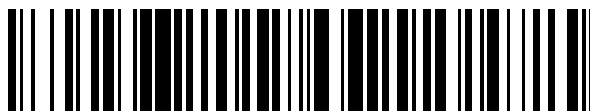


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 926**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2007 E 07846863 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2097754**

54 Título: **HER3 activado como marcador para predecir la eficacia terapéutica**

30 Prioridad:

28.11.2006 EP 06024658
28.11.2006 US 861243 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.02.2015

73 Titular/es:

U3 PHARMA GMBH (100.0%)
Fraunhoferstrasse 22
82152 Martinsried, DE

72 Inventor/es:

ROTHER, MIKE y
TREDER, MARTIN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 527 926 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

HER3 activado como marcador para predecir la eficacia terapéutica.

5 La presente invención proporciona métodos para la determinación del nivel de activación las tirosina cinasas de receptores, por ejemplo HER3 fosforilado, para la selección de pacientes para el tratamiento de una enfermedad. También se proporcionan métodos para la evaluación de los efectos biológicos y farmacodinámicos de una sustancia activa y / o su eficacia en el tratamiento de la enfermedad, utilizando una muestra de tejido de un sujeto de ensayo, por ejemplo de material tumoral o tejido normal tal como piel o folículo piloso. Adicionalmente se divulgan
10 métodos para el tratamiento de enfermedades asociadas al receptor HER.

El receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3, también conocido como ErbB3) es una proteína tirosina cinasa de receptor y pertenece a la subfamilia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de las proteínas tirosina cinasas de receptor, que también incluye HER1 (también conocido como EGFR), HER2, y
15 HER4 (Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 (1990), 4905-4909; Kraus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 (1 989), 9193-9197; y Kraus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (1993), 2900-2904).

Se ha encontrado que HER3 está sobreexpresado en varios tipos de cáncer como el cáncer de mama, gastrointestinal y pancreático. Curiosamente se ha demostrado una correlación entre la expresión de HER2 / HER3 y la progresión desde un estadio no invasivo a uno invasivo (Alimandi et al., Oncogene 10,181 3-1 821; deFazio et al., Cancer 87, 487-498; Naidu et al., Br. J. Cancer 78, 1385-1390).
20

Estos datos señalan el papel de HER3 en el desarrollo del cáncer y demuestran el gran potencial de terapias diana específicas de HER3 para el tratamiento del cáncer y otras neoplasias malignas caracterizadas por hiperseñalización a través HER3 y / o sus rutas de señalización inducidas por sus parejas de heterodimerización (revisado en Citri y Yarden, Nat Reviews Mol Cell Biol, 2006 (7), 505-516; Shawver et al, Cancer Cell, 2002 (1), 117-123; Yarden y Slivkowski, Nat Reviews Mol Cell Biol, 2001 (2), 127-137).
25

Anteriormente se han descrito agentes y métodos capaces de tratar enfermedades asociadas con HER3. Por ejemplo, se ha notificado que los anticuerpos anti-HER3 descritos en el documento WO 03/013602 inducen la internalización acelerada del receptor y reducen la proliferación y la migración de las células tumorales. En la patente de Estados Unidos 5.968.511 (correspondiente al documento WO 97/135885) se descubrió que los anticuerpos frente a HER3 reducen la formación inducida por ligando de los heterodímeros HER2/HER3. En el documento WO 00/078347 se divulgan métodos para detener o inhibir el crecimiento celular, que comprenden la prevención o reducción de la formación de heterodímeros HER2 / HER3, por ejemplo, mediante la administración de una combinación de un anticuerpo anti-HER2, por ejemplo, Herceptin, y un anticuerpo anti-HER3, por ejemplo, el anticuerpo 105.5 adquirido en Neomarkers.
30
35

Sobre la base de la creciente implicación de la transducción de señales incontrolada en muchas afecciones patológicas, incluido el cáncer, un objetivo principal del desarrollo de fármacos médicos / farmacéuticos es el desarrollo de terapias individuales o específicas para el tratamiento de enfermedades. Tales terapias específicas pueden comprender, por ejemplo, anticuerpos terapéuticos, inhibidores de molécula pequeña, ácido nucleico de interferencia y la administración de una composición farmacéutica seleccionada o dosificada individualmente.
40

La mayoría de estas denominadas terapias específicas de diana afectan predominantemente a una sola diana. Por lo tanto, en el desarrollo moderno de fármacos es crucial para identificar a los pacientes que responden a la terapia específica de diana.
45

Un ejemplo muy destacado es el anticuerpo terapéutico Herceptin que está dirigido contra la tirosina cinasa del receptor HER2. Este anticuerpo particular se ha aprobado para el tratamiento del cáncer de mama, una indicación de tumor que está asociada con una amplificación del gen de HER2 en aproximadamente el 20 % de los casos que causan la sobreexpresión de la proteína correspondiente. Con el fin de diferenciar este 20 % de los pacientes que se beneficiarían de la terapia de anticuerpos del 80 % que no lo haría se ha desarrollado un ensayo diagnóstico, el HercepTest.
50

Sin embargo, tales ensayos que incluyen HercepTest solo detectan la cantidad de la proteína específica, mientras que a menudo es la actividad de la proteína lo que realmente está produciendo la alteración de la regulación de la señal celular y la posterior malignidad. Por ejemplo, el ensayo HercepTest solo predice una respuesta satisfactoria del paciente en aproximadamente el 30 % de los casos cuando Herceptin se utiliza como agente único (Leyland-Jones, Lancet Oncol (2002) Mar;3(3):137-44). Este bajo índice de predicción se observa a pesar de que se ha determinado que todos los pacientes tratados sobreexpresan HER2, lo que demuestra las importantes limitaciones de este tipo de ensayo diagnóstico y la necesidad de identificar mejores biomarcadores de respuesta a la terapia.
55
60

Otro paso fundamental durante el desarrollo de fármacos es la selección de la dosis para los agentes terapéuticos. Por lo general, en el caso de los fármacos convencionales no específicos se utiliza el supuesto de la dosis máxima tolerada. Sin embargo, este mismo principio no se aplica a las terapias dirigidas, en las que se prefiere una dosis
65

biológica óptima en su lugar. De hecho, la definición de la dosis óptima a administrar se puede definir mediante parámetros farmacodinámicos o farmacocinéticos y la determinación de la eficacia en la molécula diana (Albanell et al., 2002, J. Clin. Oncol. 20, 110-124). Por lo tanto, es deseable tener un sistema de ensayo sólido para determinar los parámetros farmacodinámicos, tales como, por ejemplo, la solubilidad y la estabilidad de un compuesto que permita la liberación en el sitio de acción a una concentración suficiente con estabilidad metabólica de manera que el compuesto no se elimine del organismo con tanta rapidez que no tenga la posibilidad de ser un agente farmacológico eficaz, o farmacocinéticos que permitan que el compuesto alcance una concentración en plasma / suero deseada.

El éxito del desarrollo, la aprobación y el uso de fármacos dirigidos a menudo dependen en gran parte de la capacidad del responsable del desarrollado o del clínico para determinar antes y durante el tratamiento el estado de activación de la proteína específica contra la que está dirigido el fármaco. Otro aspecto de la correlación farmacodinámica es la respuesta a la dosis para una terapéutica dada y los efectos deseables (tratamiento) e indeseables ((acontecimientos adversos). La evaluación cuidadosa de la relación beneficios-riesgos de un nuevo fármaco (: combinación) dado conducirá a una administración tolerable y a la finalización con éxito de la intervención terapéutica. La evaluación de posibles marcadores de resistencia una vez finalizado el tratamiento es el aspecto final de los efectos farmacodinámicos que influirían sobre la decisión sobre la administración de tratamiento adicional.

Sin embargo, en la rutina clínica es difícil evaluar los efectos biológicos y farmacodinámicos de los agentes terapéuticos. En general, los efectos farmacodinámicos se pueden medir a través de una extensa formación de imágenes y marcaje radioactivo de la sustancia o sustrato (por ejemplo, PET, TAC) y la lectura se debe comparar con los efectos secundarios observados y la eficacia clínica. Para muchas terapéuticas (incluidas las terapéuticas dirigidas) se han definido los denominados marcadores sustitutos para la eficacia biológica (marcadores PD) se han seguido durante el curso de la terapia. Sin embargo, estos marcadores no indican el efecto biológico directo de la terapéutica en normal y / o las células cancerosas y, por lo tanto, pueden ser objeto de efectos no diana de activación / desactivación a través de rutas externas (no específicas de diana). Ejemplos de estos marcadores son CA-125, Ki67, PTEN y β HCG. Un marcador deseable sería específico de la ruta y la intervención terapéutica (dirigida), de fácil acceso y analizable sin variabilidad intra y / o entre sujetos.

En un caso específico, el papel funcional y la expresión del factor de crecimiento epidérmico, EGF, y su receptor afín, EGFR, en la piel se correlacionaron con los efectos secundarios farmacológicos de la terapia anti-EGFR, tal como exantema cutáneo y pérdida de pelo (Lacouture et al. (2006), Nat. Rev. Cancer 6, 803-812). En particular, mediante el uso de una muestra derivada de queratinocitos de la piel de adultos como tejido marcador sustituto, el tratamiento de pacientes con tumores con, por ejemplo, el inhibidor de EGFR, ZD1839, se puede monitorizar mediante el análisis de la inhibición de la fosforilación de la tirosina del EGFR a través de métodos inmunohistoquímicos (Albanell et al., 2002), mencionado anteriormente).

Sin embargo, los métodos aplicados actualmente para la determinación de los parámetros farmacodinámicos y cinéticas son de uso limitado. Mientras que los métodos tradicionales suelen ser demasiado amplios para las terapias individuales, otros métodos tales como la detección de EGFR están restringidos por la diana.

El documento WO 2006/063042 divulga un método de identificación de un paciente para terapia con un inhibidor de la dimerización de HER3. El procedimiento implica la determinación de la expresión de dos o más receptores HER3 y uno o más ligandos de HER3 en una muestra del paciente. Por tanto, una primera diferencia esencial con el abordaje de la presente solicitud es que se tienen que determinar al menos dos receptores HER3 y uno o más ligandos de HER3 con el fin de proporcionar información sobre si es probable que un paciente responda a la terapia con un inhibidor de la dimerización de HER3 o no. Por el contrario, de acuerdo con la presente solicitud, es suficiente para determinar solo un receptor HER3.

Por lo tanto, el problema técnico que subyace a la presente invención era proporcionar un ensayo rápido, cuantitativo, reproducible y de bajo costo que fuera compatible o con la instrumentación actual de los laboratorios clínicos y que fuera adecuado para la determinación de la activación y / o el nivel de expresión de receptores HER.

La solución a los problemas anteriores se obtiene mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un método para la determinación de la sensibilidad o la capacidad de respuesta de una enfermedad a un modulador de HER o a una combinación de al menos un modulador de HER con un agente adicional. Por ejemplo, basándose en el sorprendente hallazgo de que la sensibilidad del crecimiento de la célula tumoral a la inhibición mediante un modulador de HER3 se correlaciona con la activación del receptor HER3, por ejemplo, fosforilación, se han diseñado métodos y procedimientos para predecir la capacidad de respuesta de un sujeto al tratamiento con un modulador de HER.

Las realizaciones son conforme a las reivindicaciones adjuntas.

Los resultados presentados en los ejemplos en el presente documento demuestran que las células tumorales, tales como BxPC3 (cáncer de páncreas), A431 (carcinoma epitelial) o A549 (carcinoma de pulmón) obtenidas *in vitro*

expresan HER3 y muestran fosforilación basal de HER3. . Otros experimentos validaron estos hallazgos iniciales en la mayoría de las líneas de células tumorales examinadas. Curiosamente, el examen de los modelos de xenoinjerto tumoral tratado con inhibidores de HER3 mostró que los tumores derivados de líneas de células tumorales con expresión de HER3 y fosforilación basal elevada de HER3, por ejemplo, T47D (cáncer de mama), BxPC3 (cáncer de páncreas), HT-29 (cáncer de colon) y Calu-3 (NSCLC) son particularmente sensibles a los protocolos de tratamiento dirigidos a un receptor HER3. Los datos indican que la activación del receptor HER, por ejemplo, la fosforilación, puede haber un cambio biológico general que permite predefinir el nivel de respuesta de una enfermedad a los moduladores de HER. Así, la activación de un receptor HER tal como HER3 es indicativa de un trastorno que es particularmente sensible al tratamiento con un modulador de HER.

En consecuencia, la solicitud se refiere a un método para determinar si una enfermedad responde al tratamiento con un modulador de HER, mediante la obtención de al menos una muestra de un sujeto en riesgo de sufrir dicha enfermedad o que la sufre, examinar la expresión y / o actividad de al menos un receptor HER en un ensayo celular, e identificar una enfermedad como respondedora si se detecta la expresión y / o actividad de al menos un receptor HER.

El término "receptor HER" pretende significar una proteína HER1, por ejemplo HER1/EGFR humano (nº de acceso en Swiss Prot P00533), una proteína HER2, por ejemplo HER2 humano (nº de acceso en Swiss Prot P00533), una proteína HER3, por ejemplo HER3 humano (nº de acceso en Swiss Prot P21860) o una proteína HER4 (nº de acceso en Swiss Prot Q155503). Preferentemente, el receptor HER es una proteína HER3, más preferentemente la proteína HER3 humana.

La presente solicitud se refiere al uso de un modulador que afecta a un receptor HER seleccionado del grupo de HER1, HER2, HER3 o HER4. En particular, se prefiere un modulador que afecta a la actividad de HER3, por ejemplo, HER3 humano.

Con el término "modulador de HER" se pretende querer decir un compuesto o fármaco que actúa a nivel de ácido nucleico o a nivel proteico para modular directa o indirectamente la actividad del receptor HER. La modulación directa o indirecta incluye la activación o inhibición de la actividad del receptor HER o la ruta de la transducción de la señal del receptor HER. Preferentemente, la modulación incluye una inhibición.

El modulador de la actividad del receptor HER puede actuar a nivel de ácido nucleico, ya sea sobre la transcripción o sobre el propio gen. A nivel génico, dicho modulador puede causar una inactivación parcial o completa de los genes, por ejemplo mediante interrupción génica. La reducción o inhibición de la transcripción puede comprender la aplicación de ácidos nucleicos efectores, tales como moléculas antisentido, por ejemplo moléculas de de ADN o ARN o análogos del ARN, ribozimas, moléculas de ARN pequeñas de doble cadena capaces de interferencia del ARN (ARNsi) o microARN. Adicionalmente, las moléculas de ARN precursoras de ARNsi o las moléculas de ADN que codifican este último pueden ser adecuadas.

Las moléculas efectoras pueden introducirse directamente en una célula o generarse dentro de una célula mediante transcripción a partir de moldes de ácido nucleico adecuados. La producción y usos de los ácidos nucleicos efectores se debaten extensamente en la bibliografía y son ampliamente conocidos y están disponibles para un experto en la técnica.

El modulador de HER puede actuar a nivel proteico mediante la inhibición menos parcial de la transducción de la señal mediada por el receptor HER. Por ejemplo, el modulador puede bloquear la activación inducida por ligando de un receptor HER. Por ligando se entiende un polipéptido que se une a y / o activa un receptor HER. Ejemplos preferidos de ligandos se seleccionan del grupo de:

AMPR (anfirregulina)	<u>NM 001657</u>
BTC (betacelulina)	<u>NM 001729</u>
DTR (receptor de toxina de la difteria (factor de crecimiento epidérmico de crecimiento similar a factor de unión a heparina))	<u>NM 001945</u>
EGF (GF epidérmico, beta-urogastrona)	<u>NM 001963</u>
EREG (epirregulina)	<u>NM 001.432,1</u>
NRG1 (neuregulina 1)	<u>NM 013957</u>
NRG2 (neuregulina 2)	<u>NM 013982</u>
NRG3 (neuregulina 3)	<u>AL096706</u>
NRG4 (neuregulina 4)	<u>NM 138573</u>
TGFA (factor de crecimiento transformante alfa)	<u>NM 003236</u>

Particularmente preferidos son las isoformas de la los neuregulina 1 codificadas por el gen de la neuregulina 1.

Por consiguiente, un modulador de este tipo puede actuar ocupando el sitio de unión al ligando o una porción del mismo del receptor HER, lo que convierte al receptor en inaccesible a su ligando natural de modo que se previene o

reduce su actividad biológica normal. En esta realización, las muteínas del ligando capaz de unirse al receptor, pero incapaces de inducir la transducción de señales, o anticuerpos dirigidos contra ligandos son ejemplos de moduladores de HER. Los tipos adecuados de anticuerpos se discuten en detalle a continuación.

El modulador interfiere con la formación de ligando dependiente o independiente de los oligómeros del receptor HER, por ejemplo, heterooligómeros u homooligómeros. Un heterooligómero del receptor en el presente documento es un oligómero asociado no covalentemente que comprende al menos dos receptores HER diferentes. Un homooligómero del receptor HER es un oligómero asociado no covalentemente que comprende al menos dos receptores HER del mismo. Ejemplos de dichos oligómeros de HER incluyen, entre otros, HER1/HER1, HER1/HER2, HER1/HER3, HER1/HER4, HER2/HER2, HER2/HER3, HER2/HER4, HER3/HER4, HER4/HER4. Adicionalmente, heterooligómeros preferidos pueden comprender uno, dos o más receptores HER2 combinados con un receptor HER diferente, tal como HER1, HER3 o HER4. Otras proteínas, tal como una subunidad del receptor de citocinas (p. ej., gp130) u otras tirosinas cinasas receptoras, tal como el IGF-1R, también pueden estar incluidas en el heterooligómero.

Una reducción de la transducción de señal mediada por el receptor HER puede deberse además una regulación por disminución de la membrana y/o degradación del receptor HER que tiene como resultado una desaparición al menos parcial de las moléculas de HER de la superficie celular o mediante una estabilización de las moléculas HER sobre la superficie celular en una forma sustancialmente inactiva, es decir, una forma que exhibe una transducción de señales menor en comparación con la forma no estabilizada.

Como alternativa, una reducción de la transducción de señal mediada por HER también puede producirse influyendo, por ejemplo disminuyendo o inhibiendo, sobre la unión de una molécula de transducción de la señal, por ejemplo PI3K, Shc o Grb7 a HER-3, de GRB2 a HER-2, de GRB2 a SHC, o mediante la inhibición de la fosforilación de la AKT, fosforilación de la tirosina PYK2 o fosforilación de ERK2. También se pueden ver influidos los reguladores negativos, tales como PTP o proteasas.

En otro aspecto, el modulador de HER puede ser un anticuerpo o un fragmento del mismo, dirigido contra un receptor HER. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, así como un anticuerpo recombinante, por ejemplo, un anticuerpo de cadena única o un fragmento del mismo, que contiene al menos un sitio de unión al antígeno, un fragmento de anticuerpo tal como un Fab, Fab¹ o F(ab')₂ fragmento o un fragmento recombinante tal como un fragmento scFv y un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. Para fines terapéuticos, en particular para el tratamiento de un candidato en necesidad del mismo, se prefiere especialmente la aplicación de anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos.

Un anticuerpo anti-HER3 se selecciona del grupo que consiste en el anticuerpo 105.5 (Chen et al, JBC 1996, 271 (3) 7620-9), SGP-1 (Rajkumar et al, The Breast 1995, 4 84-91), H3 90.6 (Chen et al, JBC 1996, 271 (3) 7620-9), 1B4C3 y 2D1D12 (PCT/EP02/08938) o uno de los anticuerpos anti-HER3 humano divulgado en el documento US 60 / 755.022. Un anticuerpo anti-HER2 se selecciona del grupo que consiste en trastuzumab, pertuzumab, Herceptin-geldanamicina, conjugado de 213-bi-Herceptin-alfa, Herceptin-DM1 y un anticuerpo anti-HER1 se selecciona del grupo que consiste en panitumumab, cetuximab, matuzumab, conjugado de Erbitux-paclitaxel, Erbitux-MMC (mitomicina C) y LA22-MMC.

Otro ejemplo de un modulador en términos de los métodos de la presente invención es una proteína armazón, que tiene una actividad de unión de tipo anticuerpo que se une a un miembro de la familia HER. En el contexto de la presente invención, el término "proteína armazón", como se usa en el presente documento, significa un polipéptido o proteína con áreas de superficie expuestas donde inserciones, sustituciones o delecciones de aminoácidos son altamente tolerables. Ejemplos de proteínas armazón que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención son la proteína A de *Staphylococcus aureus*, la proteína de unión bilina de *Pieris brassicae* u otras lipocalinas, las proteínas de repetición de anquirina y la fibronectina humana (revisado en Binz y Pluckthun, (2005) Curr Opin Biotechnol, 16, 459-69). La ingeniería de una proteína armazón puede considerarse como la inserción o integración de una función de afinidad sobre o en el marco estructural de una proteína plegada de forma estable. Función de afinidad significa una afinidad de unión a la proteína de acuerdo con la presente invención. Un armazón puede ser estructuralmente separable de las secuencias de aminoácidos que confieren especificidad de unión. En general, las proteínas que parecen adecuadas para el desarrollo de tales reactivos de afinidad artificiales se pueden obtener mediante técnicas de ingeniería de proteínas racionales, o con mayor frecuencia, combinatorias tales como selección contra un miembro de la familia HER, ya sea proteína purificada o proteína expresada en la superficie celular, para seleccionar agentes de unión en una biblioteca de armazones artificiales mostrados in vitro, habilidades que se conocen en la técnica (Binz y Plückthun, 2005, mencionado anteriormente). Además, una proteína armazón que tiene una actividad de unión de tipo anticuerpo se puede obtener de un polipéptido aceptor que contiene el dominio armazón, que se puede injertar con los dominios de unión de un polipéptido donante para conferir la especificidad de unión del polipéptido donante sobre el dominio armazón que contiene el polipéptido aceptor. La inserción puede realizarse mediante varios métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, síntesis de polipéptidos, síntesis de ácido nucleico de un aminoácido de codificación, así como mediante diversas formas de métodos recombinantes bien conocidos por los expertos en la técnica.

La reducción o inhibición de la actividad de HER a nivel proteico se puede lograr también mediante la aplicación de inhibidores de bajo peso molecular. Ejemplos de inhibidores de bajo peso molecular pueden incluir compuestos orgánicos, compuestos organometálicos, sales de compuestos orgánicos y organometálicos, sacáridos, aminoácidos y nucleótidos. Los inhibidores de bajo peso molecular incluyen además moléculas que, de otro modo, se considerarían moléculas biológicas, a excepción de que su peso molecular es preferentemente no mayor que 600, más preferentemente no mayor que 450. Por lo tanto, los inhibidores de bajo peso molecular también pueden ser lípidos, oligosacáridos, oligopéptidos y oligonucleótidos y sus derivados. Estas moléculas se denominan simplemente inhibidores de bajo peso molecular, ya que normalmente tienen pesos moleculares no superiores a 600 y no se interpretará que el término está restringido a un peso molecular específico. Los inhibidores de bajo peso molecular incluyen compuestos que se encuentran en la naturaleza, así como compuestos sintéticos.

En una realización, el modulador de HER es un inhibidor de bajo peso molecular que inhibe el crecimiento celular. En otra realización, el modulador de HER es un inhibidor de bajo peso molecular que inhibe al menos parcialmente la transducción de señales mediada por HER. Se han descrito diversos inhibidores de bajo peso molecular dirigidos contra receptores HER. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, el inhibidor de bajo peso molecular es uno del grupo que comprende gefitinib, erlotinib, lapatinib, BIBW2992, AV412. En otra realización, el inhibidor de bajo peso molecular pertenece al grupo de los moduladores indirectos de HER tales como kahahalide F (Janmaat et al, 2005) o inhibidores de los receptores de estrógenos, tales como tamoxifeno.

La solicitud también abarca combinaciones de sus moduladores de HER, por ejemplo moduladores de HER dirigidos contra el mismo receptor, por ejemplo, HER3, o moduladores de HER dirigidos contra diferentes receptores HER, por ejemplo, HER3 y HER1, HER3 y HER2, HER3 y HER4. Por ejemplo, se pueden usar combinaciones de anticuerpos.

La presente solicitud se refiere adicionalmente a un método para determinar la capacidad de respuesta del trastorno a la administración de al menos un modulador de un receptor HER y/o un agente adicional como se describe con detalle más adelante.

El principio activo, por ejemplo el modulador de HER, normalmente se administra como una composición farmacéutica. La composición puede estar en forma sólida, líquida o gaseosa y puede estar, entre otras, en forma de (un) polvo(s), (un) comprimido(s), (una) solución(es) o (un) aerosol(es). Dicha composición puede comprender al menos uno, por ejemplo dos, tres, cuatro o cinco compuestos activos.

La composición farmacéutica es útil para el tratamiento de una enfermedad como se indica a continuación. Dicha enfermedad es una enfermedad hiperproliferativa, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad neurodegenerativa. La enfermedad hiperproliferativa puede comprender, entre otras, psoriasis o cáncer de mama, pulmón, colon, riñón, linfoma, piel, ovarios, próstata, páncreas, esófago, de Barret, estómago, vejiga, cuello del útero, hígado, de tiroides, sarcoma de tejidos blandos, melanoma u otras enfermedades hiperplásicas o neoplásicas asociadas con la expresión, sobreexpresión y / o activación del receptor HER.

Como se ha indicado anteriormente, la composición farmacéutica puede comprender al menos un agente activo adicional. Entre los ejemplos de agentes activos adicionales, que pueden usarse de acuerdo con la presente invención se encuentran anticuerpos o inhibidores de bajo peso molecular de otras proteínas cinasas receptoras, tales como IGF-1R, o c-Met, ligandos del receptor tales como el factor endotelial vascular (VEGF), agentes citotóxicos o antineoplásicos, tales como doxorubicina, compuestos de platino tales como cisplatino o carboplatino, citocinas, moléculas antisentido, aptámeros o moléculas de ARNs. Muchos agentes antineoplásicos Actualmente se conocen en la técnica. El agente citotóxico o antineoplásico pueden ser seleccionados de entre el grupo de proteínas terapéuticas incluyendo, pero no limitados a, anticuerpos o proteínas inmunomoduladoras, o del grupo de los inhibidores de moléculas pequeñas o agentes quimioterapéuticos que consiste en inhibidores de la mitosis, inhibidores de cinasas, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la histona desacetilasa, agentes antiproliferación, modificadores de la respuesta biológica, antihormonas, por ejemplo antiandrógenos y agentes antiangiogénesis. Cuando el agente antineoplásico es la radiación, el tratamiento se puede lograr con una fuente interna (braquiterapia BT) o externa (radioterapia de haz externo: RTHE).

El término "enfermedad" cuando se utiliza en la presente invención deberá significar cualquier afección que se beneficiaría de un tratamiento médico o que esté asociada con una expresión, activación y / o la transducción de señal anormales del receptor HER. Esto incluye enfermedades crónicas y agudas o enfermedades que incluyen las afecciones patológicas que predisponen al candidato a la enfermedad en cuestión. Una enfermedad preferida que se va a tratar de acuerdo con la presente invención es una enfermedad hiperproliferativa. Una enfermedad hiperproliferativa como se ha mencionado anteriormente incluye cualquier neoplasia, es decir cualquier crecimiento nuevo anormal y/o incontrolado de tejido. El término "nuevo crecimiento incontrolado de tejido" como se usa en el presente documento puede depender de una función alterada y/o pérdida de regulación del crecimiento. Una enfermedad hiperproliferativa incluye además enfermedades tumorales y/o cáncer, tales como cánceres metastásicos o invasivos. En una realización preferida concreta del método de la presente invención, dicha enfermedad hiperproliferativa está en el cerebro, el sistema nervioso central, el sarcoma de tejidos blandos,

neoplasias malignas hematológicas, en la cavidad oral, la cabeza y el cuello, las mamas, los pulmones, el colón, cáncer gástrico, renal, linfoma, de piel, de ovarios, de próstata, de páncreas, de esófago, de vejiga urinaria, de cuello uterino, de hígado, cáncer de tiroides, melanoma, cáncer de origen desconocido u otras enfermedades hiperplásicas o neoplásicas asociadas con la expresión, sobreexpresión y/o activación del receptor HER, por ejemplo hiperfosforilación.

Una enfermedad que está asociada con la expresión o sobreexpresión de un receptor de HER es una enfermedad con células que comprenden sobre su superficie celular una proteína del receptor HER y/o una unión del ligando a un receptor HER. Por ejemplo, una enfermedad que “expresa” un miembro de la familia de HER es uno que tiene niveles significativamente altos de un receptor HER, tal como HER3, en la superficie celular del mismo, en comparación con una célula sana del mismo tipo de tejido. Dichas expresión puede estar producida por una amplificación génica o por una transcripción o traducción aumentadas. La expresión del receptor HER se puede determinar en un ensayo diagnóstico o pronóstico evaluando los niveles de la proteína HER presente sobre la superficie de una célula (p. ej., mediante inmunohistoquímica; IHQ). Como alternativa, o adicionalmente, se pueden medir los niveles del ácido nucleico que codifica HER en la célula, por ejemplo, mediante técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH; véase el documento WO 98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia de tipo Southern o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). La expresión del ligando de HER se puede determinar diagnósticamente evaluando los niveles del ligando (o un ácido nucleico que lo codifica) en el paciente mediante varios ensayos diagnósticos tales como matrices de ADN, transferencia de tipo Northern, FISH, transferencia de tipo Southern, PCR o ensayos basados en proteínas descritos anteriormente. Además, al poner en práctica la presente invención se puede evaluar la presencia de varias isoformas de HER3 en N-terminal o concentraciones séricas circulantes de los dominios del receptor.

Además de los ensayos anteriores, el experto en la materia dispone de otros varios ensayos. Por ejemplo, se pueden exponer las células dentro del organismo del paciente a un anticuerpo que está marcado opcionalmente con un marcador detectable, por ejemplo un isótopo radiactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a las células en el paciente (p. ej., mediante barrido externo de la radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente expuesto previamente al anticuerpo).

La enfermedad se puede asociar con la activación de HER. La activación de un miembro de la familia de HER puede implicar generalmente la formación de oligómeros de HER, seguido de la activación de la actividad cinasa receptora intrínseca, la unión de moléculas intracelulares de segundo mensajero al receptor y/o la modificación, por ejemplo fosforilación de la tirosina, del receptor HER y/o las moléculas de segundo mensajero, que conduce a respuestas biológicas específicas, como, por ejemplo, proliferación celular, migración celular o antiapoptosis.

Otro aspecto de la presente solicitud se refiere a un método de determinar y/o predecir la sensibilidad de una enfermedad o afección asociada con la transducción de señal mediada por el receptor HER a un modulador de HER, opcionalmente en combinación con un agente adicional, que comprende analizar una muestra detectando la expresión y/o la actividad de un receptor HER en dicha muestra. Preferentemente, el método comprende detectar la expresión y/o la actividad de un receptor HER3. Más preferentemente, el método comprende detectar la actividad, por ejemplo el grado de la fosforilación de un receptor HER3.

Por ejemplo, de acuerdo con la presente solicitud, el método puede usarse para la detección de un receptor HER en una célula, para la determinación de la concentración del receptor HER en sujetos que sufren una enfermedad como se ha mencionado anteriormente o para la estadificación de dicha enfermedad en un sujeto. Con el fin de estadificar la progresión de una enfermedad en un sujeto en estudio o de caracterizar la respuesta del sujeto a un curso de terapia, la cantidad del receptor HER presente en la muestra y / o su nivel de activación se determina en una muestra de tejido tomada del sujeto. La cantidad así identificada se correlaciona con un estadio de progresión o una etapa de tratamiento identificada en las diversas poblaciones de sujetos diagnosticados, de modo que se proporciona una determinación del estadio de la enfermedad en el sujeto en estudio. La cantidad y / o la actividad del receptor HER presente en el tejido de la enfermedad se puede evaluar mediante inmunohistoquímica, ELISA o matrices de anticuerpos, incluyendo anticuerpos fosfoespecíficos usando el receptor HER y / u otros anticuerpos de la transducción de señales. Otros métodos adecuados pueden incluir tecnologías basadas en perlas, tales como ensayos de perlas Luminex y enfoques proteómicos (geles 2-D, análisis EM, etc.). Las preparaciones celulares con requisitos previos metodológicos tales como inhibidores de la fosfatasa (orto-vanadato, Suramina, H_2O_2 o inhibidores específicos), como sería el caso de los comprimidos inhibidores de la fosfatasa, podrían concebirse como parte de la cuantificación de antígenos / epítopos fosfoespecíficos.

Otros parámetros de interés diagnóstico y que pueden formar parte de la presente invención son el estado de oligomerización, así como las parejas de oligomerización de un receptor HER. En la materia de conocen bien los métodos analíticos de proteínas para determinar dichos parámetros y son, entre otros, las técnicas de transferencia de tipo Western e inmunoprecipitación, análisis FACS, reticulación química, transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET), transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) y similares (por ejemplo, Price et al, *Methods in Molecular Biology*, 218: 255-268 (2002) o la tecnología eTag (documentos WO 05/03707, WO 04/091384, WO 04/011900).

La actividad cinasa se puede medir capturando la cinasa en el lisado celular mediante un anticuerpo con inmunoprecipitado y después se somete a reacciones de actividad cinasa en presencia de ^{32}P - γ -TP. La actividad de la cinasa en la reacción se analiza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)-dodecilsulfato sódico (SDS) y autorradiografía. Como alternativa, los ensayos *in vitro* de la cinasa se pueden realizar con métodos no radiactivos de detección (por ejemplo, ensayos de cinasa CST) o péptidos sintéticos que pueden servir como sustratos para un receptor HER, tal como HER3, se pueden observar sobre matrices para estimar la actividad cinasa HER.

En otro aspecto de la presente invención, el nivel de activación de un receptor HER se correlaciona con el estado de activación de una molécula de segundo mensajero implicada en la transducción de señal mediada por el receptor HER. En consecuencia, una realización de la presente invención se refiere a un método para identificar la capacidad de respuesta de una enfermedad al tratamiento con un modulador de HER, mediante la obtención de al menos una muestra de un sujeto en riesgo de sufrir dicha enfermedad o que la sufre, examinar la expresión y / o la actividad de al menos una molécula implicada en la transducción de señal mediada por el receptor HER en un ensayo celular e identificar una enfermedad como respondedora si se detecta expresión y / o actividad de al menos una molécula implicada en la transducción de señal mediada por el receptor HER. Preferentemente se examina la expresión y/o la actividad de HER3, opcionalmente en combinación con otros receptores HER.

"La ruta de señalización" o la "transducción de señal" se refiere a una serie de acontecimientos moleculares que habitualmente comienzan con la interacción de un receptor de superficie celular con un ligando extracelular o con la unión de una molécula intracelular a un sitio fosforilado de un receptor de superficie celular, por ejemplo, un receptor HER, que desencadena una serie de interacciones moleculares, donde la serie de interacciones moleculares da como resultado una regulación de la expresión génica en el núcleo de una célula. Las expresiones "molécula intracelular", "molécula de segundo mensajero", "molécula implicada en la señalización mediada por receptor HER" o "sustrato del receptor HER" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a moléculas que participan en las rutas de señalización mediadas por HER, como se revisa en, por ejemplo, Citri y Yarden, *Nat Reviews Mol Cell Biol*, 2006 (7), 505-516; Shawver et al, *Cancer Cell*, 2002 (1), 117-123; Yarden and Slivkowski, *Nat Reviews Mol Cell Biol*, 2001 (2), 127-137. Ejemplos de moléculas que pueden formar parte de una ruta de señalización mediada por el receptor HER incluyen, entre otras, proteínas PI3K, proteínas Akt, proteínas Grb2, proteínas Grb7, proteínas Shc, proteínas Gab-1, proteínas Sos, proteínas Src, proteínas Cb, proteínas PLC γ , proteínas Shp2, proteínas GAP, proteínas Vav, proteínas Nck y proteínas Crk.

En una forma de realización preferida de la presente solicitud, el estado de fosforilación de uno de los receptores HER o de sus sustratos se puede evaluar como medida de la expresión y activación del receptor. Como es bien conocido en la técnica, la fosforilación de un receptor HER indica que el receptor se ha activado y es el mecanismo de la transducción de la señal aguas abajo.

La fosforilación de uno o múltiples residuos de tirosina en un receptor HER o en uno o más de sus sustratos se puede analizar utilizando diversos ensayos de fosforilación de tirosina. Por ejemplo, los receptores HER o sus sustratos se pueden inmunoprecipitar con anticuerpos específicos a partir de lisados de células que expresan receptores HER y sus sustratos, y, después, se analizan para determinar la actividad de fosforilación de la tirosina utilizando un anticuerpo monoclonal fosfotirosina (que está opcionalmente conjugado con un marcador detectable). En una realización preferida, la fosforilación de tirosina de los receptores HER y sus sustratos se detecta usando anticuerpos fosfoespecíficos. En una realización concreta, dicho anticuerpo fosfoespecífico se selecciona del grupo que comprende anticuerpos HER3 fosfoespecíficos 21 D3 (Y1289, Cell Signalling Technology, EE.UU.) y 50C2 (Y1222, Cell Signalling Technology, EE.UU.), así como pEGFR, pHER2, pHER4, pIGF-1R, pAkt, pErk, pBad, pp70-S6K, pGSK, p-src, pPyk2, estando cubiertas todas las fosfotirosinas relevantes en una proteína dada.

En general, se entiende que la expresión "anticuerpo fosfoespecífico" representa un anticuerpo policlonal o monoclonal que se une a un epítipo fosforilado en un receptor HER y/o una molécula de segundo mensajero asociada con la transducción de señal mediada por HER. Por ejemplo, el epítipo fosforilado puede incluir al menos un residuo de serina fosforilado. En un aspecto preferido de la presente invención, el epítipo fosforilado puede incluir al menos un residuo de tirosina fosforilado. En una realización preferida concreta de la presente invención, el residuo de fosfotirosina se selecciona del grupo que consiste en Y1054, Y1197, Y1199, Y1222, Y1224, Y1260, Y1262, Y1276, Y1289 y Y1328 y en la proteína HER3 (numeración de acuerdo con Kraus et al, *PNAS* 1989 (86) 9193-9197). El término también abarca un anticuerpo recombinante fosfoespecífico, por ejemplo anticuerpo monocatenario o un fragmento del mismo, que contiene al menos un sitio de unión al antígeno, un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, Fab' o F(ab') $_2$ o un fragmento recombinante tal como un fragmento scFv y un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano dirigido contra un epítipo fosforilado en un receptor HER y/o una molécula asociada con la transducción de señal mediada por HER.

Los anticuerpos policlonales fosfoespecíficos se pueden obtener mediante métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, cualquier animal que se sabe que produce anticuerpos se puede inmunizar con un polipéptido del receptor fosfo-HER. El anticuerpo que contiene suero se aísla del animal inmunizado y se somete a detección selectiva para determinar la presencia de anticuerpos con la especificidad deseada usando métodos como, por ejemplo, ELISA o FACS.

Köhler et al., Nature, 256:495 (1975) describen por primera vez métodos para la producción de anticuerpos monoclonales producidos por el método del hibridoma. Los anticuerpos monoclonales también se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.816.567) o se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1 %), por ejemplo.

Las formas humanizadas de los anticuerpos se pueden generar de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, tales como quimerización o injerto del CDR. La presente invención también se refiere a un hibridoma o línea celular recombinante, que produce los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente o fragmentos de unión de los mismos.

Una enfermedad que responde al tratamiento muestra mejoras estadísticamente significativas en respuesta a un tratamiento con modulador de HER en comparación con la ausencia de tratamiento o el tratamiento con placebo en un modelo de animal reconocido o en un ensayo clínico con seres humanos. Los términos “tratar” o “tratamiento” hacen referencia tanto al tratamiento terapéutico como al profiláctico o medidas preventivas, en los que el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio fisiológico indeseado o trastorno, tal como el desarrollo de una enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo cáncer. Para los fines de la presente invención, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad y remisión (total o parcial) detectable o no detectable. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia prevista si no está recibiendo tratamiento. Aquellos están en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya presentan la afección o trastorno, así como aquellos propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que la afección o trastorno debe prevenirse.

La presente solicitud proporciona un método de tratamiento de un sujeto que lo necesite, que comprende determinar la expresión y/o la activación de un receptor HER en dicho sujeto y administrar a un sujeto donde la expresión y/o activación del receptor HER se ha determinado, una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador de HER y, opcionalmente, al menos un agente adicional. Preferentemente se determina la activación del receptor HER. Más preferentemente, el receptor HER es HER3.

Dependiendo del tipo de modulador HER, del tipo y la gravedad de la afección a tratar, se pueden administrar aproximadamente 0,01-10.000 mg del modulador HER a un paciente que lo necesite, por ejemplo mediante una o más administraciones distintas o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1.000 mg/kg o más, en función de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas en varios días o más, según la afección que se va a tratar, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad.

La dosis del al menos un agente antineoplásico administrado depende de varios factores. Estos son, por ejemplo, la naturaleza del agente, el tipo de tumor o la vía de administración. Cabe destacar que la presente solicitud no está imitada a ninguna dosis.

Adicionalmente, la presente invención proporciona métodos y procedimientos adicionales para evaluar la eficacia terapéutica de un modulador de HER o una composición farmacéutica que comprende un modulador de HER y/o al menos un agente adicional.

La determinación de la farmacodinamia de un modulador dirigido a un receptor HER y/o una ruta de señalización mediada por el receptor HER puede implicar tinción inmunohistoquímica con anticuerpos fosfoespecíficos de muestra de tejido enfermo, por ejemplo tejido tumoral, con el fin de cuantificar el nivel de activación de los receptores HER y/o moléculas de segundo mensajero relacionadas.

Sorprendentemente, se ha descubierto que también se pueden determinar parámetros farmacodinámicos relevantes, por ejemplo el nivel de activación de un receptor HER3, en muestras de tejido primario normal, es decir, no enfermo. Esto permite establecer un ensayo rápido, cuantitativo, reproducible y barato que es compatible con la actual instrumentación de los laboratorios clínicos, donde la presencia de HER3, en particular en su forma activada, en los tejidos humanos primarios se puede determinar mediante, por ejemplo, inmunohistoquímica.

Los resultados presentados en los ejemplos más adelante en el presente documento demuestran que las células tumorales humanas expresan HER3. Sorprendentemente, también se detectó un nivel de expresión y/o actividad de HER3 muy fuerte en los folículos pilosos. Mientras que la expresión de HER3 total se localizó principalmente en el citoplasma, el HER3 fosforilado, es decir activado, se asoció casi exclusivamente con las membranas de la superficie celular.

Este hallazgo respaldó la idea de que la presencia de HER3 activado, por ejemplo fosforilado, en dichos tejidos podría usarse para una determinación rápida y fácil de la eficacia de un modulador de HER3 cuando se administra a un sujeto. Por ejemplo, una reducción al menos parcial de la activación del receptor HER3 indica una cantidad

terapéuticamente eficaz de dicho modulador. Por el contrario, ninguna diferencia en la actividad del receptor HER3 tras el tratamiento con un modulador de HER3 se correlaciona con un tratamiento terapéutico ineficaz. Por tanto, estos hallazgos pueden sentar la base de un método nuevo y eficiente para monitorizar la terapia dirigida al receptor HER3. Adicionalmente, las biopsias de folículos pilosos sirven como marcador farmacodinámico para monitorizar el tratamiento dirigido con un modulador de HER3.

De acuerdo con lo anterior, la presente solicitud proporciona un método para determinar la eficacia terapéutica del tratamiento de un receptor HER, en particular una enfermedad asociada con el receptor HER3 con un modulador de HER y/o un agente activo adicional, que comprende exponer a un sujeto al modulador de HER y/o al agente activo adicional, obtener al menos una muestra del sujeto, detectar el nivel de activación del receptor HER en dicha muestra, donde se observa una diferencia en el nivel de activación de HER como resultado de la exposición al modulador de HER y/o al agente activo adicional en comparación con la ausencia de la exposición al modulador de HER y/o al agente activo adicional.

El término "muestra", como se incluye en la presente invención, significa, preferentemente, el uso de una muestra de tejido para la detección de una forma activada de un miembro de la familia de HER o cuantificación de la expresión del receptor HER. Preferentemente, el receptor HER es HER3. El nivel de activación es, preferentemente, el grado de fosforilación.

Con la expresión "muestra de tejido" se pretende incluir un conjunto de células obtenidas de un tejido de un sujeto o paciente que contiene, preferentemente, células nucleadas con material proteico. Los cuatro tejidos humanos principales son (1) epitelio; (2) tejidos conjuntivos, incluidos vasos sanguíneos, hueso y cartílago, (3) tejido muscular y (4) tejido nervioso. La fuente de la muestra de tejido se puede seleccionar del grupo que comprende tejidos sólidos, por ejemplo de una muestra o biopsia o aspirado de tejido o de órgano fresco, congelado y/o conservado. La presente invención también incluye el uso de muestras derivadas de sangre o de constituyentes de la sangre, fluidos corporales tales como líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial, y células de cualquier momento de la gestación o desarrollo del sujeto. La muestra de tejido también pueden ser líneas celulares o células primarias o cultivadas. La muestra de tejido puede contener compuestos que no están entremezclados de forma natural con el tejido en la naturaleza, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijantes, nutrientes, antibióticos o similares.

Para su uso en la presente solicitud, la muestra de tejido puede ser una sola parte o trozo de una muestra de tejido, por ejemplo una lámina fina de tejido o células cortadas o microdisecionadas de una muestra de tejido. En general, las matrices de tejido pueden ser muestras de tejido fijadas en formalina cortadas en secciones finas y montadas en portaobjetos de vidrio silanizado que se pueden usar para el análisis de la expresión y la localización celular a nivel proteico, de ARN o de ADN. En una realización preferida se montan al menos 10 muestras sobre un portaobjetos de vidrio silanizado. En una realización más preferida se montan al menos 20 muestras sobre un portaobjetos de vidrio silanizado. En una realización lo más preferida se montan 40 muestras o más sobre un portaobjetos de vidrio silanizado.

El tejido se puede fijar (es decir, conservar) mediante métodos convencionales conocidos para un experto en la técnica. Con el fin de conservar la morfología celular, el tejido se puede fijar en formalina tamponada neutra al 4 % durante 16-20 horas e incluir en parafina.

En una realización preferida de la presente solicitud, la muestra de tejido es una muestra de folículo piloso que se puede obtener usando un procedimiento de biopsia por punción. Áreas adecuadas para tomar las biopsias son el antebrazo, las extremidades superiores y el torso. Los sitios seleccionados deben tener crecimiento visible de pelo.

El tamaño de la biopsia puede variar de entre 2 y 8 mm, siempre que sea posible se debe obtener una muestra con un diámetro de al menos 3,5 mm. La piel se limpia y se anestesia. Con el fin de limitar las molestias al administrar la anestesia se usa una aguja pequeña. Para elegir el área para la biopsia se deberán identificar las líneas de menor tensión en la piel. Por ejemplo, en el brazo, estas líneas son perpendiculares al eje largo de la extremidad. La línea de incisión creada mediante la sutura después de realizar la biopsia se orientará en paralelo a las líneas de menor tensión en la piel. Los médicos que no pueden recordar la orientación de la línea para un área específica del cuerpo deberán consultar los dibujos extensamente publicadas de estas líneas. La piel se estira perpendicularmente a las líneas de menor tensión en la piel. Cuando la piel se relaja después de realizar la biopsia queda una herida de forma elíptica que está orientada en la misma dirección que las líneas de menor tensión de la piel. En el brazo, la piel se estira a lo largo del eje largo de la extremidad. El instrumento para la biopsia por punción se sujeta verticalmente sobre la piel y se rota hacia abajo usando un movimiento de rotación. Una vez que el instrumento ha atravesado la dermis y llegado a la grasa subcutánea o una vez que el instrumento alcanza el núcleo, se retira. La muestra de piel cilíndrica se sube con la aguja de la anestesia. No se recomienda el uso de pinzas porque estos instrumentos pueden producir artefactos por aplastamiento. Después se corta la muestra de los tejidos subcutáneos. El corte se realiza por debajo del nivel de la dermis. La herida se cierra, si es necesario, con una o dos suturas de nylon interrumpidas. Para la mayoría de las áreas no faciales se usa nylon de 5-0 y para la mayoría de las áreas faciales se usa nylon 6-0. La muestra de piel se transfiere inmediatamente a medio tampón y se procesa adicionalmente para analizar (proteínas).

Áreas adecuadas para la obtención de pelo son el cuero cabelludo (Región posterior del cuello), las cejas y las pestañas. El número de pelos individuales recogidos puede variar de entre 2 y 6, siempre que sea posible se deberán obtener al menos 4 pelos individuales (folículos). Sin anestesia adicional se tira de los pelos de las regiones descritas anteriormente. Los pelos se inspeccionan para saber si el eje y el folículo están intactos, y la muestra adecuada se montará individualmente sobre los portaobjetos para su posterior procesamiento y análisis de proteínas.

Con el fin de conservar los fosfoepítomos en material fijado e incluido en parafina, las muestras de tejido deben procesarse lo más rápidamente posible, es decir, en cuanto el cirujano ha retirado el material de biopsia se debe fijar/congelar y después procesar. Las soluciones de fijación que se van a usar pueden depender de los fosfoepítomos específicos que se van a analizar.

La expresión "eficacia terapéutica" hace referencia a la cantidad de un modulador de HER y/o un agente adicional eficaz para bloquear al menos parcialmente la activación del receptor HER. La cantidad terapéuticamente eficaz muestra resultados beneficiosos o clínicos como se ha mencionado anteriormente. En una realización preferida, la cantidad terapéuticamente eficaz puede reducir el número de células cancerosas, reducir el tamaño del tumor, inhibir al menos parcialmente la infiltración por células cancerosas en los órganos periféricos y metástasis tumoral, inhibir al menos parcialmente el crecimiento del tumor y/o aliviar al menos parcialmente uno o más de los síntomas asociados con el cáncer.

Por tanto, la presente solicitud también proporciona un método para determinar la eficacia terapéutica de un modulador de HER y/o un agente adicional en un sujeto usando el nivel de activación del receptor HER como marcador sustituto.

Como se usa en el presente documento, con el término "sujeto" se quiere decir un individuo o un paciente, tratado o no tratado con un modulador de HER o una composición farmacéutica que comprende un modulador de HER y al menos un agente adicional, para cualquier finalidad. El término "sujeto" también puede incluir animales, preferentemente mamíferos, tales como ratón, rata, conejo, perro, cerdo y primates no humanos, por ejemplo mono cinomolgo, chimpancé, que se tratan con un modulador de HER. El término paciente hace referencia a un ser humano que necesite un tratamiento con un modulador de HER y/o al menos un agente adicional. Preferentemente, el ser humano necesita dicho tratamiento para tratar una enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo cualquier enfermedad neoplásica o cáncer.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1a, b muestran la fosforilación basal de HER3 en líneas de células tumorales;

La Fig. 2a muestra la fosforilación basal y la expresión de HER3 en mama;

La Fig. 2b muestra la fosforilación basal y la expresión de HER3 en líneas celulares de cáncer de pulmón;

La Fig. 2c muestra la fosforilación basal y la expresión de HER3 en líneas celulares de cáncer de colon;

La Fig. 2d muestra la fosforilación basal y la expresión de HER3 en líneas celulares de cáncer de páncreas;

La Fig. 2e muestra la fosforilación basal y la expresión de HER3 en líneas celulares de cáncer gástrico;

La Fig. 2f muestra la fosforilación basal y la expresión de HER3 en líneas celulares de cáncer melanoma;

La Fig. 2g muestra la fosforilación basal y la expresión de HER3 en líneas celulares de cáncer de próstata;

Fig. 3: Correlación entre la expresión de HER3 y pHER3 *in vitro* en todas las líneas celulares analizadas;

La Fig. 4a muestra la fosforilación basal y la expresión de HER3 en líneas celulares de cáncer seleccionadas;

Fig. 4b: Correlación entre la expresión de pHER3 y la sensibilidad al tratamiento anti-HER3;

Fig. 5a: Expresión de HER3 en folículos pilosos humanos. Inmunotinción y detección de peroxidasa de folículos pilosos humanos usando anticuerpos monoclonales contra HER3;

Fig. 5b: Fosforilación de HER3 en folículos pilosos humanos. Inmunotinción y detección de peroxidasa de folículos pilosos humanos pHER3 usando el anticuerpo monoclonal 21D3 que muestra niveles elevados de fosforilación de HER3 membranoso.

Fig. 6: Fosforilación de HER3 en tejidos normales humanos. Inmunotinción y detección de peroxidasa de tejido normal humano pHER3 usando el anticuerpo monoclonal 21D3 que muestra niveles elevados de fosforilación de

HER3 membranoso. Se muestra el tracto GI (izquierda), los testículos (en medio) y el epitelio de la vejiga urinaria (derecha).

Fig. 7: Tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal de conejo anti-pHer3 (señalización celular 21D3, Lote 4 dilución a 1:650, 0,074 ug/ml) sobre secciones en FFPE de xenoinjertos de BxPC3, 20x.

(A) y (B) Tumor tras la administración de 500 µg/ratón de IgG1 control
(C) y (D) Tumor tras la administración de 500 µg/ratón del anticuerpo u3-1287. Las tinciones se realizaron por duplicado en tres xenoinjertos independientes.

Fig. 8: Tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal de conejo anti-pHer3 (señalización celular 21D3, Lote 4 dilución a 1:650, 0,074 ug/ml) sobre secciones en FFPE de xenoinjertos de BxPC3, 20x.

(A) Tumor tras la administración del anticuerpo U3-1287 a 25 µg/ratón
(B) Tumor tras la administración del anticuerpo U3-1287 a 100 µg/ratón
(C) Tumor tras la administración del anticuerpo U3-1287 a 200 µg/ratón
(D) Tumor tras la administración del anticuerpo U3-1287 a 500 µg/ratón
(E) Tumor tras la administración de 500 µg/ratón de IgG1 control.

Las tinciones se realizaron por duplicado en tres xenoinjertos independientes.

Fig. 9: Tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-pHer3 (Dako-H3-IC, dilución de 1:250, 0,52 ug/ml) sobre secciones en FFPE de xenoinjertos de BxPC3, 20x.

(A) y (B) Tumor tras la administración de 500 µg/ratón de IgG1 control
(C) y (D) Tumor tras la administración del anticuerpo U3-1287 a 500 µg/ratón

Las tinciones se realizaron por duplicado en tres xenoinjertos independientes.

Fig. 10: Tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-pHer3 (Dako-H3-IC, dilución de 1:250, 0,52 ug/ml) sobre secciones en FFPE de xenoinjertos de BxPC3, 20x.

(A) Tumor tras la administración del anticuerpo U3-1287 a 25 µg/ratón
(B) Tumor tras la administración del anticuerpo U3-1287 a 100 µg/ratón
(C) Tumor tras la administración del anticuerpo U3-1287 a 200 µg/ratón
(D) Tumor tras la administración del anticuerpo U3-1287 a 500 µg/ratón
(E) Tumor tras la administración de 500 µg/ratón de IgG1 control

Las tinciones se realizaron por duplicado en tres xenoinjertos independientes.

Fig. 11: Tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal de conejo anti-pHer3 (señalización celular 21 D3, Lote 4 dilución a 1:8000, 0,006 ug/ml) sobre secciones en FFPE de xenoinjertos de Calu-3, 40x.

(A) y (B) Tumor tras la administración de 25 mg/ratón de IgG1 control 72 h
(C) y (D) Tumor tras la administración del anticuerpo U3-1287 a 25 mg/kg 72 h

Las tinciones se realizaron por duplicado en cinco xenoinjertos independientes.

Ejemplos

La detección de la fosforilación basal de HER3 se concibió para subrayar la activación del receptor autocrina y representar un marcador de selección para modelos potencialmente adecuados en el uso de intervención terapéutica dirigida a HER3. Con este fin se eligieron varias líneas celulares y se analizaron para determinar su contenido en fosfo-HER3 en presencia o ausencia de suero. Un experimento inicial mostró que la línea de células tumorales pancreáticas Bx-PC3 contiene niveles elevados de HER3 fosforilado basalmente, es decir activado, en células a las que no se ha administrado suero y a las que sí, lo que indica que Bx-PC3 puede ser un modelo adecuado para un abordaje terapéutico anti-HER3 (Fig.1 a).

En experimentos adicionales se confirmó el hallazgo en las células Bx-PC3 y se extendió la observación de la fosforilación basal de HER3 a células A549 y A431 (Fig.1b).

Después, en base a estos hallazgos se analizaron más líneas celulares de forma sistemática y se extendieron a líneas de células tumorales de 7 indicaciones diferentes de cáncer (mama, pulmón, colon, páncreas, próstata, gástrico, melanoma) (Fig.2a-g).

El HER3 en general fosforilado, es decir activado, se detectó en aproximadamente 2/3 de las líneas de células tumorales analizadas. No se pudieron detectar diferencias significativas entre fosforilación en presencia de suero y sin suero (Fig 3a, b).

La hipótesis de que la presencia de HER3 fosforilado en las líneas de células tumorales *in vivo* implica y predice la capacidad de respuesta a la intervención dirigida a HER3 se analizó en estudios posteriores *in vivo* usando líneas celulares tales como Bx-PC3, HT-144 y T47D, entre otros. A partir de estos estudios, la eficacia *in vivo* se correlacionó con la expresión de pHER3 *in vitro*, lo que sugiere que el HER3 activado serviría como marcador sustituto para la terapia (Fig. 4a, b).

Con el fin de aplicar los resultados obtenidos de análisis de transferencia de tipo Western *in vitro* y experimentos en xenoinjerto animal *in vivo* a un escenario terapéuticamente relevante, los autores investigaron la presencia de HER3 y su forma activada en tejidos humanos primarios mediante inmunohistoquímica. La expresión de HER3 se detectó en varias muestras de tumores, incluyendo una presencia prominente en el melanoma. Por el contrario, no se detectó expresión de HER3 en piel humana pero, sorprendentemente, fue muy fuerte en los folículos pilosos (Fig. 5a, b).

Mientras que la expresión de HER3 total se localizó principalmente en el citoplasma, el HER3 fosforilado, es decir activado, se asoció casi exclusivamente con las membranas de la superficie celular. Este hallazgo respaldó la idea de que la presencia de HER3 fosforilado en dichos tejidos podría usarse para seleccionar pacientes de tumores respondedores a la terapia anti-HER3. Adicionalmente, además de monitorizar la terapia dirigida a HER3, las biopsias de folículos pilosos podrían servir como marcador farmacodinámico para monitorizar el tratamiento dirigido a HER3. El HER3 activado también se detectó en una serie de tejidos humanos normales adicionales, incluyendo el tracto GI, los testículos y la vejiga urinaria (Fig. 6).

Una reducción de la intensidad de tinción de la membrana, una reducción de las células tumorales en comparación con el número de células enteras en el tumor y una reducción de las células positivas para pHer3 en comparación con el número de células enteras en el tumor se encontró tras la administración del anticuerpo anti-HER3 (Fig. 7, 8 y 11).

La reducción de la intensidad de la tinción y la reducción de las células positivas a Her3 se correlaciona con la reducción del volumen tumoral (Fig. 9 y 10).

El papel de HER3 en piel normal no se ha caracterizado anteriormente. La expresión de ARN se detectó anteriormente en piel posnatal (Kraus et al, 1989). Por tanto, el presente análisis de los autores representa la primera descripción a este respecto. Sorprendentemente, los autores hallaron que HER3 y su forma activada se expresan en los folículos pilosos y en células de las glándulas eccrinas y sebáceas. Esto no se esperaba, ya que no se ha indicado que la pareja preferida de HER3, HER2, se exprese en estos tejidos. Esto abre el uso de HER3 activado para la selección de pacientes etc. Al contrario que el EGFR activado, el HER3 activado no se localiza intracelularmente, sino predominantemente es membranoso. La expresión de HER3 (activado) tampoco se observó en queratinocitos normales, en los que la expresión de EGFR está extendida (la expresión de HER3 es bastante baja en los queratinocitos (Laux et al, 2006). Por tanto, el uso de HER3 para el diagnóstico/selección y terapia puede no solo proporcionar un régimen con efectos secundarios menos graves en comparación con la terapia con EGFR que produce un importante exantema cutáneo, pero se puede demostrar que es muy útil para la monitorización de la terapia de combinación.

Fosforilación de HER3 en líneas de células tumorales

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos durante la noche, sin suero o se cultivaron con medio de crecimiento que contiene 10 % de FCS durante 24 horas y se trataron con tampón de lisis durante 20 minutos. El lisado se limpió mediante centrifugación durante 30 minutos y el HER3 se inmunoprecipitó del lisado bruto con un anticuerpo monoclonal anti-HER3 específico (1B4C3). Los inmunoprecipitados se incubaron durante 4 horas a 4 °C, se lavaron tres veces con 1x HNTG (Hepes 50 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM, 10 % de Glicerina, EDTA 1 mM a pH 8,0, 0,1 % de Triton X-100) y se desnaturalizaron 3x con tampón Laemmli que contiene b-mercaptoethanol durante 5 minutos a 100 °C. Las muestras de proteína se separaron mediante 7,5 % de SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con antifosfotirosina (4G10) o anti-pHER3 (21D3). Las fosfoproteínas se detectaron con anticuerpos secundarios POD anti-ratón (para 4G10) o POD anticonejo (para 21D3). Las membranas se rasparon y se volvieron a sondear con anticuerpo anti-HER3 (sc-285).

Fosforilación de HER3 en muestras de tejido

Usando un microtomo se cortaron secciones de 2-4 µm de espesor, se montaron en portaobjetos de vidrio silanizado y se secaron a 60 °C durante 30 minutos y a 38 °C durante la noche. La desparafinización y la rehidratación de la muestra se lograron incubando 2 x 5 minutos en Xylol, 2x2 minutos en 100 % de etanol y 2 minutos cada uno en 96 %, 80 % y 70 % de etanol. Después de lavar durante 20 segundos en agua destilada, los portaobjetos se incubaron durante dos minutos en PBS. Para la recuperación de antígeno, las muestras se incubaron en un vaporero que

contiene una cubeta cargada con EDTA 1 mM a pH 8,0 a 96-98 °C durante 20 minutos. Los portaobjetos se enfriaron durante 20 minutos a TA, después se lavaron 5 minutos en A. dest. A excepción de la incubación con el anticuerpo primario pHER3, se realizaron las siguientes etapas a temperatura ambiente:

Las peroxidasas endógenas se bloquearon durante 20 minutos en RE7101 (3 gotas por sección, Novocastra). Las secciones se lavaron después 5 minutos en A. dest. y 5 minutos en tampón TBS. La tinción de fondo inespecífica se bloqueó mediante incubación con 10 % de suero de cabra en PBS durante 20 minutos. La solución se tapó y las secciones se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-pHER3 de conejo (10 µg/ml (Lote nº 3), Cell Signaling) durante la noche a 4 °C en una cámara humidificada (1:40 en tampón de dilución Dako). Como isotipo de IgG se usó IgG control de conejo absorbida (15 g/l, X0936 Dako) (1:50.000 en tampón de dilución Dako). Para eliminar el anticuerpo, los portaobjetos se lavaron 2 x 5 minutos con TBS/TWEEN 0,05 % y 1 x 5 minutos con TBS. Se añadió bloqueo posprimario RE7111, Novocastra) (3 gotas por secciones) durante 30 minutos, seguido de lavados como se ha indicado anteriormente. Después se añadió NovoLink Polymer RE7112 (3 gotas por sección, Novocastra), se incubó durante 30 minutos y se retiró en una etapa de lavado como se ha indicado anteriormente. La tinción se consiguió mediante incubación con 100 µl de solución de DAB-sustrato-cromógeno durante 10 minutos. En una última etapa, los portaobjetos se lavaron tres veces en agua destilada fresca, se realizó contratinción con hematoxilina de Harris y se cubrieron con un portaobjetos de vidrio.

Experimentos en xenoinjertos

La eficacia antitumoral de un modulador de HER se evaluó en estudios de tumores de xenoinjerto humanos. En estos estudios, se cultivaron los tumores humanos como xenoinjertos en ratones inmunocomprometidos y la eficacia terapéutica se midió mediante el grado de inhibición del crecimiento tumoral en respuesta a las administraciones del modulador de HER. Con el fin de determinar si un modulador de HER, como se define en los párrafos anteriores, interfiere al menos parcialmente con el crecimiento del tumor de células de cáncer humano *in vivo*, las células se implantaron en ratones atímicos / atímicos o SCID, utilizando protocolos conocidos por el experto en la materia (Sausville y Burger, (2006), Cancer Res. 66, 3351-3354). Por ejemplo, las células tumorales se inyectaron bajo la piel de ratones atímicos, lo que tiene como resultado el crecimiento tumoral subcutáneo en la parte dorsal de los animales. El tratamiento se inició en el momento de la implantación de las células tumorales o cuando los tumores habían alcanzado un tamaño definido, por ejemplo, un volumen medio de 20-50 mm³. Antes del primer tratamiento, se aleatorizó a los ratones para garantizar volúmenes tumorales uniformes (media, mediana y desviación estándar) en todos los grupos de tratamiento. El régimen de dosificación típico incluía administraciones semanales de 25 mg / kg del modulador de HER en el interperneo. El primer tratamiento incluyó una dosis de carga de 50 mg / kg. Los ratones en las ramas de tratamiento con control recibieron agentes, por ejemplo, doxorubicina (de calidad farmacéutica) con una actividad citostática o citotóxica conocida contra las células tumorales humanas.

Detección de la fosforilación de HER3 en tejidos de pacientes humanos

Para la selección de pacientes susceptibles de recibir un tratamiento con AcMo anti-HER3, la activación de los receptores HER3 se medirá a través de IHQ en muestras celulares (material tumoral en el momento del diagnóstico, material tumoral fresco antes del tratamiento, tejido normal) derivadas de un paciente que se considera un candidato para un tratamiento con AcMo anti-HER3. La muestra celular se logrará a través de diversos métodos de biopsias (por ejemplo, por punción, cepillado, incisional, central) u otros métodos (por ejemplo, arrancamiento de cabello y folículos pilosos, frotis bucal). El material de tejido recogido se procesará, fijará y analizará para determinar la presencia de pHER3 (ensayo cualitativo) y la cantidad relativa de pHER3 (ensayo cuantitativo) mediante inmunohistoquímica u otros métodos aplicables (por ejemplo rtPCR, WB). Se calculará una puntuación de activación para pHER3 y el sujeto será incluido en el estudio clínico/tratamiento de rutina en consecuencia.

Evaluación de la eficacia de un inhibidor de HER3

La eficacia de un anticuerpo anti-HER3 en la reducción de la activación del receptor HER3 y / o la transducción de señales mediada por HER3 se puede evaluar en muestras celulares derivadas de un sujeto al que se ha tratado con dicho anticuerpo anti HER3. Las muestras celulares se pueden recuperar de la forma descrita anteriormente, el momento de la obtención de las muestras depende de la duración del tratamiento, el programa y el seguimiento de la terapia, pero se tomarán al menos 2 muestras (una al inicio del tratamiento y uno en el momento en que la respuesta es máxima). Las mediciones cuantitativas y cualitativas de los 2 puntos de tiempo se compararán y el efecto farmacodinámico se calculará desde el delta / desplazamiento de los valores para la activación de los receptores HER3. El tejido normal (por ejemplo, piel, folículos pilosos) servirá como el tejido sustituto para el tejido tumoral, ya que el tejido normal puede ser más fácilmente accesible para el diagnóstico clínico de rutina.

Desarrollo del índice pronóstico para sujetos susceptibles a la terapia con AcMo anti-HER3

Para los pacientes que han recibido un tratamiento con AcMo anti-HER3, el resultado del tratamiento se correlacionará con el nivel de fosforilación de HER3 y la modulación de la fosforilación / activación en el tiempo. El índice pronóstico resultante se comparará con los índices estándar (por ejemplo, el grado del tumor, el estadio, los

datos demográficos del paciente, el tratamiento) y se determinará si pHER3 puede servir como marcador superior para la eficacia del tratamiento, el índice pronóstico para el desenlace, las variabilidades en respuesta al tratamiento o la recurrencia de la enfermedad. En última instancia, la fosforilación de HER3 puede convertirse en un nuevo marcador sustituto para la evaluación de una puntuación de los riesgos/beneficios o un pronóstico positivo / negativo con respecto al tratamiento con el AcMo anti-HER3 y otros tratamientos antineoplásicos dirigidos o clásicos.

Estudio clínico para identificar los pacientes de cáncer para el tratamiento con un anticuerpo anti-HER3

Una muestra celular que comprende células normales y / o cancerosas se obtiene de un sujeto que se considera elegible para el tratamiento. Los siguientes métodos se utilizan en la práctica clínica habitual para recuperar una muestra de tejido: frotis (bucal, frotis nasal), cortes (uñas de los dedos de las manos, uñas de los dedos de los pies), aspiración con aguja fina, biopsia por punción, biopsia de cepillado, biopsia por raspado, biopsia utilizando pinzas u otros instrumentos quirúrgicos, aspiración (por ejemplo, de sangre, de médula ósea), punción (por ejemplo, ascitis, derrame pleural, líquido cefalorraquídeo), citología abrasiva (microdérmica), incisión, extirpación quirúrgica de partes de órganos o de estructuras anatómicas enteras (resección en bloque, extirpación del tumor, tumorectomía), procedimiento quirúrgico asistido por radiación (cirugía gamma-cuchillo, cirugía asistida por láser), lavado (por ejemplo, lavado broncoalveolar, lavado abdominal), drenaje externo de los órganos (por ejemplo, hidrocefalia, nefrostomía, drenaje T de las vías biliares). También se puede usar cualquier otro método conocido en la práctica clínica para la recolección de muestras de tejido. La muestra biológica se analiza para detectar la fosforilación de HER3, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación o análisis de transferencia de tipo Western, y / o para determinar la presencia de heterodímeros de HER2 / HER3 y / o HER3 / HER4 por cualquiera de las técnicas descritas anteriormente.

Estudio clínico para monitorizar la eficacia del tratamiento con un modulador de HER3

Los pacientes con tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de pulmón, colorrectal, de mama) se someterán a al menos 2 biopsias para la evaluación de los efectos farmacodinámicos de un tratamiento con AcMo anti-HER3 evaluado a través de cambios / modulaciones en la fosforilación de HER3. Al inicio del estudio se estratificará a los pacientes según el nivel de pHER3 y en el momento de la respuesta clínica máxima se tomará una segunda muestra de tejido del paciente. Se analizarán las muestras para determinar la expresión de pHER3 (cuantitativa y cualitativa) y los resultados se correlacionan con otros parámetros y el resultado clínico. Un aumento en la activación de pHER3 puede considerarse como progresión o falta de respuesta, mientras que una disminución de pHER3 se puede considerar respuesta a la terapia. Los pacientes con al menos una estabilización de los niveles de pHER3 (incremento ≤ 25 % del valor inicial) continuarán el tratamiento con la terapia AcMo anti-HER3, los pacientes con un aumento de pHER3 > 25 % con respecto al valor basal se considerarán en progresión y se interrumpirá el tratamiento con terapia con AcMo anti-HER3.

REIVINDICACIONES

1. Un método de identificación de la capacidad de respuesta de una enfermedad al tratamiento con un modulador de HER, que comprende

(a) examinar la actividad de al menos un receptor HER3 en una muestra de un sujeto en riesgo de sufrir o dicha enfermedad o que tiene dicha enfermedad, e

(b) identificar una enfermedad como respondedora si se detecta actividad de al menos un receptor HER3, donde la detección de la actividad del receptor HER3 comprende una determinación del nivel de fosforilación del receptor HER3 usando un anticuerpo fosfoespecífico.

2. El método de la reivindicación 1, donde la enfermedad es una enfermedad hiperproliferativa, preferentemente una enfermedad tumoral o psoriasis, donde la enfermedad tumoral se selecciona, preferentemente, del grupo que consiste en NSCLC, cáncer de mama, de colon, gástrico, melanoma, de páncreas o de próstata.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde el anticuerpo fosfoespecífico es un anticuerpo que reconoce un residuo de tirosina fosforilada en un receptor HER3, donde el anticuerpo fosfoespecífico está dirigido, preferentemente, contra al menos uno de los residuos de tirosina Y1289 o Y1222 en la proteína HER3, donde el anticuerpo fosfoespecífico es, preferentemente, el anticuerpo HER3 fosfoespecífico 21 D3 o 50C2.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la muestra es una muestra de tejido que se selecciona preferentemente del grupo de tejidos sólidos, como de una muestra o biopsia o aspirado de tejido u órgano fresco, congelado y/o conservado.

5. Un método para determinar la eficacia terapéutica de un modulador de HER3 que comprende detectar el nivel de activación de al menos un receptor HER3 en una muestra de un sujeto que se ha expuesto a al menos uno modulador de HER3, donde se observa una diferencia en el nivel de activación del al menos un receptor HER3 como resultado de la exposición al modulador de HER3 en comparación con la ausencia de la exposición al menos un modulador de HER3, donde la detección de la actividad de un receptor de HER3 se consigue evaluando el nivel de fosforilación usando un anticuerpo fosfoespecífico.

6. El método de la reivindicación 5, donde el modulador de HER3 es un inhibidor dirigido contra al menos un receptor HER3.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-6, donde el anticuerpo fosfoespecífico es un anticuerpo que reconoce un residuo de tirosina fosforilada en un receptor HER3, donde el anticuerpo fosfoespecífico está dirigido, preferentemente, contra al menos uno de los residuos de tirosina Y1289 o Y1222 en la proteína HER3, donde el anticuerpo fosfoespecífico es, preferentemente, al menos uno de los anticuerpos HER3 fosfoespecíficos 21 D3 o 50C2.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde la muestra es una muestra de tejido, donde la muestra de tejido es, preferentemente, una muestra de tejido normal, por ejemplo una muestra de folículo piloso.

9. Un anticuerpo que detecta un receptor HER3 activado, donde el anticuerpo se une, preferentemente, a un epítipo que comprende al menos uno de los residuos de tirosina Y1054, Y1197, Y1199, Y1222, Y1224, Y1260, Y1262, Y1276, Y1289 y Y1328 de HER3.

10. Uso de un anticuerpo de la reivindicación 9 para identificar la capacidad de respuesta de una enfermedad al tratamiento con un modulador de HER3.

11. Un kit para evaluar el nivel de activación de un miembro de la familia de HER3 activado que comprende

(a) un anticuerpo que detecta la expresión de una proteína receptora HER3,

(b) un anticuerpo que detecta la activación de un miembro del receptor HER3.

12. Uso de un modulador de HER3 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que está asociada con la actividad del receptor HER3, donde la expresión, sobreexpresión y/o actividad se ha determinado antes de la administración del modulador de HER3.

13. El uso de la reivindicación 12, donde la capacidad de respuesta de la enfermedad se analiza durante el curso del tratamiento.

Fig. 1a

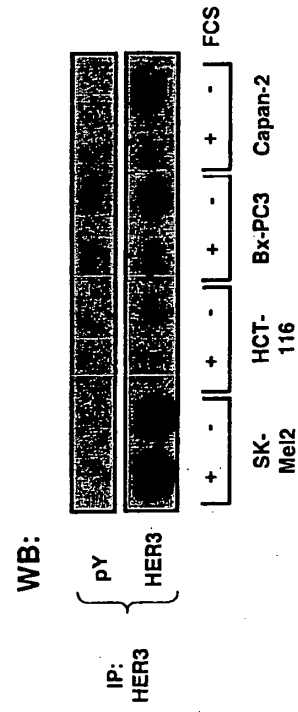


Fig. 1b

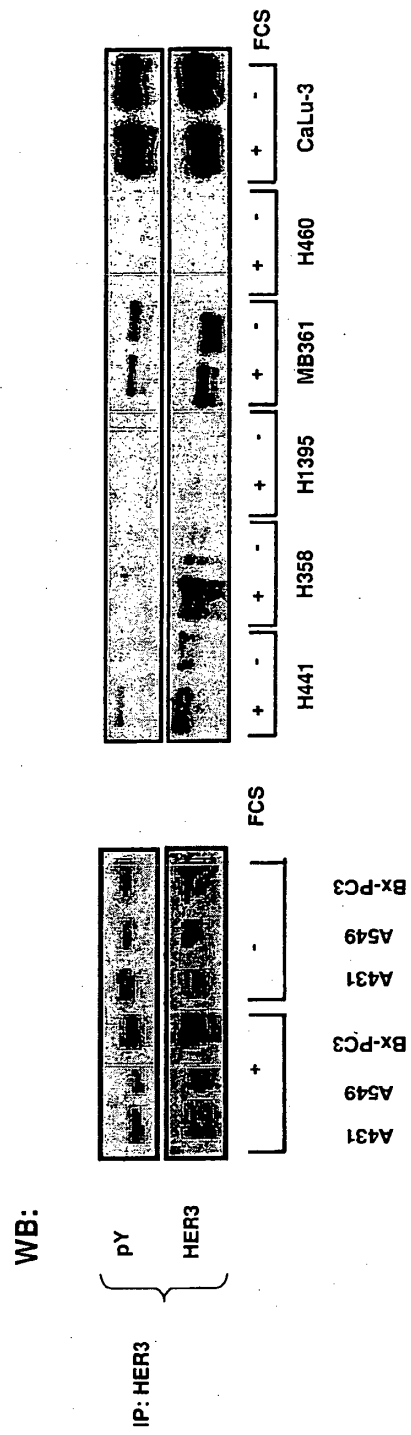


Fig. 2a

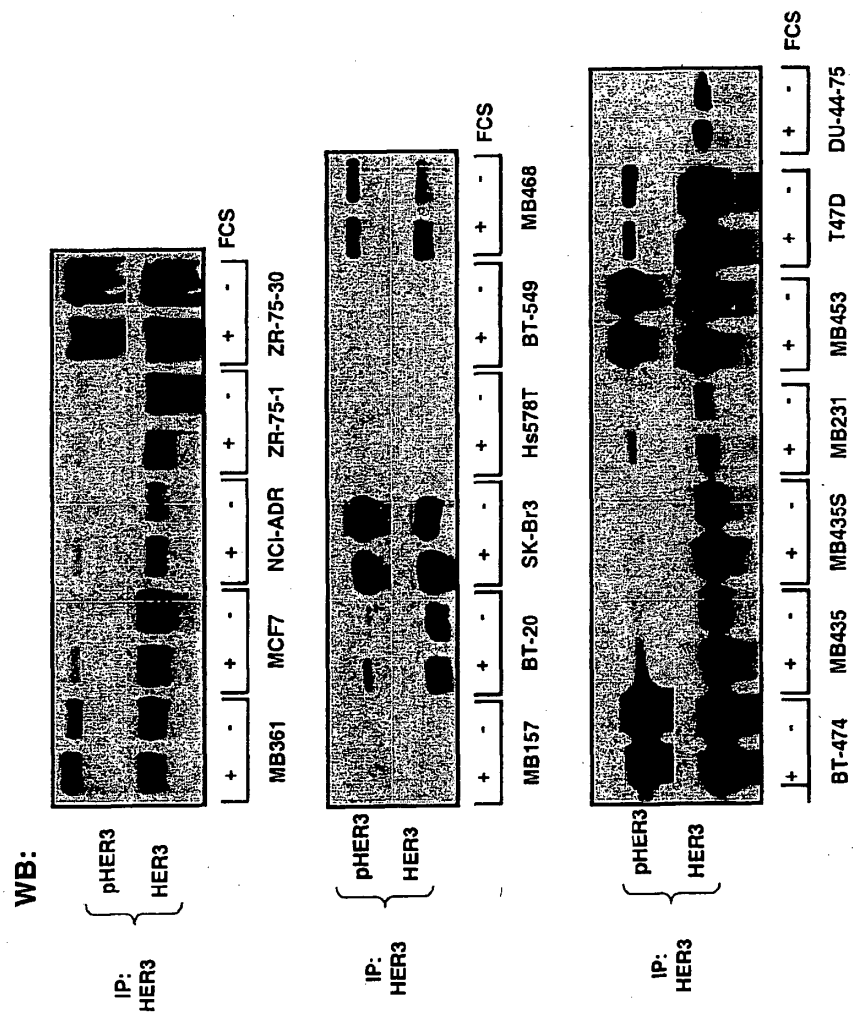


Fig. 2b

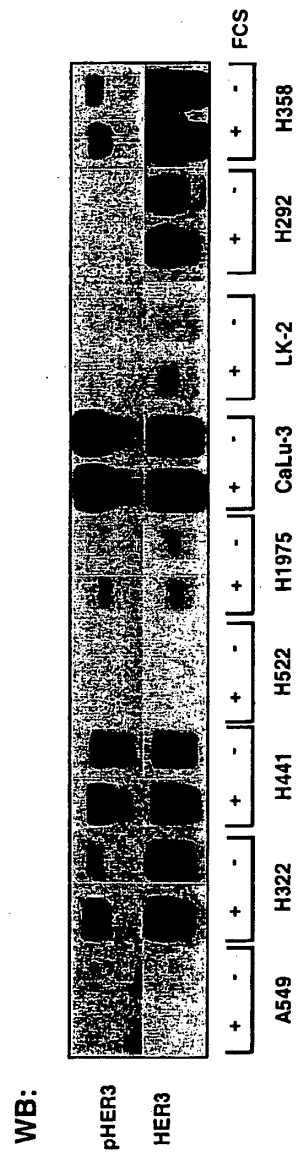


Fig. 2c

WB:

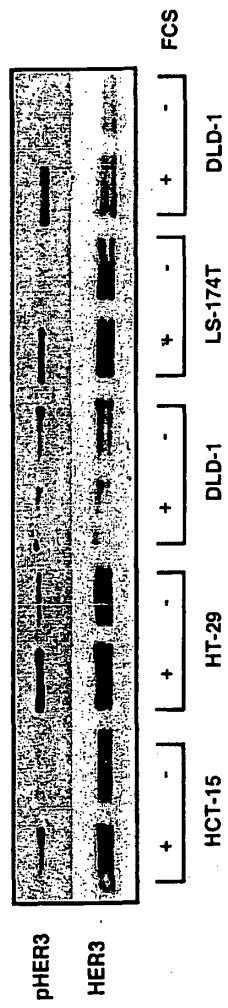


Fig. 2d

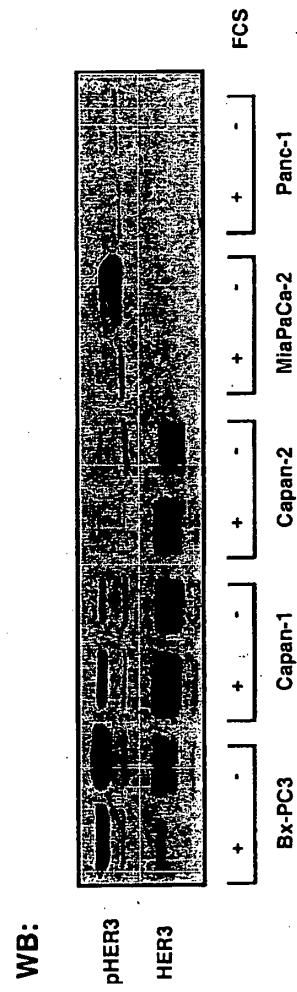


Fig. 2e

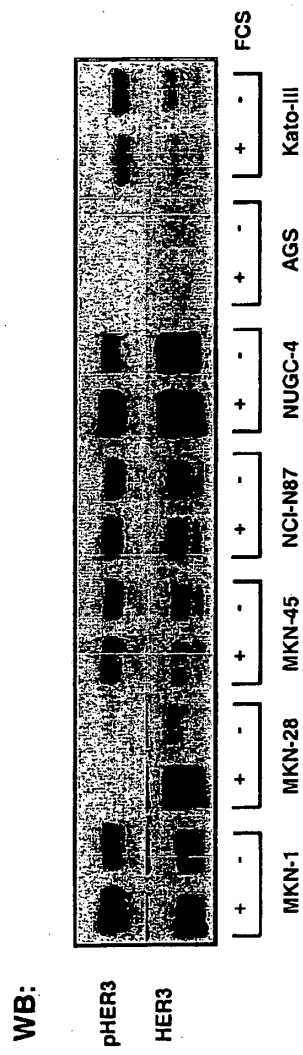


Fig. 2f

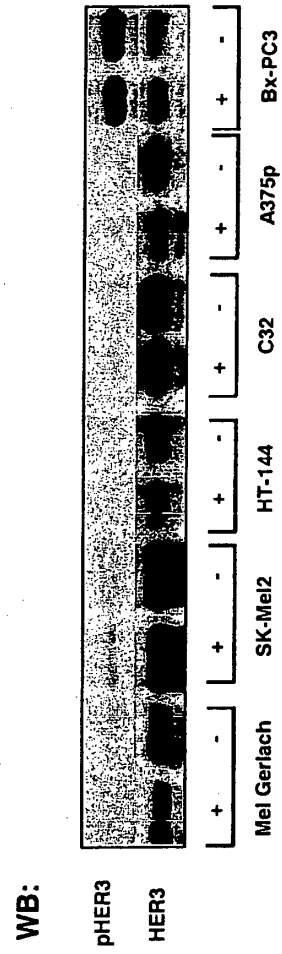


Fig. 2g

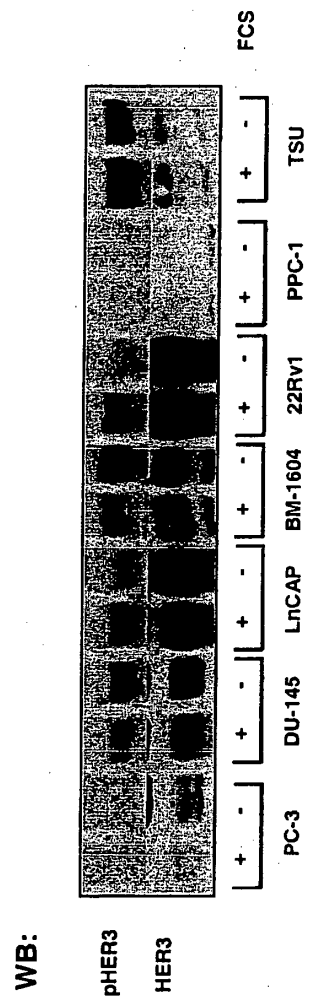


Fig. 3

Indicación	nº líneas cel.	HER3	pHER3	% pHER3/total
Mama	18	15	12	66,7
NSCLC	9	8	7	77,8
Colon	5	5	5	100
Gástrico	7	7	5	71,4
melanoma	5	5	2	40
Páncreas	5	3	3	60
Próstata	7	6	5	71
Total	56	49	39	69,6

Fig. 4a

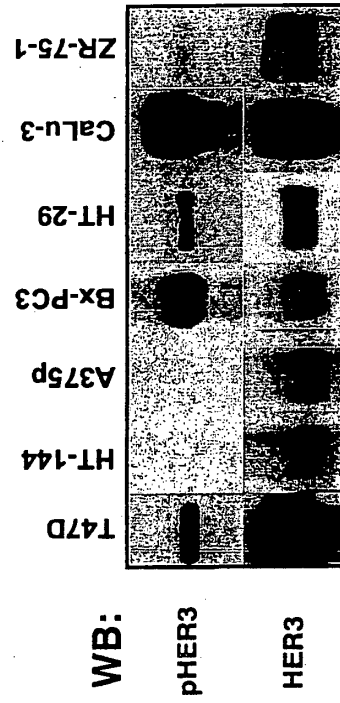


Fig. 4b

	T47D (mama)	HT-144 (melanoma)	A375p (melanoma)	Bx-PC3 (páncreas)	HT-29 (colon)	CaLu-3 (NSCLC)	ZR-75-1 (mama)
pHER3	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí /No
Eficacia in vivo	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	No

Fig. 5a



Fig. 5b



Fig. 6



Fig. 7

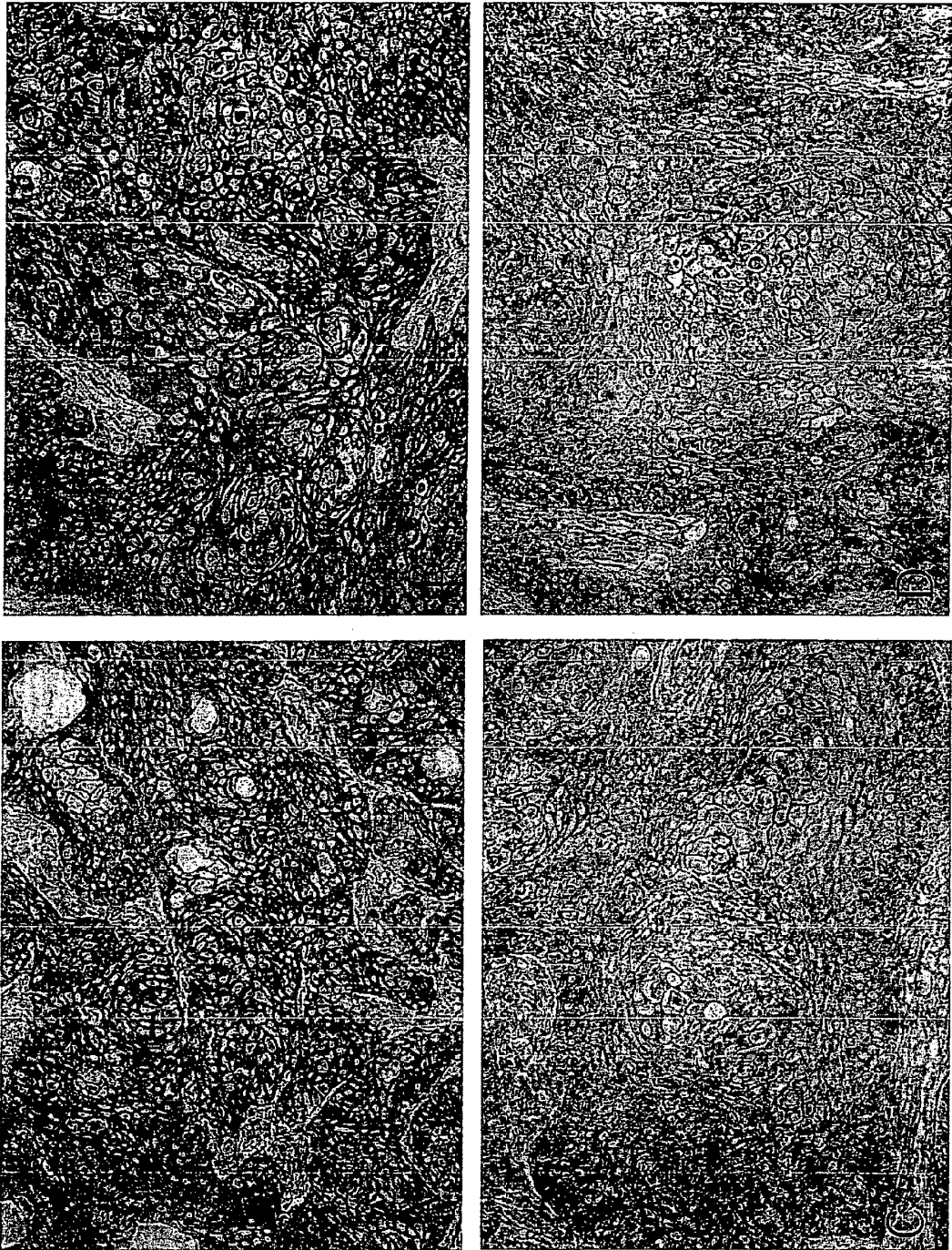


Fig. 8

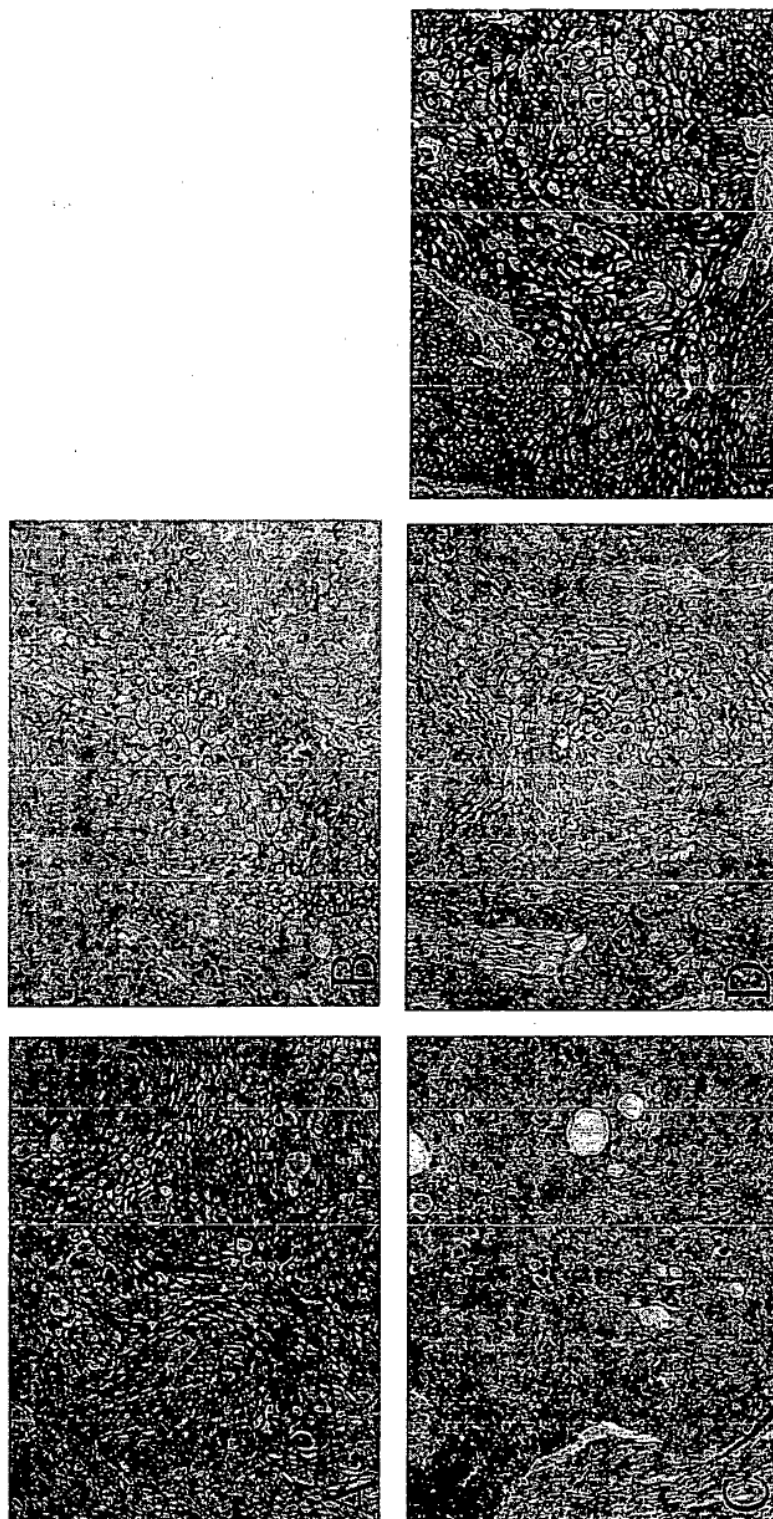


Fig. 9

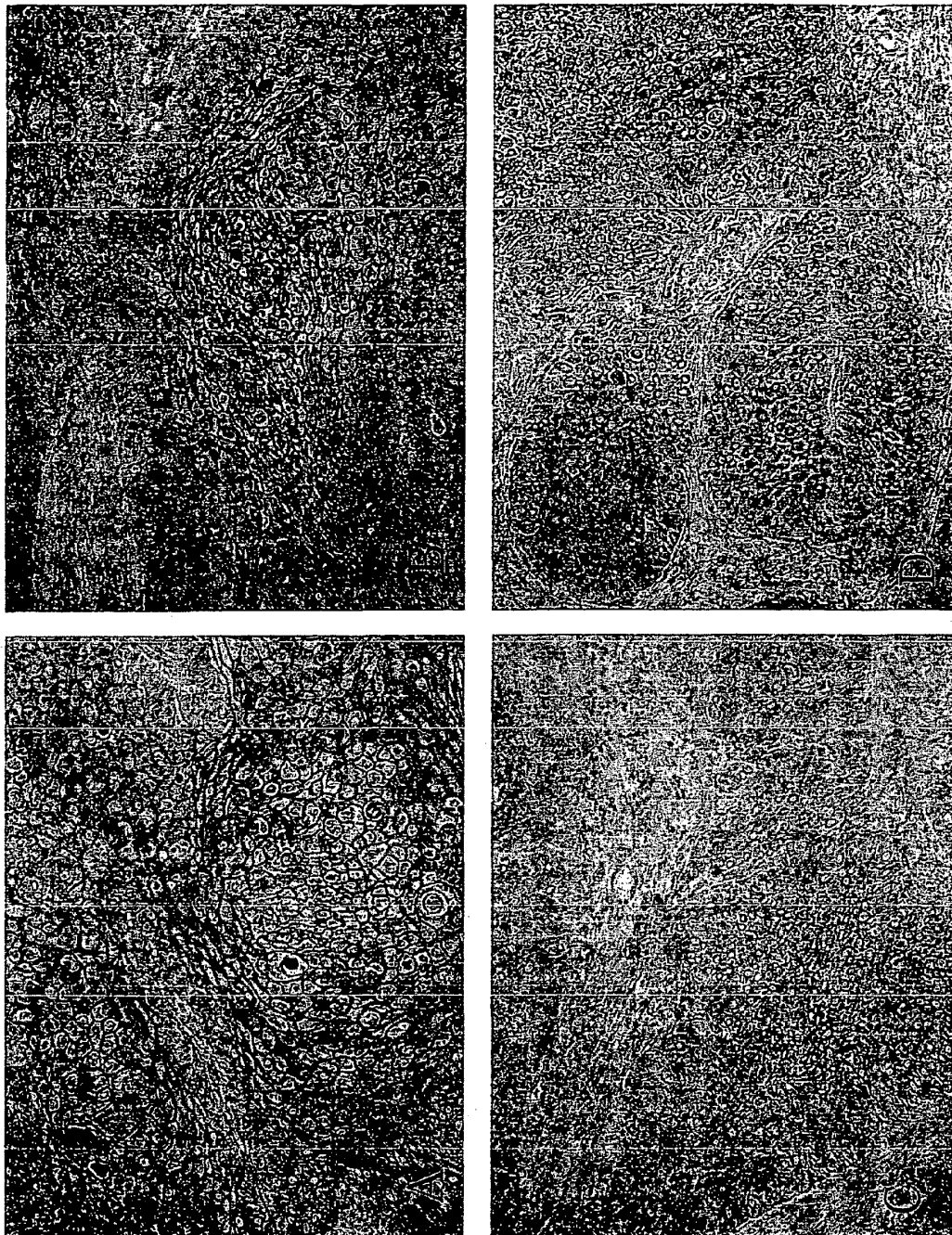


Fig. 10

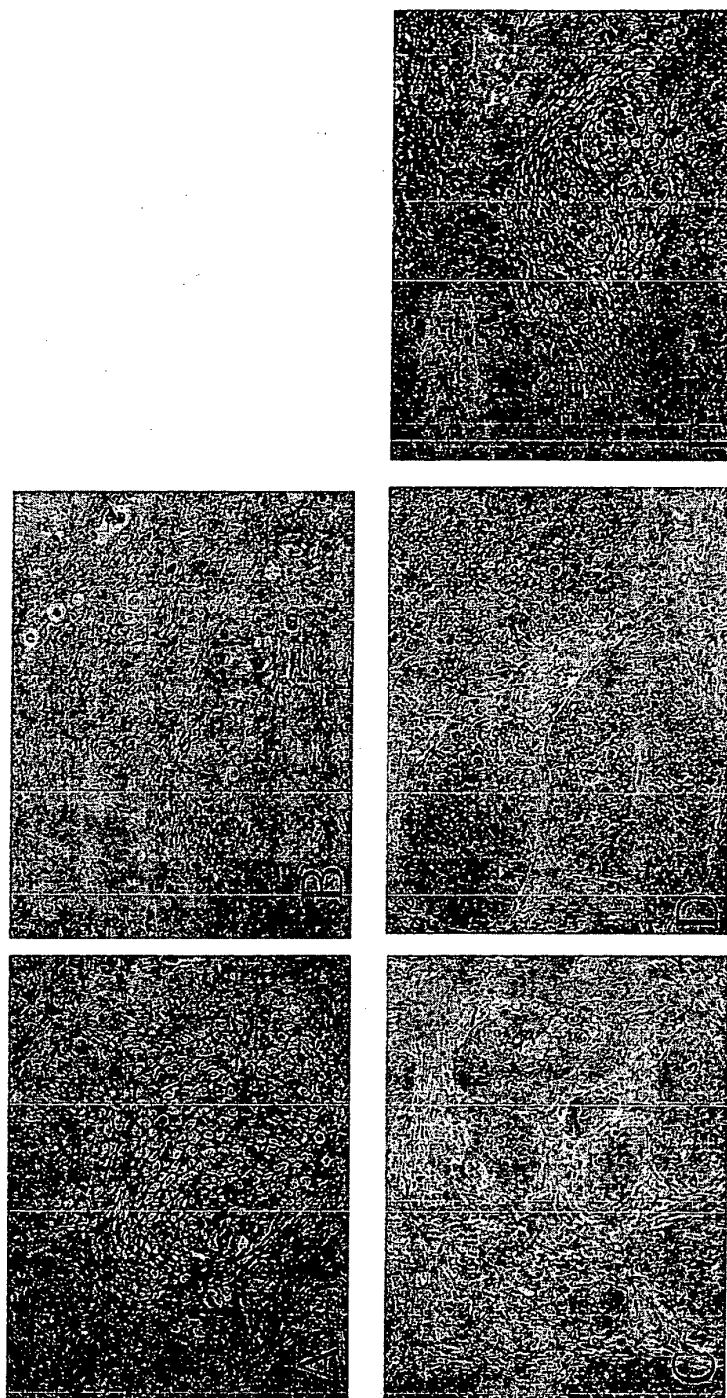


Fig. 11

