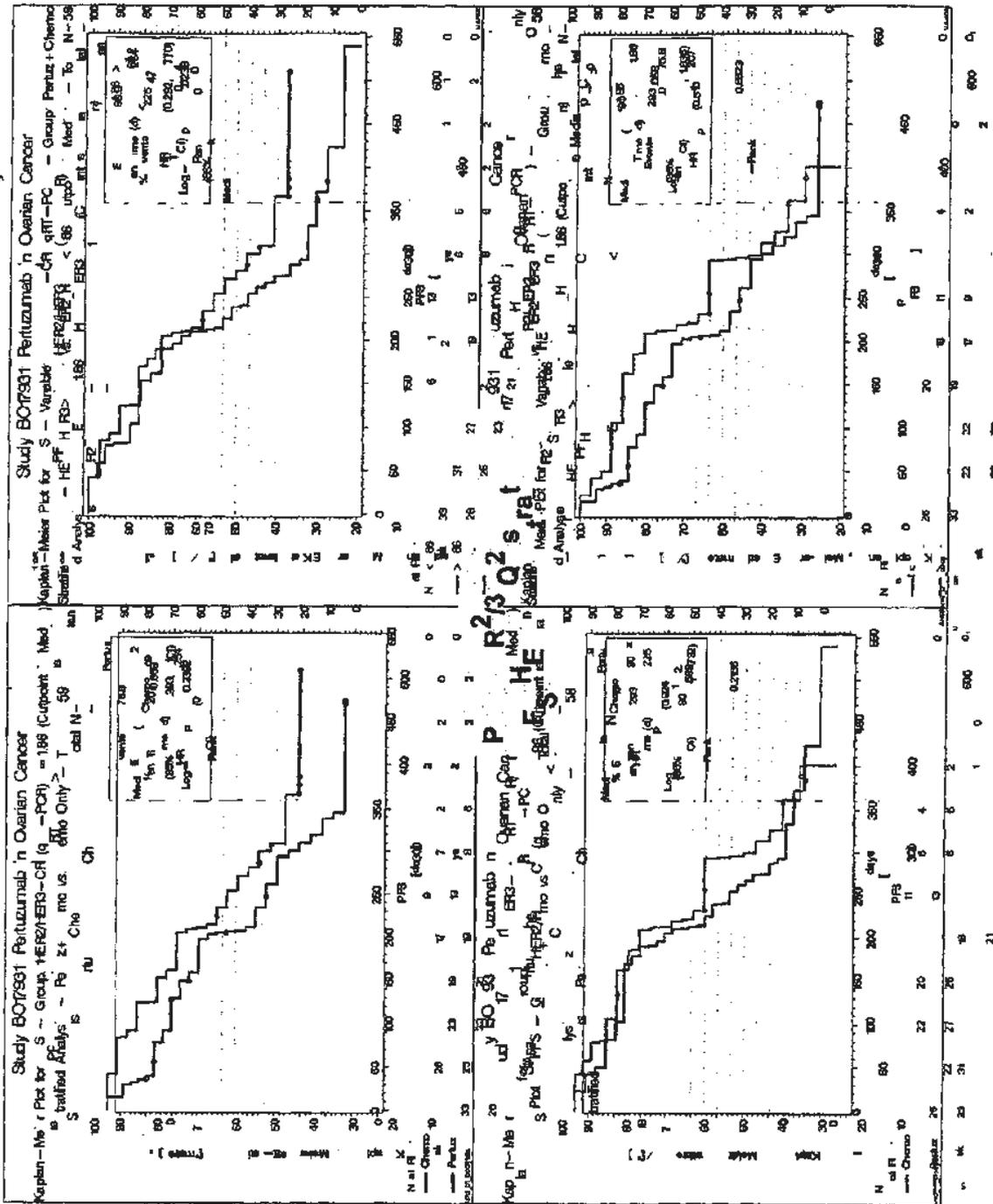


FIG. 35

