

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 790**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2008 E 08742861 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2076289**

54 Título: **Métodos de tratamiento de cáncer resistente a agentes terapéuticos de ERBB**

30 Prioridad:

13.04.2007 US 923384 P

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

25.02.2015

73 Titular/es:

**DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(33.3%)**

**450 Brookline Avenue
Boston, MA 02215, US;**

**BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER,
INC. (33.3%) y**

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION D/B/A
MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL (33.3%)**

72 Inventor/es:

**JANNE, PASI A.;
ENGELMAN, JEFFREY y
CANTLEY, LEWIS C.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 529 790 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

Métodos de tratamiento de cáncer resistente a agentes terapéuticos de ERBB

Solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 60/923.384, presentada el 13 de abril de 2007.

Apoyo gubernamental

La presente invención se hizo con el apoyo gubernamental bajo los números de subvención RO1CA114465 y K08CA120060-01 otorgados por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la presente invención.

10 Antecedentes

15 El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer que representa un tercio de todas las muertes en el mundo. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) representa ~75-85 % de todos los histotipos de cáncer de pulmón, representando el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) el resto. A pesar de la amplia investigación preclínica y clínica, el pronóstico global para pacientes con CPCNP sigue siendo malo, con una tasa de supervivencia a los 5 años de solo el 14 %.

20 En los últimos años, el conocimiento referente a los mecanismos moleculares que subyacen a la transformación y desarrollo celular del cáncer se ha ampliado enormemente. Se han descubierto agentes terapéuticos que eligen como diana receptores de tirosina cinasa, tales como los receptores de ErbB, que participan en una variedad de cánceres, que incluyen cáncer de pulmón. En particular, se han desarrollado agentes que eligen como diana el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un receptor de ErbB. Aunque las terapias dirigidas al EGFR de molécula pequeña, que incluyen los inhibidores de tirosina cinasas de EGFR (TKI) ZD1839 (Iressa™) y erlotinib (Tarceva™), han mostrado buenos resultados clínicos iniciales, las células tumorales frecuentemente desarrollan resistencia con el tiempo y pueden llegar a ser no sensibles a la terapia. Se necesitan nuevos enfoques para tratar pacientes que padecen un cáncer, tal como CPCNP, que no es sensible a terapias con TKI tradicionales.

25 Sumario

La invención se refiere a las realizaciones como se caracterizan en las reivindicaciones. En un aspecto, la invención proporciona un medio para tratar un sujeto que padece un cáncer que ha desarrollado resistencia al tratamiento con un agente terapéutico anti-ErbB como se define en las reivindicaciones

30 En ciertas realizaciones, el cáncer puede ser, por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer gástrico o cáncer pancreático. En una realización a modo de ejemplo, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP).

35 En ciertas realizaciones, el sujeto puede tener una mutación activante de ErbB o amplificación génica (por ejemplo, una mutación activante de EGFR, ErbB2, ErbB3 o ErbB4 o amplificación génica). El sujeto tiene una amplificación del gen MET. En ciertas realizaciones, el sujeto puede tener tanto una mutación activante de ErbB o amplificación génica como una amplificación del gen MET.

40 El cáncer puede ser resistente al tratamiento con uno o más de los siguientes agentes terapéuticos anti-ErbB: un agente terapéutico anti-EGFR, un agente terapéutico anti-ErbB2, un agente terapéutico anti-ErbB3 o un agente terapéutico anti-ErbB4. El agente terapéutico anti-ErbB al que el cáncer es resistente puede ser, por ejemplo, un agente terapéutico de molécula pequeña, un agente terapéutico de ácido nucleico o un agente terapéutico de proteína. El cáncer puede ser resistente al tratamiento con un anticuerpo anti-ErbB, un ARNip dirigido a un gen ErbB, o un inhibidor de cinasas de ErbB. El cáncer es resistente al tratamiento con un inhibidor de cinasas de ErbB. Según la invención, el cáncer es resistente al tratamiento con uno o más de los siguientes agentes terapéuticos anti-EGFR: gefitinib, erlotinib, lapatinib, PF00299804, CI-1033, EKB-569, BIBW2992, ZD6474, AV-412 o HKI-272.

45 En el presente documento se describe que uno o más de los siguientes agentes terapéuticos anti-ErbB se administran al sujeto: un agente terapéutico anti-EGFR, un agente terapéutico anti-ErbB2, un agente terapéutico anti-ErbB3 o un agente terapéutico anti-ErbB4. Agentes terapéuticos anti-ErbB adecuados para administración al sujeto incluyen, por ejemplo, agentes terapéuticos de molécula pequeña, agentes terapéuticos de ácido nucleico o agentes terapéuticos de proteína. Según la invención, uno o más de los siguientes agentes terapéuticos anti-EGFR se administran al sujeto: gefitinib, erlotinib, lapatinib, PF00299804, CI-1033, EKB-569, BIBW2992, ZD6474, AV-412 o HKI-272.

50 En el presente documento también se describe que uno o más de los siguientes agentes terapéuticos anti-MET se

administran al sujeto: un agente terapéutico de molécula pequeña, un agente terapéutico de ácido nucleico o un agente terapéutico de proteína. Según la invención, uno o más de los siguientes agentes terapéuticos anti-MET se administran al sujeto: PHA-665.752, SU11274, SU5416, PF-02341066, XL-880 o MGCD265.

5 En ciertas realizaciones, un agente terapéutico anti-ErbB y un agente terapéutico anti-MET van a administrarse simultáneamente al sujeto. El agente terapéutico anti-ErbB y el agente terapéutico anti-MET pueden administrarse al sujeto como una co-formulación.

10 En ciertas realizaciones, los medios para tratar un sujeto que padece un cáncer como se define en las reivindicaciones pueden comprender además administrar al menos un tratamiento adicional a dicho sujeto. Tratamientos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, administración de un agente terapéutico adicional, radiación, terapia fotodinámica, terapia láser o cirugía.

En ciertas realizaciones, el sujeto que está tratándose puede ser un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano.

15 La memoria descriptiva describe adicionalmente un procedimiento de tratamiento de un sujeto que padece un cáncer asociado a una mutación activante de ErbB o una amplificación del gen ErbB, en el que el sujeto ha desarrollado una resistencia al tratamiento con un agente terapéutico anti-ErbB, que comprende determinar si el sujeto tiene actividad y/o niveles de MET elevados (por ejemplo, una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET), y administrar a aquellos sujetos que tienen una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET un agente terapéutico anti-ErbB y un agente terapéutico anti-MET.

20 También se describe un procedimiento de tratamiento de un sujeto que padece un cáncer asociado a una mutación activante de ErbB o una amplificación del gen ErbB, que comprende: (i) monitorizar un sujeto que está tratándose con un agente terapéutico anti-ErbB para determinar si el sujeto desarrolla elevados niveles y/o actividad de MET (por ejemplo, una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET), y (ii) modificar la pauta de tratamiento del sujeto para incluir un agente terapéutico anti-MET, además del agente terapéutico anti-ErbB, en el que el sujeto ha desarrollado una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET.

25 Adicionalmente se describe un procedimiento de tratamiento de un sujeto que padece un cáncer asociado a una mutación activante de ErbB o una amplificación del gen ErbB, que comprende: (i) monitorizar un sujeto que está tratándose con agente terapéutico anti-ErbB para determinar si el sujeto desarrolla una resistencia al inhibidor, (ii) probar el sujeto para determinar si el sujeto tiene elevados niveles y/o actividad de MET (tal como una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET), y (iii) modificar la pauta de tratamiento del sujeto para incluir un agente terapéutico anti-MET, además del agente terapéutico anti-ErbB, si el sujeto tiene una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET. El paciente con elevados niveles y/o actividad de MET puede tener elevados niveles y/o actividad de HGF.

35 En el presente documento se describe adicionalmente un procedimiento de evaluación de un agente terapéutico anti-ErbB, que comprende: (i) monitorizar una población de sujetos que están tratándose con un agente terapéutico anti-ErbB para identificar aquellos sujetos que desarrollan una resistencia al agente terapéutico, (ii) probar los sujetos resistentes para determinar si los sujetos tienen una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET, y (iii) modificar la pauta de tratamiento de los sujetos para incluir un agente terapéutico anti-MET, además del agente terapéutico anti-ErbB, si los sujetos tienen una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET.

40 Se describe un procedimiento de reducción de la fosforilación de ErbB en una célula cancerosa, en el que dicha célula cancerosa ha adquirido resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB, y en el que dicha célula comprende una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET, que comprende la etapa de poner en contacto la célula con un agente terapéutico anti-MET y un agente terapéutico anti-ErbB. En ciertas realizaciones, ErbB puede ser ErbB-3 y el agente terapéutico anti-ErbB puede ser un agente terapéutico anti-ErbB-3.

45 También se describe un procedimiento de reducción de la señalización mediada por PI3K en una célula cancerosa, en el que dicha célula cancerosa ha adquirido resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB, y en el que dicha célula comprende una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET, que comprende la etapa de poner en contacto la célula con un agente terapéutico anti-MET y un agente terapéutico anti-ErbB.

Adicionalmente se describe un procedimiento de reducción de la señalización mediada por ErbB en una célula cancerosa, en el que dicha célula cancerosa ha adquirido resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB, y en el que dicha célula comprende una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET, que comprende poner en contacto la célula con un agente terapéutico anti-MET y un agente terapéutico anti-ErbB.

50 También se describe un procedimiento de restauración de la sensibilidad de una célula cancerosa a un agente terapéutico anti-ErbB, en el que dicha célula cancerosa ha adquirido resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB, y en el que dicha célula comprende una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET, que comprende poner en contacto la célula con un agente terapéutico anti-MET y un agente terapéutico anti-ErbB.

En el presente documento se describe un procedimiento de reducción del crecimiento o proliferación de una célula cancerosa, en el que dicha célula cancerosa ha adquirido resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB, y en el que dicha célula comprende una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET, que comprende la etapa de poner en contacto la célula con un agente terapéutico anti-MET y un agente terapéutico anti-ErbB.

5 Adicionalmente se describe un procedimiento de aumento de la apoptosis de una célula cancerosa, en el que dicha célula cancerosa ha adquirido resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB, y en el que dicha célula comprende una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET, que comprende la etapa de poner en contacto la célula con un agente terapéutico anti-MET y un agente terapéutico anti-ErbB.

10 También se describe un procedimiento de reducción de la resistencia de una célula cancerosa a un agente terapéutico anti-ErbB, en el que dicha célula cancerosa ha adquirido resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB, y en el que dicha célula comprende una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET, que comprende la etapa de poner en contacto la célula con un agente terapéutico anti-MET y un agente terapéutico anti-ErbB.

15 Se describe un procedimiento de tratamiento de resistencia adquirida al agente terapéutico anti-ErbB en una célula cancerosa, en el que dicha célula comprende una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET, que comprende poner en contacto la célula con un agente terapéutico anti-MET y un agente terapéutico anti-ErbB.

20 En ciertas realizaciones, la célula cancerosa es una célula cancerosa de mamífero, tal como, por ejemplo, una célula cancerosa humana. La célula cancerosa puede ser una línea celular o de una muestra de tejido primario. En ciertas realizaciones, la célula cancerosa puede ser una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer cerebral, una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de cabeza y cuello, una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer gástrico o una célula de cáncer pancreático. En ciertas realizaciones, la célula cancerosa puede ser cualquier cáncer impulsado por ErbB. En ciertas realizaciones, el crecimiento y/o supervivencia de las células cancerosas está promovido por ErbB. En ciertas realizaciones, la célula cancerosa puede comprender una mutación activante de ErbB, tal como, por ejemplo, una mutación activante de EGFR. En ciertas realizaciones, la célula cancerosa puede comprender una amplificación del gen ErbB, tal como, por ejemplo, una amplificación del gen EGFR. En ciertas realizaciones, la amplificación del gen ErbB y/o la amplificación de MET son al menos 2 veces.

En ciertas realizaciones, la célula cancerosa comprende una mutación del gen ErbB asociada a elevada resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB, tal como, por ejemplo, una mutación T790M de EGFR.

30 El agente terapéutico anti-ErbB puede seleccionarse del grupo que consiste en: un agente terapéutico anti-EGFR, un agente terapéutico anti-ErbB2, un agente terapéutico anti-ErbB3 o un agente terapéutico anti-ErbB4. El agente terapéutico anti-ErbB puede ser un agente terapéutico de molécula pequeña, un agente terapéutico de ácido nucleico o un agente terapéutico de proteína. El agente terapéutico anti-ErbB puede ser un anticuerpo, una molécula antisentido o un inhibidor de cinasas de molécula pequeña. Según la invención, el agente terapéutico anti-ErbB es un inhibidor de cinasas de ErbB seleccionado del grupo que consiste en: gefitinib, erlotinib, lapatinib, PF00299804, CI-1033, EKB-569, BIBW2992, ZD6474, AV-412 o HKI-272. Un agente terapéutico de proteína anti-ErbB puede ser un anticuerpo anti-EGFR seleccionado del grupo que consiste en: cetuximab, panitumumab y trastuzumab. Un agente terapéutico de ácido nucleico anti-ErbB puede ser una molécula de ARNip.

40 El agente terapéutico anti-MET puede ser un agente terapéutico de molécula pequeña, un agente terapéutico de ácido nucleico o un agente terapéutico de proteína. El agente terapéutico anti-MET puede ser un anticuerpo dirigido contra MET o anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Según la invención, el agente terapéutico anti-MET es PHA-665.752, SU11274, SU5416, PF-02341066, XL-880 o MGCD265. El agente terapéutico anti-MET puede ser una molécula de ARNip.

45 Poner en contacto la célula con un agente terapéutico anti-MET y un agente terapéutico para ErbB es parte de una pauta terapéutica que comprende al menos una modalidad de tratamiento adicional, tal como, por ejemplo, al menos una modalidad de tratamiento adicional está seleccionada del grupo que consiste en: poner en contacto dicha célula con uno o más agentes terapéuticos adicionales, radiación, terapia fotodinámica, terapia láser y cirugía.

50 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de identificación de un sujeto como candidato para el tratamiento con un agente terapéutico anti-ErbB y un agente terapéutico anti-MET como se define en las reivindicaciones, en el que dicho sujeto se ha tratado con un agente terapéutico anti-ErbB y padece cáncer que ha adquirido resistencia a dicho agente terapéutico anti-ErbB, que comprende detectar una amplificación del gen MET en una célula cancerosa de dicho sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de identificación *in vitro* de un agente terapéutico anti-MET que comprende poner en contacto una célula cancerosa que ha adquirido resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB, como se define en las reivindicaciones en el que dicha célula cancerosa comprende una amplificación del gen MET, con un agente terapéutico anti-ErbB como se define en las reivindicaciones y un compuesto de prueba y detección de un

5 cambio en un proceso celular seleccionado del grupo que consiste en: disminución de la fosforilación de ErbB, disminución de la fosforilación de MET, disminución de la asociación ErbB-MET, disminución de la fosforilación de EGFR, disminución de la fosforilación de AKT, disminución del crecimiento celular, disminución de la proliferación celular y aumento de la apoptosis, en comparación con dicho proceso celular en una célula idéntica puesta solo en contacto con un agente terapéutico anti-ErbB.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de identificación de un sujeto que está tratándose con un agente terapéutico anti-ErbB y que está en riesgo de adquirir resistencia a dicho agente terapéutico anti-ErbB como se define en las reivindicaciones, que comprende detectar la presencia de una amplificación del gen MET en una célula cancerosa de dicho sujeto, en el que la presencia de dicha amplificación del gen MET indica un riesgo de adquirir dicha resistencia.

15 Adicionalmente, en el presente documento se describe un procedimiento de producción de una célula con resistencia adquirida a un agente terapéutico anti-ErbB que comprende poner en contacto una célula que es sensible a un agente terapéutico anti-ErbB con al menos un agente terapéutico anti-ErbB durante al menos 4 semanas e identificación de células que adquieren resistencia a dicho agente terapéutico anti-ErbB. La célula puede no comprender una mutación en un gen ErbB que confiere resistencia a dicho agente terapéutico anti-ErbB.

Se describe adicionalmente una célula producida mediante los procedimientos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, se proporciona una célula que ha adquirido resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB.

20 En otro aspecto, la solicitud describe un procedimiento de tratamiento de un sujeto que padece un cáncer que es resistente al tratamiento con un agente terapéutico anti-ErbB, que comprende administrar al sujeto un agente terapéutico anti-ErbB y un agente que inhibe la activación de MET mediada por HGF. El agente que inhibe la activación de MET mediada por HGF puede ser, por ejemplo, un anticuerpo que previene la unión de HGF a MET, tal como un anticuerpo anti-HGF o un anticuerpo anti-MET.

25 En otro aspecto, la divulgación proporciona una célula o línea celular que comprende una deleción en el exón 19 de EGFR y una amplificación del gen MET. La célula o línea celular puede ser una célula o línea celular de mamífero, tal como, por ejemplo, una célula o línea celular humana. La célula o línea celular también puede ser una célula o línea celular epitelial o una célula o línea celular de adenocarcinoma, tal como, por ejemplo, una línea celular de adenocarcinoma de pulmón. La deleción en el exón 19 puede ser una deleción de los residuos E746-A750 de EGFR humano. El gen MET puede amplificarse al menos 3 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, o de 3-10 veces, de 3-5 veces, o de 5-10 veces. En ciertas realizaciones, el nivel de expresión de proteínas MET se eleva al menos 2 veces, al menos 3 veces, 5 veces, al menos 10 veces o de 3-10 veces, de 3-5 veces o de 5-10 veces en comparación con el nivel de expresión de proteínas MET en una célula que no tiene la amplificación del gen MET. La célula o línea celular puede no comprender una mutación T790M en el gen EGFR. La célula o línea celular puede ser resistente a al menos un TKI, tal como, por ejemplo, un inhibidor de EGFR. La célula o línea celular puede ser resistente a CL-387.785 y/o gefitinib.

Breve descripción de las figuras

35 Lo anterior y otras características y ventajas de la presente invención se entenderán más completamente a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones ilustrativas tomadas conjuntamente con los dibujos adjuntos en los que:

40 **Figura 1.** Las células HCC827 RG son resistentes a gefitinib *in vitro* y contienen una amplificación de *MET*. **A.** La línea celular HCC827, que aloja una mutación en *EGFR* (del E746_A750) y es sensible a gefitinib (CI₅₀ - 4 nM), se hizo resistente a gefitinib cultivándola en concentraciones crecientes de gefitinib. Tanto la línea celular parental HCC827 como dos de los clones resistentes a gefitinib, HCC827 RG5 y HCC827 RG6, se sometieron a ensayo de supervivencia con MTS en concentraciones crecientes de gefitinib. **B.** Células HCC827 RG5 resistentes a gefitinib mantienen la fosforilación de ERBB3 y de Akt en presencia de gefitinib. Se expusieron células HCC827 y HCC827 RG5 a cantidades crecientes de gefitinib durante 6 horas. Las células se lisaron y se sondaron con los anticuerpos indicados. HCC827 RG5 mantienen la fosforilación de ERBB3 y de Akt (y a un menor grado de EGFR) incluso en presencia de gefitinib 10 μM. **C.** Células HCC827 RG5 mantienen la fosforilación de ERBB3 y de MET en presencia de gefitinib. Se hibridaron lisados de células HCC827 y HCC827 RG5 sin tratar y tratadas con gefitinib 1 μM con una matriz de fosfo-tirosina cinasa del receptor (RTK) (R&D Systems) que contiene anticuerpos para 42 fosfo-RTK diferentes. Las células HCC827 y HCC827 RG5 sin tratar contienen cantidades significativas de p-EGFR, p-ERBB2, p-ERBB3 y p-MET. Tras el tratamiento con gefitinib (paneles derechos), en las células HCC827 solo está presente algún p-EGFR residual. **D.** Células HCC827 RG contienen una amplificación focal en el cromosoma 7. Se generó una vista de genoma completo del cambio del número de copias usando la matriz de polimorfismo de un único nucleótido (SNP) Human Mapping 250K Sty (Affymetrix, Inc.) y se analizó usando el programa dChip como se ha descrito previamente. Los clones RG se comparan con la línea celular HCC827 parental. La línea vertical roja a la derecha se fija con respecto a la línea celular parental. Como puede apreciarse, hay una amplificación focal en el brazo largo del cromosoma 7. **E.** La amplificación en células HCC827 RG engloba *MET*, pero no su ligando conocido *HGF* o *EGFR*. Vista ampliada de los datos de la Figura 1D. La amplificación focal del cromosoma 7 oscila de 7g31.1 a 7g33.3 y contiene *MET*, pero no *HGF* o *EGFR*.

Figura 2. La inhibición simultánea de MET y EGFR suprime el crecimiento de células HCC827 RG y conduce a la regulación por disminución de la señalización de ERBB3/PI3K/AKT. **A.** Las células HCC827 RG5 se trataron con concentraciones crecientes de tanto gefitinib como PHA-665752 solos o en combinación y se sometieron a ensayo de supervivencia con MTS (procedimientos). Se inhibió significativamente el crecimiento de células solo cuando se expusieron a gefitinib y PHA665752 en combinación. **B.** Análisis de transferencia Western de las líneas celulares HCC827 y HCC827 RG6, RG7 y RG8 tratadas con tanto gefitinib, PHA-665752 como con ambos fármacos. Las células se trataron durante 6 horas tras tanto gefitinib 1 μ M como PHA-665752 1 μ M solos o en combinación. Se lisaron células y se sondaron con los anticuerpos indicados. A diferencia de en la línea celular HCC827 parental, p-ERBB3 y p-Akt se mantienen en presencia de gefitinib. La inhibición de MET solo en las líneas celulares parentales o resistentes no tiene efecto significativo sobre p-ERBB3 o p-AKT. Sin embargo, en combinación con gefitinib, hay inhibición significativa de p-ERBB3, p-AKT y p-ERK 1/2. **C.** La combinación de gefitinib y PHA-665752 anula la asociación de p85 con ErbB-3 en células HCC827 RG6, RG7 y RG8. Las células HCC827 y HCC827 RG se expusieron a gefitinib 1 μ M o PHA-665752 1 μ M solos o en combinación durante 6 horas antes de la lisis. Los lisados se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-p85 y los inmunoprecipitados se sondaron con anticuerpos anti-fosfo-tirosina, anti-ErbB-3, anti-Gab1 y anti-p85. En la línea celular HCC827 parental, la asociación de ERBB3 con p85 se anula por gefitinib, pero esta interacción se mantiene en las células HCC827 RG incluso en presencia de gefitinib. Aunque la asociación de Gab1 con p85 se rompe en células HCC827 RG con PHA-665752 solo, solo la combinación de gefitinib y PHA-665752 disocia ERBB3 de p85 en estas líneas celulares. **D.** Se infectaron construcciones lentivirales que contienen un ARNhp de control o ARNhp dirigido contra dos regiones diferentes de *MET* (procedimientos) en células HCC827 RG6 y se examinó el crecimiento en presencia de gefitinib por un ensayo con MTS. Células HCC827 RG6 que contienen ARNhp para *MET* recuperan su sensibilidad a gefitinib mientras que aquellas infectadas con un ARNhp de control siguen siendo resistentes. **E.** Gefitinib regula por disminución la señalización de ERBB3/PI3K/AKT en células HCC827 RG6 infectadas con un ARNhp de *MET*. Células HCC827 RG6 infectadas con un ARNhp de control o ARNhp dirigidos a *MET* se trataron con gefitinib 1 μ M durante 6 horas. Las células se lisaron y se sondaron con los anticuerpos indicados. En HCC827 RG6 infectadas con un ARNhp de control, el tratamiento con gefitinib no afecta p-ERBB3 o p-AKT. A diferencia, la regulación por disminución de *MET* restaura ahora la capacidad de gefitinib para regular por disminución p-ERBB3 y p-AKT en células HCC827 RG6.

Figura 3. MET activa ERBB3 en otras líneas celulares amplificadas por *MET*. **A.** Líneas celulares amplificadas por *MET* usan ERBB3 para activar la señalización de PI3K/AKT. Se trataron células de cáncer gástrico amplificadas por *MET* (SNU-638 y MKN-45) y de CPCNP (H1993), células de CPCNP mutantes en *EGFR* (HCC827) y de cáncer de mama amplificadas por ERBB2 (BT474) con tanto gefitinib (1 μ M), PHA-665.752 (1 μ M), lapatinib (1 μ M) como CL-387.785 (1 μ M) durante 6 horas antes de la lisis. Los lisados se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-p85 y los inmunoprecipitados se sondaron con anticuerpos anti-fosfo-tirosina, anti-ErbB-3 y anti-p85 (* indica ERBB3 en la transferencia PTyr). En paralelo, los lisados se analizaron por transferencia Western y se sondaron con los anticuerpos indicados. Como puede apreciarse en las células amplificadas por *MET*, solo PHA-665.752 conduce a la rotura de la asociación de ERBB3 con p85, y la regulación por disminución de la fosforilación de ERBB3 y de Akt. Como controles, las células HCC827 mutantes en *EGFR* y las células BT474 amplificadas por ERBB2 demuestran disminución de la asociación entre p85 y ERBB3 y la regulación por disminución de p-ERBB3 y p-AKT en presencia de inhibidores de EGFR y ERBB2, respectivamente. PHA-665.752 no tiene efecto sobre la señalización de PI3K en ninguna de estas líneas celulares. **B.** La inactivación de ERBB3 conduce a la regulación por disminución de p-AKT en células SNU-638. Construcciones de ARNhp lentiviral que contienen una secuencia desordenada (SC), secuencia específica de ERBB3, una secuencia de control (CTRL) o GFP se infectaron en células SNU638 (Procedimientos). Setenta y dos horas tras la infección, las células se lisaron y se sondaron con los anticuerpos indicados. El ARNhp específico de ERBB3 conduce a la regulación por disminución de p-Akt. **C.** El ARNhp de ERBB3 inhibe el crecimiento de células SNU-638. El crecimiento de células SNU-638 se ensayó por un ensayo de MTS 5 días tras la infección de las construcciones de ARNhp en B. El crecimiento se normaliza al ARNhp de SC. La infección de ARNhp de ERBB3 conduce a una inhibición significativa del crecimiento de células SNU-638. **D.** MET activa ERBB3 en células CHO. Se transfectaron células CHO con tanto GFP, ADNc de ERBB3 solos como en combinación con un ADNc de MET. Las células se trataron con tanto PHA-665.752 (1 μ M), gefitinib (3 μ M), lapatinib (3 μ M) como PP2 (10 μ M) durante 6 horas, las células tratadas se lisaron y se sondaron con p-ERBB3 y ERBB3. Como puede apreciarse, ERBB3 se fosforila solo en presencia de MET que se inhibe por PHA-665.752, pero no gefitinib, lapatinib o PP2. **E.** ERBB3 co-precipita con p85 en presencia de MET y se inhibe por PHA-665.752. La inmunoprecipitación se realizó usando ERBB3 de células CHO transfectadas con tanto GFP, ERBB3 o MET y ERBB3 en presencia o ausencia de PHA-665.752 (1 μ M), gefitinib (3 μ M) o lapatinib (3 μ M). Las proteínas resultantes se lisaron y se sondaron con los anticuerpos indicados. Como puede apreciarse, p85 co-precipita con ERBB3 solo en presencia de MET que se inhibe por PHA-665.752, pero no por gefitinib o lapatinib. **F.** MET y ERBB3 co-precipitan de células CHO. La inmunoprecipitación usando MET se realizó usando células CHO transfectadas con tanto GFP, MET solo, ERBB3 solo o MET y ERBB3 con o sin tratamiento con PHA-665.752 (1 μ M). Los lisados resultantes se sondaron con tanto ERBB3 como MET. Como puede apreciarse, MET solo inmunoprecipita ERBB3 de células CHO transfectadas con ambas construcciones.

Figura 4. Análisis de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) de xenoinjertos y pacientes con CPCNP. Se realizó FISH de color doble (CEP7 (verde), 1D7S522 (rojo)) sobre cortes en parafina de HCC827 y los xenoinjertos de

HCC875 RG5 y sobre especímenes de tumor tratados antes y después de gefitinib del paciente 8 (Figura 5). En HCC827 RG5 y los especímenes de tumor tratados después de gefitinib hay evidencia de amplificación por *MET*. El aumento es 1000X en estas imágenes.

Figura 5. Resumen de cambios genéticos en pacientes con CPCNP con resistencia adquirida a gefitinib o erlotinib. Dieciocho pacientes con CPCNP con mutaciones en *EGFR* con tanto especímenes emparejados antes y después del tratamiento (n=8) como especímenes después del tratamiento solos (n=10) se analizaron para mutaciones en *EGFR*, presencia de T790M en *EGFR* y amplificación de *MET* por tanto PCR cuantitativa como FISH. La columna de resultados indica el número de copias de *MET* (desviación estándar) en pacientes analizados por QPCR y el porcentaje de células con > 3 copias adicionales del sitio *MET* en comparación con CEP 7 en aquellos analizados por FISH. Especímenes tumorales con amplificación de *MET* están marcados por un asterisco. Cuatro de los 18 pacientes (22 %) tienen evidencia de amplificación de *MET* en sus especímenes de tumor después del tratamiento, y en 1/4 esto se produce en un espécimen con una mutación T790M en *EGFR* simultánea.

Figura 6. Muestra una representación del número de copias de *MET* determinado por PCR cuantitativa para células resistentes a HCC827 y la línea celular parental. Los resultados muestran que *MET* se amplificó 5-10 veces en todas las líneas celulares resistentes a HCC827 en comparación con la línea celular HCC827parental.

Figura 7. Células parentales y resistentes se tratan con gefitinib solo, PHA-665.752 solo o ambos fármacos en combinación. Se inmunotransfieren extractos celulares y las proteínas se detectan con los anticuerpos indicados. Células HCC827 RG experimentan apoptosis solo tras el tratamiento con tanto gefitinib como el inhibidor de cinasas de MET PHA-665.752. A diferencia, gefitinib solo es suficiente para inducir la apoptosis como se mide por la aparición de PARP escindida (89 kDa).

Figura 8. Se muestran los 20 genes principales que se expresan diferencialmente por exceso en los clones de HCC827 RG en comparación con la línea celular HCC827 parental. También se muestran las localizaciones cromosómicas de los genes y el cambio en veces medio (de los 6 clones de HCC827 RG) en el nivel de expresión.

Figura 9. Rotura de especímenes de pacientes analizados por FISH. En cada muestra se contaron 100 células y se muestra el porcentaje de células que contienen más de 2 o 3 copias adicionales de *MET* en comparación con CEP 7.

Figura 10. Curva de supervivencia de células tratadas con HGF y gefitinib. Panel izquierdo superior, gráfica del porcentaje de células viables frente al tiempo. El panel derecho superior representa una transferencia Western que detecta Akt y Akt fosforilada en células tratadas con factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), gefitinib (TKI), o tanto HGF como gefitinib. El panel inferior muestra células viables en placas tratadas con HGF y gefitinib.

30 Descripción detallada

1. Definiciones

Como se usa en el presente documento, los siguientes términos y frases deben tener los significados expuestos a continuación. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la técnica.

35 El término “tal como” se usa en el presente documento para significar, y se usa indistintamente con, la frase “tal como, pero no se limita a”.

Las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencia plural, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo.

40 El término “cáncer”, como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásico, tanto maligno como benigno, a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos, y a todas las metástasis. Hay dos tipos generales de cánceres: benigno y maligno. Casi todos los cánceres benignos están encapsulados y son no invasivos; a diferencia, los cánceres malignos casi nunca están encapsulados e invaden tejido adyacente por crecimiento destructivo infiltrante. Este crecimiento infiltrante puede ir seguido de células cancerosas que se implantan en sitios que son discontinuos con el cáncer original. Los cánceres que migran de su localización original y siembran órganos vitales (dando así lugar a lesiones metastásicas) pueden con el tiempo conducir a la muerte del sujeto mediante el deterioro funcional de los órganos afectados. Una metástasis es una región de células cancerosas distinta de la localización del cáncer primario resultante de la diseminación de células cancerosas del cáncer primario a otras partes del cuerpo.

50 Los términos “comprenden” y “que comprende” se usan en el sentido abierto inclusivo, que significa que pueden incluirse elementos adicionales.

El término “que incluye” se usa para significar “que incluye, pero no se limita a”. “Que incluye” y “que incluye, pero no se

limita a" se usan indistintamente.

Un "paciente" o "sujeto" se refiere a un mamífero como se conoce en la técnica. Mamíferos a modo de ejemplo incluyen seres humanos, primates, animales de ganado (incluyendo bovinos, porcinos, etc.), animales de compañía (por ejemplo, caninos, felinos, etc.) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas).

- 5 Como se usa en el presente documento, y como es bien entendido en la materia, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, que incluyen resultados clínicos. Resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, disminución del grado de enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, que no empeora), prevención de la propagación de la enfermedad, retraso o ralentizamiento de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y
10 remisión (tanto parcial como total), tanto detectable como indetectable. El "tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

2. Procedimientos de tratamiento de cáncer resistente a TKI de EGFR

En el presente documento se proporcionan medios para tratar cáncer, prolongar la esperanza de vida de un sujeto afectado con el cáncer, o reducir uno o más síntomas asociados a un cáncer, usando una combinación de un agente terapéutico anti-ErbB y un agente terapéutico anti-MET. Cualquier agente terapéutico anti-ErbB puede usarse según los
15 medios descritos en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, un agente terapéutico anti-ErbB1 (ErbB1/EGFR/HER1), un agente terapéutico anti-ErbB2 (ErbB2/Neu/Her2), un agente terapéutico anti-ErbB3 (ErbB3/Her3) o un agente terapéutico anti-ErbB4 (ErbB4/Her4). En ciertas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar sujetos que padecen cánceres asociados a elevados niveles de actividad y/o de expresión de ErbB (tales como, por ejemplo, una mutación activante de ErbB, una amplificación del gen ErbB o activación de ErbB mediada por ligando) y una amplificación del gen MET. La activación de MET mediada por HGF puede asociarse a elevados niveles de actividad y/o niveles de expresión de HGF (tales como, por ejemplo, una mutación activante de HGF o una amplificación del gen HGF).
20

En realizaciones a modo de ejemplo, los medios descritos en el presente documento pueden usarse para tratar uno o más de los siguientes tipos de cáncer: cánceres de ovario, pancreático, pulmón, cerebro, mama, cabeza y cuello, colon, gástrico, pancreático, rectal, riñón, hígado, vejiga, próstata, gástrico, tiroides, pituitaria, suprarrenal o de glioblastoma. En una realización a modo de ejemplo, los procedimientos pueden usarse para tratar cáncer de pulmón, tal como, por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP).
25

Ejemplos de mutaciones activantes de ErbB que pueden asociarse a cáncer incluyen, por ejemplo, mutaciones puntuales, mutaciones por delección, mutaciones por inserción, inversiones o amplificaciones génicas que conducen a un aumento en al menos una actividad biológica de una proteína ErbB. Actividades biológicas a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, actividad de tirosina cinasas (para ErbB1, ErbB2 o ErbB4), formación de interacciones proteína-proteína (tales como, por ejemplo, homo- o hetero-dimerización de receptores, unión al ligando, unión a un sustrato, etc.), o señalización mediada por ErbB. Las mutaciones pueden localizarse en cualquier porción de un gen ErbB o región reguladora asociada a un gen ErbB. Mutaciones de ErbB1 (EGFR) a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, mutaciones en el exón 18, 19, 20 o 21, mutaciones en el dominio de cinasa, G719A, L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, S768I, L858P, E746-R748 del, R748-P753 del, M766-A767 A1 ins, S768-V769 SVA ins, P772-H773 NS ins, 2402 g>C, 2482 g>A, 2486T>C, 2491 G>C, 2494 g>C, 2510C>T, 2539 g>A, 2549 g>T, 2563C>T, 2819T>C, 2482-2490 del, 2486-2503 del, 2544-2545 ins GCCATA, 2554-2555 ins CCAGCGTGG o 2562-2563 ins AACTCC. Otros ejemplos de mutaciones activantes de ErbB1 se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. n.º 2005/0272083). Mutaciones de ErbB2 a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, mutaciones en el dominio de cinasa, o inserciones del exón 20 tales como, por ejemplo, G776insV_G/C y A775insYVMA. Mutaciones de ErbB3 y ErbB4 a modo de ejemplo pueden incluir, por ejemplo, mutaciones en el dominio de cinasa. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para una variedad de secuencias de ErbB, que incluyen ErbB1 humana, ErbB2 humana, ErbB3 humana y ErbB4 humana, están públicamente disponibles y pueden encontrarse, por ejemplo, en la base de datos ncbi.nlm.nih.gov. Por ejemplo, secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para ErbB1 humana (EGFR) pueden encontrarse en n.º de acceso de GenBank NM_005228 y NP_005219, respectivamente; secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para ErbB2 humana puede encontrarse en n.º de acceso de GenBank NM_004448 y NP_004439, respectivamente; secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para ErbB3 humana puede encontrarse en n.º de acceso de GenBank NM_001982 y NP_001973, respectivamente; y secuencias de nucleótidos y aminoácidos de ErbB4 humana pueden encontrarse en n.º de acceso de GenBank NM_005235 y NP_005226, respectivamente. En la técnica se conoce información sobre receptores de ErbB que incluyen homo- y hetero-dímeros de receptores, ligandos de receptores, sitios de autofosforilación y moléculas de señalización que participan en la señalización mediada por ErbB (véase, por ejemplo, Hynes y Lane, Nature Reviews Cancer 5: 341-354 (2005)).
30
35
40
45
50

55 En otras realizaciones, las mutaciones activantes de ErbB pueden ser mutaciones fuera de la propia secuencia de ErbB que conducen a un aumento en al menos una actividad biológica de una proteína ErbB. Por ejemplo, una mutación que

conduce a expresión en exceso de un ligando de ErbB puede conducir a un aumento en la actividad de ErbB y, por tanto, se consideraría una mutación activante de ErbB. Similarmente, una mutación que conduce a expresión en exceso de un factor de transcripción que participa en la expresión de ErbB podría conducir a una expresión en exceso de una proteína ErbB y un aumento en la actividad de ErbB y, por tanto, también se consideraría una mutación activante de ErbB. Tales ejemplos son simplemente ilustrativos y un experto en la técnica puede contemplar una variedad de otras mutaciones activantes de ErbB basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento.

Los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar cánceres que tienen resistencia adquirida al tratamiento con una o más terapias anti-ErbB, que incluyen una terapia anti-ErbB1, una terapia anti-ErbB2, una terapia anti-ErbB3 y/o una terapia anti-ErbB4. Se conocen diversos agentes terapéuticos anti-ErbB en la técnica e incluyen, por ejemplo, agentes terapéuticos de molécula pequeña, agentes terapéuticos de proteína o agentes terapéuticos de ácido nucleico. Otros ejemplos de agentes terapéuticos anti-ErbB se proporcionan en el presente documento más adelante. En ciertas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar cáncer que es resistente al tratamiento con un inhibidor de cinasas de ErbB. En ciertas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar cáncer que es resistente al tratamiento con un inhibidor de cinasas de ErbB1 (EGFR). Según la invención, los medios descritos en el presente documento pueden usarse para tratar cáncer que es resistente al tratamiento con gefitinib, erlotinib o ambos.

Pueden usarse diversos procedimientos cualitativos y/o cuantitativos para determinar si un sujeto ha desarrollado o es susceptible a desarrollar una resistencia al tratamiento con un agente terapéutico anti-ErbB. Por ejemplo, un sujeto que mostró mejora inicial mientras tomaba un agente terapéutico anti-ErbB puede mostrar signos de que el agente terapéutico anti-ErbB se ha vuelto menos eficaz o ya no es eficaz. Indicadores a modo de ejemplo de un agente terapéutico anti-ErbB eficaz que pueden debilitarse o reducirse en asociación con resistencia incluyen, por ejemplo, mejora del bienestar del paciente, disminución o encogimiento del tamaño de un tumor, detención o ralentizamiento del crecimiento de un tumor y/o ausencia de metástasis de células cancerosas a otras localizaciones en el cuerpo. Los síntomas que pueden asociarse a resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB incluyen, por ejemplo, una disminución o meseta del bienestar del paciente, un aumento en el tamaño de un tumor, detención o ralentizamiento de la disminución en el crecimiento de un tumor y/o la propagación de células cancerosas en el cuerpo de una localización a otros órganos, tejidos o células.

También pueden usarse diversos síntomas asociados al cáncer para identificar sujetos que han desarrollado o son susceptibles a desarrollar una resistencia a una terapia anti-ErbB. En particular, tales síntomas pueden desarrollarse, empeorar o restablecerse en un sujeto que está tratándose con una terapia anti-ErbB. Síntomas a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, anorexia, disfunción cognitiva, depresión, disnea, fatiga, alteraciones hormonales, neutropenia, dolor, neuropatía periférica y disfunción sexual. Los síntomas asociados al cáncer pueden variar según el tipo de cáncer. Por ejemplo, síntomas asociados al cáncer de cuello uterino incluyen, por ejemplo, sangrado anormal, flujo vaginal abundante inusual, dolor pélvico que no está relacionado con el ciclo menstrual normal, dolor de vejiga o dolor durante la micción, y sangrado entre periodos menstruales regulares, después del coito, lavado vaginal o examen pélvico. Síntomas asociados al cáncer de pulmón pueden incluir, por ejemplo, tos persistente, expectoración con sangre, falta de aliento, dolor de pecho con sibilancias, pérdida del apetito, pérdida de peso involuntaria y fatiga. Síntomas del cáncer de hígado pueden incluir, por ejemplo, pérdida del apetito y peso, dolor abdominal, especialmente en la parte derecha superior del abdomen, que puede extenderse a la espalda y el hombro, náuseas y vómitos, debilidad general y fatiga, un hígado agrandado, hinchazón abdominal (ascitis), y una decoloración amarilla de la piel y el blando de los ojos (ictericia). Un experto en oncología puede identificar fácilmente síntomas asociados a un tipo de cáncer particular.

Otros medios para determinar si un sujeto ha desarrollado una resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB incluyen, por ejemplo, examinar uno o más de los siguientes: fosforilación de ErbB1, ErbB2, ErbB3 o ErbB4, señalización mediada por fosfatidil inositol 3'-cinasa (PI3K), señalización mediada por ErbB1, ErbB2, ErbB3 o ErbB4, sensibilidad de células cancerosas a un agente terapéutico anti-ErbB, crecimiento o proliferación de células cancerosas, o apoptosis de células cancerosas, etc. Por ejemplo, un aumento en la fosforilación de ErbB, señalización mediada por PI3K y/o señalización mediada por ErbB, en comparación con un control, puede ser indicativo de que el sujeto ha desarrollado o es susceptible a desarrollar una resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB. Procedimientos de determinación de la fosforilación de ErbB, señalización mediada por PI3K y señalización mediada por ErbB pueden determinarse usando técnicas conocidas y se describen adicionalmente en el presente documento.

Adicionalmente, una disminución en la sensibilidad de células cancerosas a un agente terapéutico anti-ErbB, un aumento en el crecimiento o proliferación de células cancerosas y/o una disminución en la apoptosis de células cancerosas en comparación con un control también pueden ser indicativos de que el sujeto ha desarrollado o es susceptible a desarrollar una resistencia a agente terapéutico anti-ErbB. Es posible determinar la sensibilidad, crecimiento, proliferación o apoptosis de células cancerosas usando procedimientos convencionales como se describen adicionalmente en el presente documento. Por ejemplo, la sensibilidad, crecimiento, proliferación o apoptosis de células cancerosas pueden determinarse tanto *in situ* como *in vitro*. Las mediciones *in situ* pueden implicar, por ejemplo, observar el efecto de una terapia anti-ErbB en un sujeto examinando el crecimiento o metástasis del cáncer. Alternativamente, una muestra de células cancerosas del sujeto puede extraerse y probarse *in vitro*, por ejemplo, para determinar la sensibilidad,

crecimiento, proliferación o apoptosis de las células del sujeto. El análisis *in vitro* puede implicar análisis de células que se trataron *in situ* con el agente terapéutico anti-ErbB y a continuación se extrajeron del sujeto para análisis *in vitro* o puede implicar poner en contacto las células cancerosas *in vitro* con la terapia anti-ErbB. Procedimientos adecuados para examinar el crecimiento, proliferación y apoptosis de células cancerosas se describen adicionalmente más adelante.

5 En diversas realizaciones, puede desearse comparar una o más mediciones de resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB con un control. Controles a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, bienestar, tamaño del tumor, crecimiento tumoral, o presencia o tasa de metástasis en el mismo sujeto antes del tratamiento, el mismo sujeto en un momento de tiempo anterior durante tratamiento, o un sujeto diferente que recibe la misma terapia anti-ErbB que puede o puede no ser resistente a la terapia. Otros tipos de controles adecuados incluyen, por ejemplo, sensibilidad a un agente terapéutico anti-ErbB, crecimiento, proliferación o apoptosis de células del mismo sujeto en un momento anterior durante el tratamiento con un agente terapéutico anti-ErbB, del mismo sujeto antes del tratamiento con agente terapéutico anti-ErbB, un sujeto de control que es sensible al tratamiento con un agente terapéutico anti-ErbB, una línea celular con sensibilidad a anti-ErbB conocida, un sujeto de control que es resistente al tratamiento con un agente terapéutico anti-ErbB, o un valor de referencia para una medición dada. Tales controles pueden ser mediciones *in situ* o mediciones *in vitro* similares a aquellas descritas anteriormente para un sujeto dado. En diversas realizaciones, los controles pueden implicar la utilización de células del mismo tejido del mismo sujeto antes del tratamiento, células del mismo tejido del mismo sujeto previamente durante el tratamiento, células no tumorigénicas del mismo sujeto, células no tumorigénicas de otros sujetos, células no tumorigénicas de una población o sujetos, o una línea celular establecida. Los controles también pueden ser un valor de referencia o tabla en copia en papel o en una base de datos que puede derivarse de uno o más individuos opcionalmente en asociación con información relevante tal como, por ejemplo, sexo, estado del cáncer, presencia de cualquier metástasis, cualquier tipo de tratamiento administrado, presencia o ausencia de una mutación activante o amplificación génica en un gen ErbB, presencia o ausencia de una mutación activante o amplificación génica en el gen MET, niveles de la fosforilación de ErbB, niveles de señalización de PI3K, etc.

La identificación de un sujeto que ha desarrollado una resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB puede implicar detección de elevados niveles de expresión de MET o elevada actividad de MET, por ejemplo, que se produce a partir de una mutación activante del gen MET o una amplificación del gen MET. Las mutaciones activantes del gen MET puede ser cualquier tipo de mutación que incluye, por ejemplo, mutaciones puntuales, mutaciones por delección, mutaciones por inserción, inversiones o amplificaciones génicas que conducen a un aumento en al menos una actividad biológica de una proteína MET. Actividades biológicas a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, actividad de tirosina cinasas, formación de interacciones proteína-proteína (tales como, por ejemplo, homo- o hetero-dimerización de receptores, unión a ligandos, unión a un sustrato, etc.) y señalización mediada por MET. Las mutaciones pueden localizarse en cualquier porción del gen MET o regiones reguladoras asociadas al gen. Mutaciones a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, mutaciones en el dominio de cinasa de MET o mutaciones que producen un cambio de aminoácido en una cualquiera o más de las siguientes posiciones: N375, I638, V13, V923, I316 y E168, con respecto a MET no mutado. Los procedimientos de detección de mutaciones en MET o amplificaciones génicas implican técnicas reconocidas en la técnica que se describen adicionalmente en el presente documento. Las mutaciones activantes de MET pueden ser mutaciones fuera de la propia secuencia de MET que conducen a un aumento en al menos una actividad biológica de una proteína MET. Por ejemplo, una mutación que conduce a expresión en exceso de un ligando de MET puede conducir a un aumento en la actividad de MET y, por tanto, se consideraría una mutación activante de MET. Similarmente, una mutación que conduce a expresión en exceso de un factor de transcripción que participa en la expresión de MET podría conducir a una expresión en exceso de MET y un aumento en la actividad de MET y, por tanto, también se consideraría una mutación activante de MET. Tales ejemplos son simplemente ilustrativos de una variedad de otras mutaciones activantes de MET que pueden ser contempladas por un experto en la técnica basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento.

Niveles elevados de actividad de MET pueden asociarse a activación de MET mediada por HGF. La activación de MET mediada por HGF puede asociarse a, por ejemplo, una mutación activante de HGF o una amplificación del gen HGF. Los procedimientos de detección de la activación de MET mediada por HGF, mutaciones activantes de HGF o amplificaciones del gen HGF implican técnicas reconocidas en la técnica que se describen adicionalmente en el presente documento.

Las combinaciones de los procedimientos anteriores pueden usarse para identificar sujetos que han desarrollado o son susceptibles a desarrollar una resistencia a una terapia anti-ErbB. Por ejemplo, durante el transcurso del tratamiento con agente terapéutico anti-ErbB, el bienestar del sujeto, tamaño del tumor y/o metástasis del cáncer puede monitorizarse por el médico. Si el sujeto empieza a presentar síntomas que indican que la terapia anti-ErbB está disminuyendo en eficacia, puede usarse un cribado secundario para identificar aquellos sujetos que se están volviendo resistentes a la terapia anti-ErbB. Por ejemplo, los sujetos pueden cribarse para examinar la fosforilación de ErbB, señalización mediada por PI3K, señalización mediada por ErbB, sensibilidad de células cancerosas a un agente terapéutico anti-ErbB, crecimiento o proliferación de células cancerosas, apoptosis de células cancerosas y/o presencia de niveles elevados de actividad o expresión de MET, tales como, por ejemplo, una mutación activante en el gen MET, una amplificación del gen MET, o activación de MET mediada por HGF. Un sujeto que recibe una terapia anti-ErbB se monitoriza durante el transcurso del tratamiento para signos de resistencia basándose en el bienestar del sujeto, tamaño del tumor y/o metástasis del cáncer. Entonces, aquellos sujetos que se sospecha que están en riesgo de resistencia a la terapia anti-ErbB se prueban para

identificar si el sujeto tiene una mutación activante en el gen MET, una amplificación del gen MET o activación de MET mediada por HGF. Un sujeto puede monitorizarse durante el transcurso del tratamiento con la terapia anti-ErbB para la presencia de una mutación activante del gen MET, una amplificación del gen MET o activación de MET mediada por HGF independientemente del bienestar del sujeto, tamaño del tumor y/o metástasis del cáncer. Un sujeto que recibe tratamiento con una terapia anti-ErbB puede monitorizarse durante el tratamiento para determinar la sensibilidad de células cancerosas a un agente terapéutico anti-ErbB, crecimiento o proliferación de células cancerosas, y/o la apoptosis de células cancerosas. Aquellos sujetos que se sospecha que están en riesgo de resistencia al agente terapéutico anti-ErbB pueden probarse a continuación para la presencia de una mutación activante en el gen MET, una amplificación del gen MET o activación de MET mediada por HGF. Las combinaciones anteriormente descritas son simplemente ilustrativas y también se contemplan todas las otras posibles combinaciones en el presente documento, y serían evidentes para un experto en la técnica basándose en la presente divulgación.

Los sujetos que se monitorizan para resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB pueden evaluarse en uno o más momentos de tiempo durante el transcurso del tratamiento con el agente terapéutico anti-ErbB. Los sujetos pueden monitorizarse a intervalos regulares durante el transcurso del tratamiento. Por ejemplo, los sujetos pueden monitorizarse al menos una vez al día, una vez cada dos días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, durante cada visita al médico, conjuntamente con la administración de cada dosificación de agente terapéutico anti-ErbB, etc. La monitorización puede implicar la auto-evaluación por el sujeto, evaluación por un médico, evaluación basada en los resultados de pruebas de laboratorio y diversas combinaciones de los mismos.

Una vez se ha identificado un sujeto que ha desarrollado resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB, o es susceptible a desarrollar tal resistencia, y que tiene una mutación activante en el gen MET, una amplificación del gen MET o activación de MET mediada por HGF, entonces se administra una combinación de una terapia anti-ErbB y una terapia anti-MET al paciente. Agentes terapéuticos anti-ErbB y anti-MET a modo de ejemplo se describen adicionalmente en el presente documento. El agente terapéutico anti-ErbB y el agente terapéutico anti-MET se seleccionan cada uno individualmente de uno o más de los siguientes: un agente terapéutico de molécula pequeña, un agente terapéutico de ácido nucleico o un agente terapéutico de proteína. Según la invención, el agente terapéutico anti-ErbB es un agente terapéutico anti-EGFR seleccionado de gefitinib, erlotinib, lapatinib, PF00299804, CI-1033, EKB-569, BIBW2992, ZD6474, AV-412 o HKI-272, o combinaciones de los mismos, y el agente terapéutico anti-MET es PHA-665.752, SU11274, SU5416, PF-02341066, XL-880 o MGCD265, o combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico anti-ErbB que se administra como parte de una combinación con un agente terapéutico anti-MET es el mismo agente terapéutico anti-ErbB al que el sujeto ha desarrollado una resistencia. Por ejemplo, si un sujeto estaba siendo tratado con erlotinib (un agente terapéutico anti-ErbB1) y entonces desarrolla una resistencia a este agente terapéutico, el sujeto puede entonces tratarse en el futuro con una combinación de erlotinib y, por ejemplo, PHA-665752 (un agente terapéutico anti-MET). Alternativamente, el agente terapéutico anti-ErbB puede ser diferente del agente terapéutico al que el sujeto ha desarrollado una resistencia. Por ejemplo, si un sujeto estaba siendo tratado con erlotinib y entonces desarrolla una resistencia a este agente terapéutico, el sujeto puede entonces tratarse en el futuro con gefitinib (otro agente terapéutico anti-ErbB1) y, por ejemplo, PHA-665752. Estas combinaciones son simplemente ilustrativas y se contemplan muchas otras combinaciones en el presente documento y serían evidentes para un experto en la técnica basándose en la presente divulgación.

En ciertas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento implican la administración de una combinación de un agente terapéutico anti-ErbB y un agente terapéutico anti-MET. Terapias de combinación que comprenden un agente terapéutico anti-ErbB y un agente terapéutico anti-MET pueden referirse a (1) composiciones farmacéuticas que comprenden una co-formulación de al menos un agente terapéutico anti-ErbB y al menos un agente terapéutico anti-MET; y (2) co-administración de uno o más agentes terapéuticos anti-ErbB con uno o más agentes terapéuticos anti-MET en los que los agentes terapéuticos anti-ErbB y agentes terapéuticos anti-MET no se han formulado en las mismas composiciones (pero pueden estar presentes dentro del mismo kit o paquete, tal como un envase alveolado u otro envase de múltiples cámaras; recipientes sellados por separado conectados (por ejemplo, bolsas de papel de aluminio) que pueden separarse por el usuario; o un kit en el que los agentes terapéuticos están en recipientes separados). Si se usan formulaciones separadas, los agentes terapéuticos pueden administrarse al mismo tiempo (simultáneamente), intermitentemente o escalonadamente, y en diversas realizaciones el agente terapéutico anti-ErbB puede administrarse antes del agente terapéutico anti-MET o posterior al agente terapéutico anti-MET, o diversas combinaciones de los anteriores.

En diversas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento implican el análisis de muestras biológicas de sujetos, por ejemplo, para identificar las mutaciones activantes o la amplificación génica de un gen ErbB, el gen MET y/o el gen HGF. Según los procedimientos puede usarse cualquier muestra biológica adecuada de un sujeto que incluye, por ejemplo, una muestra corporal líquida, muestra de células, o una muestra de tejido, tomadas de un sujeto. Líquidos corporales adecuados incluyen, pero no se limitan a, muestras de líquido pleural, muestras de líquido de lavado pulmonar o bronquial, muestras de líquido sinovial, muestras de líquido peritoneal, muestras de aspirado de médula ósea, linfa, líquido cefalorraquídeo, muestras de líquido ascítico, muestras de líquido amniótico, muestras de esputo, lavados de

la vejiga, semen, orina, saliva, lagrimas, sangre, y sus componentes suero y plasma, y similares. En una realización a modo de ejemplo, la muestra biológica es una muestra que comprende células cancerosas de una o más localizaciones en el sujeto. Por ejemplo, pueden usarse muestras biológicas obtenidas de una biopsia o resección de tumor. En ciertas realizaciones, puede desearse probar muestras tumorales de más de una localización dentro de un sujeto. Si un sujeto

5 tiene tumores en más de una localización, puede desearse probar las mutaciones activantes o la amplificación génica de un gen ErbB, el gen MET y/o el gen HGF en cada una de las localizaciones del tumor para determinar si los tumores están asociados con las mismas modificaciones genéticas o diferentes.

En ciertas realizaciones, la terapia de combinación de anti-ErbB/anti-MET puede usarse conjuntamente con otros tratamientos o agentes terapéuticos, tales como, por ejemplo, otras inmunoterapias, tales como antígenos, adyuvantes, inmunomoduladores, o inmunoterapia pasiva con anticuerpos. La terapia de combinación de anti-ErbB/anti-MET también puede administrarse conjuntamente con tratamientos sin fármaco, tales como cirugía, radioterapia o quimioterapia. La otra terapia puede administrarse antes, simultánea a o después del tratamiento con la terapia de combinación de anti-ErbB/anti-MET. También puede haber un retraso de varias horas, días y en algunos casos semanas entre la administración de los diferentes tratamientos, de forma que la terapia de combinación de anti-ErbB/anti-MET pueda administrarse antes o después del otro tratamiento.

10

15

En una realización, la terapia de combinación de anti-ErbB/anti-MET se administra conjuntamente con (es decir, antes, durante o después) otra terapia contra el cáncer, y en particular otra terapia contra el cáncer que no comprende la administración de un agente terapéutico anti-ErbB y/o un agente terapéutico anti-MET al sujeto. Por ejemplo, la terapia de combinación de anti-ErbB/anti-MET puede administrarse junto con uno cualquiera o más de los fármacos quimioterapéuticos conocidos para aquellos expertos en la técnica de la oncología, (Referencia: Cancer, Principles & Practice of Oncology, DeVita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A., 6ª edición, Lippincott-Raven, Filadelfia, 2001), tales como, por ejemplo: abarelix, adriamicina, aldesleucina, altretamina, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, antida, arimidax, asimicina, asparaginasa, AZD2171 (Recentin™), bacilo Calmette-Guerin/BCG (TheraCys™, TICE™), bevacizumab (Avastin™), bicalutamida, bleomicina, bortezomib (Velcade™), bullatacina, busrelina, busulfano, camptotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, clorodesoxiadenosina, cisplatino, cladribina, clodronato, colchicina, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, dasatinib (Sprycel™), daunorubicina, dienestrol, dietilestilbestrol, discodermolida, dexametasona, docetaxel (Taxotere™), doxorubicina, Abx-EGF, epotilonas, epirubicina, estradiol, estramustina, etopósido, exemestano, floxuridina, 5-fluorouracilo, filgrastim, flavopiridol, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracilo, fluoximesterona, flutamida, fulvestrant, gemcitabina (Gemzar™), genisteína, goserelina, guanacona, hidroxurea, idarubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib (Gleevac™), interferón, interleucinas, irinotecan, ibritumomab (Zevalin™), irinotecan, ixabepilona (BMS-247550), letrozol, leucovorina, leuprolida, levamisol, lomustina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalan, mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, mitozolomida, nilutamida, nocodazol, octreotida, oxaliplatino, paclitaxel (Taxol™), pamidronato, pegaspargasa, pentostatina, plicamicina, porfímero, prednisona, procarbazona, raltitrexed (Tomudex™), rapamicina, ramptotecina, rituximab (Rituxan™), roliniastatina, sorafenib (Nexavar™/Bayer BAY43-9006), escuamocina, escuamotacina, estreptozocina, suramin, maleato de sunitinib (Sutent™), tamoxifeno, temsirolimus (CC1-779), temozolomida (Temodar™), tenipósido, testosterona, tioguanina, tiotepa, dicloruro de titanoceno, topotecan, toremifeno, tositumomab (Bexxar™), trastuzumab, tretinoína, VEGF Trap, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, zoledronato.

20

25

30

35

La terapia de combinación de anti-ErbB/anti-MET también puede usarse con tratamiento sin fármaco para el cáncer, tal como con procedimientos quirúrgicos para eliminar la masa de cáncer, quimioterapia o radioterapia. La terapia sin fármaco puede administrarse antes, simultáneamente o después del tratamiento con la terapia de combinación de anti-ErbB/anti-MET. También puede haber un retardo de varias horas, días y en algunos casos semanas entre la administración de los diferentes tratamientos, de forma que los agentes puedan administrarse antes o después del otro tratamiento.

40

45

La terapia de combinación de anti-ErbB/anti-MET también puede administrarse durante un procedimiento quirúrgico, tal como, por ejemplo, durante la eliminación de un tumor o una biopsia de tumor. Los procedimientos quirúrgicos para tratar cáncer incluyen cirugías intrabdominales tales como hemicolectomía derecha o izquierda, colectomía y gastrectomía sigmoide, subtotal o total, mastectomía, prostatectomía e histerectomía radical o parcial. En una realización, la terapia de combinación de anti-ErbB/anti-MET puede administrarse localmente a un área de masa cancerosa después de o durante la eliminación quirúrgica de un tumor.

50

Además, la terapia de combinación de anti-ErbB/anti-MET puede administrarse junto con cualquier forma de radioterapia que incluye radiación con haces externos, radioterapia de intensidad modulada (IMRT), y cualquier forma de radiocirugía que incluye, por ejemplo, Gamma Knife, Cyberknife, Linac, y radiación intersticial (tal como, por ejemplo, semillas radiactivas implantadas o balón GliaSite).

55

También se describe un procedimiento de reducción de la fosforilación de ErbB en una célula cancerosa poniendo en contacto la célula con un agente terapéutico anti-ErbB y un agente terapéutico anti-MET. La célula cancerosa ha adquirido

una resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB y comprende niveles elevados de actividad y/o expresión de MET, por ejemplo, asociados a, por ejemplo, una mutación activante en el gen MET, una amplificación del gen MET, o activación de MET mediada por HGF. Los procedimientos desvelados en el presente documento pueden usarse para reducir la fosforilación de uno o más de ErbB1, ErbB2, ErbB3 y/o ErbB4. Procedimientos para examinar la fosforilación de ErbB se conocen en la técnica. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo anti-fosfo-ErbB para determinar la presencia y/o cantidad de ErbB fosforilado en una célula (por ejemplo, técnicas inmunohistoquímicas) o en un lisado celular. Alternativamente, un lisado celular puede ejecutarse sobre un gel de SDS-PAGE, transferirse a nitrocelulosa y a continuación sondarse con un anticuerpo anti-ErbB para detectar la presencia y/o cantidad de una o más proteínas ErbB fosforiladas en la célula. Adicionalmente, un anticuerpo anti-ErbB (por ejemplo, ErbB1, ErbB2, o ErbB4) puede usarse para inmunoprecipitar una proteína ErbB de un lisado celular, y la proteína ErbB puede entonces usarse en un ensayo de cinasa para detectar la presencia de proteína ErbB fosforilada activa en la célula. Ensayos de cinasa adecuados para proteínas ErbB son muy conocidos en la técnica, ya que son procedimientos para medir la fosforilación de un sustrato de proteína. La presencia y/o cantidad de un anti-proteína ErbB puede determinarse usando una matriz de fosfo-tirosina cinasa del receptor (RTK) (comercialmente disponible de R&D Systems). Están comercialmente disponibles anticuerpos específicos para ErbB1, fosfo-ErbB1, ErbB2, fosfo-ErbB2, ErbB3, fosfo-ErbB3, ErbB4 y fosfo-ErbB4 (véase, por ejemplo, Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Puede desearse comparar el nivel de la fosforilación de ErbB en la célula cancerosa con un control, por ejemplo, una célula que no se ha puesto en contacto con un agente terapéutico anti-ErbB, un agente terapéutico anti-MET, o ambos, o una célula que se ha puesto en contacto con una cantidad diferente de uno o ambos de los agentes terapéuticos, o un valor de referencia, tal como un valor esperado para un ensayo dado, etc.

También se describe un procedimiento de reducción de la señalización mediada por PI3K en una célula cancerosa poniendo en contacto la célula con un agente terapéutico anti-ErbB y un agente terapéutico anti-MET. La célula cancerosa ha adquirido una resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB y comprende niveles elevados de actividad y/o expresión de MET (por ejemplo, asociados a una mutación activante en el gen MET, una amplificación del gen MET o activación de MET mediada por HGF). Se conocen en la técnica procedimientos para examinar la señalización mediada por PI3K. Por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. n.º 2005/0170439 describe procedimientos de determinación de la unión de complejos formados entre un receptor de ErbB y cinasa PI3. Alternativamente, la presencia o ausencia de formas fosforiladas de proteínas que se fosforilan en respuesta a la activación de PI3K (tal como, por ejemplo, Akt) puede ensayarse usando anticuerpos específicos para los sustratos. Están comercialmente disponibles anticuerpos que son específicos para las diversas formas fosforiladas de PKB/AKT (véase, por ejemplo, New England Biolabs (UK) Ltd de Hitchin, Hertfordshire). Otros anticuerpos adecuados serán conocidos para aquellos expertos en la técnica. Los inmunoensayos para medir estas proteínas pueden llevarse a cabo de muchas formas diferentes y convenientes que son muy conocidas para aquellos expertos en la técnica. Alternativamente, pueden usarse técnicas inmunohistoquímicas para identificar formas fosforiladas de PKB/AKT en células cancerosas. Puede desearse comparar el nivel de señalización mediada por PI3K en la célula cancerosa con un control, por ejemplo, una célula que no se ha puesto en contacto con un agente terapéutico anti-ErbB, un agente terapéutico anti-MET o ambos, o una célula que se ha puesto en contacto con una cantidad diferente de uno o ambos de los agentes terapéuticos, o un valor de referencia, tal como un valor esperado para un ensayo dado, etc.

Se describe un procedimiento de reducción de la señalización mediada por ErbB en una célula cancerosa poniendo en contacto la célula con un agente terapéutico anti-ErbB y un agente terapéutico anti-MET. La célula cancerosa ha adquirido una resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB y comprende niveles elevados de actividad y/o expresión de MET, por ejemplo, asociados a una mutación activante en el gen MET, una amplificación del gen MET, o activación de MET mediada por HGF. Los procedimientos desvelados en el presente documento pueden usarse para reducir la señalización mediada por uno o más de ErbB1, ErbB2, ErbB3 y/o ErbB4. Se conocen en la técnica procedimientos para examinar la señalización mediada por ErbB. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos específicos para un sustrato de una proteína ErbB para identificar la presencia de, o determinar la cantidad de, sustrato fosforilado presente en la célula (por ejemplo, técnicas inmunohistoquímicas) o en un lisado de la célula (por ejemplo, técnicas de transferencia Western). Adicionalmente, pueden inmunoprecipitarse sustratos de ErbB de un lisado celular y usarse en un ensayo de actividad para determinar si se han fosforilado y así activado por la cinasa del receptor de ErbB, reflejando así la señalización mediada por ErbB. Puede desearse comparar el nivel de la señalización mediada por ErbB en la célula cancerosa con un control, por ejemplo, una célula que no se ha puesto en contacto con un agente terapéutico anti-ErbB, un agente terapéutico anti-MET, o ambos, o una célula que se ha puesto en contacto con una cantidad diferente de uno o ambos de los agentes terapéuticos, o un valor de referencia, tal como un valor esperado para un ensayo dado, etc.

Adicionalmente se describe un procedimiento para (i) restaurar la sensibilidad de una célula cancerosa a un agente terapéutico anti-ErbB, (ii) reducir la resistencia de una célula cancerosa a un agente terapéutico anti-ErbB, y/o (iii) tratar la resistencia adquirida al agente terapéutico anti-ErbB en una célula cancerosa, poniendo en contacto la célula con un agente terapéutico anti-ErbB y un agente terapéutico anti-MET. La célula cancerosa ha adquirido una resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB y comprende niveles elevados de actividad y/o expresión de MET, por ejemplo, asociados a una mutación activante en el gen MET, una amplificación del gen MET, o activación de MET mediada por HGF. Los procedimientos desvelados en el presente documento pueden usarse para restaurar la sensibilidad, reducir la resistencia

y/o tratar una resistencia adquirida, de una célula cancerosa a uno o más de los siguientes: un agente terapéutico anti-ErbB1, un agente terapéutico anti-ErbB2, un agente terapéutico anti-ErbB3 y/o un agente terapéutico anti-ErbB4. Se conocen en la técnica procedimientos para examinar la sensibilidad y/o resistencia de las células a un agente terapéutico anti-ErbB. Por ejemplo, pueden determinarse la cantidad de crecimiento y/o proliferación celular y/o la cantidad de apoptosis en presencia de la terapia de combinación de anti-ErbB/anti-MET en comparación con el agente terapéutico anti-ErbB solo. Una disminución en el crecimiento y/o proliferación celular y/o un aumento en la apoptosis de la célula cancerosa es indicativo de un aumento en la sensibilidad, o una reducción en la resistencia, al agente terapéutico anti-ErbB. Se conocen en la técnica procedimientos para examinar el crecimiento, proliferación y apoptosis celular y se describen adicionalmente en el presente documento más adelante.

Adicionalmente se describe en el presente documento un procedimiento de reducción del crecimiento y/o proliferación de una célula cancerosa, o aumento de la apoptosis de una célula cancerosa, poniendo en contacto la célula con un agente terapéutico anti-ErbB y un agente terapéutico anti-MET. La célula cancerosa ha adquirido una resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB y comprende elevada actividad y/o expresión de MET, por ejemplo, asociada a una mutación activante en el gen MET, una amplificación del gen MET, o activación de MET mediada por HGF. Procedimientos para examinar el crecimiento y/o proliferación y/o apoptosis de una célula cancerosa son muy conocidos en la técnica. Procedimientos a modo de ejemplo para determinar el crecimiento y/o proliferación y/o apoptosis celular incluyen, por ejemplo, azul de Alamar, Brd U, MTT, exclusión con azul de tripano, incorporación de ³H-timidina y ensayos de XTT. Los kits para determinar el crecimiento y/o proliferación y/o apoptosis celular están comercialmente disponibles de una variedad de fuentes. Puede desearse comparar el nivel de crecimiento y/o proliferación y/o apoptosis de la célula cancerosa con un control, por ejemplo, una célula que no se ha puesto en contacto con un agente terapéutico anti-ErbB, un agente terapéutico anti-MET, o ambos, o una célula que se ha puesto en contacto con una cantidad diferente de uno o ambos de los agentes terapéuticos, o un valor de referencia, tal como un valor esperado para un ensayo dado, etc.

3. Agentes terapéuticos anti-ErbB y anti-MET

Diversos procedimientos descritos en el presente documento utilizan agentes terapéuticos anti-ErbB y agentes terapéuticos anti-MET. Cualquier tipo de agente terapéutico que presente actividad anti-ErbB o actividad anti-MET puede usarse según los procedimientos descritos en el presente documento. Un agente terapéutico que tiene una actividad anti-ErbB es cualquiera que antagoniza (por ejemplo, reduce o inhibe) al menos una actividad biológica de una proteína ErbB. Actividades biológicas a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, actividad de tirosina cinasas (para ErbB1, ErbB2 o ErbB4), formación de interacciones proteína-proteína (tales como, por ejemplo, homo- o hetero-dimerización de receptores, unión a ligandos, unión a un sustrato, etc.), y señalización mediada por ErbB. Similarmente, un agente terapéutico que tiene una actividad anti-MET es cualquiera que antagoniza (por ejemplo, reduce o inhibe) al menos una actividad biológica de una proteína MET. Actividad biológica a modo de ejemplo incluye, por ejemplo, actividad de tirosina cinasas, formación de interacciones proteína-proteína (tales como, por ejemplo, homo- o hetero-dimerización de receptores, unión a ligandos, unión a un sustrato, etc.) y señalización mediada por MET. Agentes terapéuticos anti-ErbB y anti-MET a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, agentes terapéuticos de molécula pequeña, agentes terapéuticos de ácido nucleico (tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos antisentido, ARNbc, ARNip, o ácidos nucleicos enzimáticos) y agentes terapéuticos de proteína (tales como, por ejemplo, un anticuerpo). Adicionalmente, diversos procedimientos descritos en el presente documento implican los procedimientos de tratar cáncer que ha desarrollado una resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB. Los procedimientos pueden usarse para tratar cánceres que han desarrollado una resistencia a cualquiera de los agentes terapéuticos anti-ErbB descritos en el presente documento para fines de tratamiento.

Un agente terapéutico anti-ErbB o anti-MET puede ser un agente terapéutico de molécula pequeña. Agentes terapéuticos de molécula pequeña incluyen cualquier molécula pequeña que antagonice al menos una actividad biológica de ErbB o MET. Agentes terapéuticos de molécula pequeña a modo de ejemplo son inhibidores de cinasas. Otros agentes terapéuticos de molécula pequeña adecuados incluyen moléculas pequeñas que antagonizan la dimerización de receptores o unión a ligandos. Ejemplos adecuados de agentes terapéuticos de molécula pequeña anti-ErbB y agentes terapéuticos de molécula pequeña anti-MET se proporcionan más adelante.

Un agente terapéutico anti-ErbB o anti-MET puede ser un ácido nucleico antisentido. Por "ácido nucleico antisentido" se indica un compuesto de ácido nucleico no enzimático que se une a un ácido nucleico diana por medio de interacciones ARN-ARN, ARN-ADN o ARN-PNA (ácido nucleico de proteína) y altera la actividad del ácido nucleico diana (para una revisión, véanse Stein y Cheng, 1993 Science 261, 1004, y Woolf y col., patente de EE. UU. n.º 5.849.902). Normalmente, las moléculas antisentido son complementarias a una secuencia diana a lo largo de una única secuencia contigua de la molécula antisentido. Sin embargo, una molécula antisentido puede formar un bucle y se une a un sustrato de ácido nucleico que forma un bucle. Así, una molécula antisentido puede ser complementaria a dos (o más) secuencias del sustrato no contiguas, o dos (o más) porciones de secuencias no contiguas de una molécula antisentido pueden ser complementarias a una secuencia diana, o ambos. Para una revisión de las actuales estrategias antisentido véanse Schmajuk y col., 1999, J. Biol. Chem., 274, 21783-21789, Delilhas y col., 1997, Nature, 15, 751-753, Stein y col., 1997, Antisense N. A. Drug Dev., 7, 151, Crooke, 2000, Methods Enzymol., 313, 3-45; Crooke, 1998, Biotech. Genet. Eng. Rev.,

15, 121-157, Crooke, 1997, Ad. Pharmacol., 40, 1-49.

Un agente terapéutico anti-ErbB o anti-MET puede ser un ARNip. El término “ARN interferente pequeño”, “ARNip” o “ácido nucleico interferente pequeño” se refiere a cualquier compuesto de ácido nucleico que es capaz de mediar en iARN o silenciamiento génico cuando se procesa apropiadamente por una célula. Por ejemplo, el ARNip puede ser una molécula de polinucleótidos bicatenaria que comprende regiones sentido y antisentido auto-complementarias, en la que la región antisentido comprende complementariedad con un compuesto de ácido nucleico diana (por ejemplo, una RTK). El ARNip puede ser un polinucleótido de horquilla monocatenaria que tiene regiones sentido y antisentido auto-complementarias, en el que la región antisentido comprende complementariedad con un compuesto de ácido nucleico diana. El ARNip puede ser un polinucleótido monocatenario circular que tiene dos o más estructuras de bucle y un tallo que comprende regiones sentido y antisentido auto-complementarias, en el que la región antisentido comprende complementariedad con un compuesto de ácido nucleico diana, y en el que el polinucleótido circular puede procesarse tanto *in vivo* como *in vitro* para generar un ARNip activo que puede mediar en iARN. El ARNip también puede comprender un polinucleótido monocatenario que tiene complementariedad con un compuesto de ácido nucleico diana, en el que el polinucleótido monocatenario puede comprender además un grupo fosfato terminal, tal como un 5'-fosfato (véase, por ejemplo, Martínez y col., 2002, Cell., 110, 563-574), o 5',3'-difosfato.

Como se describe en el presente documento, los ARNip pueden ser de aproximadamente 19-30 nucleótidos de longitud, o 21-23 nucleótidos de longitud. Se entiende que los ARNip reclutan complejos de nucleasa y guían los complejos al ARNm diana emparejándose con las secuencias específicas. Como resultado, el ARNm diana es degradado por las nucleasas en el complejo de proteína. La molécula de 21-23 nucleótidos de ARNip puede comprender un grupo hidroxilo en 3'. Las construcciones de ARNip pueden generarse por procesamiento de ARN bicatenarios más largos, por ejemplo, en presencia de la enzima *Dicer*. Puede usarse el sistema *in vitro de Drosophila*. Se combina ARNbc con un extracto soluble derivado de embrión de *Drosophila*, produciendo así una combinación. La combinación se mantiene en condiciones en las que el ARNbc se procesa a moléculas de ARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos. Las moléculas de ARNip pueden purificarse usando varias técnicas conocidas para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse electroforesis en gel para purificar ARNip. Alternativamente, pueden usarse procedimientos no desnaturizantes, tales como cromatografía en columna no desnaturizante, para purificar el ARNip. Además, puede usarse cromatografía (por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño), centrifugación en gradiente de glicerol, purificación por afinidad con anticuerpo para purificar ARNip.

La producción de los ARNip puede llevarse a cabo por procedimientos sintéticos químicos o por técnicas de ácido nucleico recombinante. La polimerasa endógena de la célula tratada puede mediar en la transcripción *in vivo*, o puede usarse ARN polimerasa clonada para la transcripción *in vitro*. Como se usa en el presente documento, las moléculas de ARNip no necesitan limitarse a aquellas moléculas que contienen solo ARN, sino que pueden contener una hebra de ADN, varios nucleótidos de ADN y/o englobar nucleótidos químicamente modificados y no nucleótidos. Por ejemplo, los ARNip pueden incluir modificaciones en tanto el esqueleto de azúcar del fosfato como el nucleósido, por ejemplo, para reducir la susceptibilidad a nucleasas celulares, mejorar la biodisponibilidad, mejorar las características de formulación y/o cambiar otras propiedades farmacocinéticas. Para ilustrar, los enlaces fosfodiéster del ARN natural pueden modificarse para incluir al menos uno de un heteroátomo de nitrógeno o de azufre. Pueden confeccionarse modificaciones en la estructura del ARN para permitir la inhibición genética específica mientras que se evita una respuesta general a ARN bicatenario (ARNbc). Asimismo, pueden modificarse bases para bloquear la actividad de adenosina desaminasa. Los ARNbc pueden producirse enzimáticamente o por síntesis orgánica parcial/total, cualquier ribonucleótido modificado puede introducirse por síntesis enzimática u orgánica *in vitro*. Los procedimientos de modificar químicamente moléculas de ARN pueden adaptarse para modificar ARNbc (véase, por ejemplo, Heidenreich y col. (1997) Nucleic Acids Res, 25:776-780; Wilson y col. (1994) J Mol Recog 7:89-98; Chen y col. (1995) Nucleic Acids Res 23:2661-2668; Hirschbein y col. (1997) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 7:55-61). Simplemente para ilustrar, el esqueleto de un ARNip puede modificarse con fosforotioatos, fosforamidato, fosfoditioatos, metilfosfonato-fosfodiésteres quiméricos, ácidos nucleicos peptídicos, oligómeros que contienen 5-propinil-pirimidina o modificaciones de azúcar (por ejemplo, ribonucleósidos 2'-sustituidos, configuración a). En ciertos casos, los ARNbc de la divulgación carecen de nucleótidos que contienen 2'-hidroxilo (2'-OH).

Al menos una hebra de una molécula de ARNip puede tener nucleótidos protuberantes en 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 1-3 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, una hebra tiene nucleótidos protuberantes en 3' y la otra hebra puede ser de extremos romos o también tener nucleótidos protuberantes. La longitud de los nucleótidos protuberantes puede ser igual o diferente para cada hebra. Con el fin de potenciar adicionalmente la estabilidad de un ARNip, los nucleótidos protuberantes en 3' pueden estabilizarse contra la degradación. El ARN puede estabilizarse incluyendo nucleótidos de purina, tales como nucleótidos de adenosina o guanosina. Alternativamente, se tolera la sustitución de nucleótidos de pirimidina con análogos modificados, por ejemplo, la sustitución de nucleótidos protuberantes en 3' del nucleótido uridina con 2'-desoxitimidina y no afecta la eficiencia de la iARN. La ausencia de un 2'-hidroxilo potencia significativamente la resistencia a la nucleasa de los nucleótidos protuberantes en medio de cultivo de tejido y puede ser beneficiosa *in vivo*.

Una ARN interferente también puede estar en forma de un ARN bicatenario largo. Por ejemplo, la porción bicatenaria del ARNbc puede tener al menos 25, 50, 100, 200, 300 o 400 bases de longitud, o de aproximadamente 400-800 bases de longitud. Opcionalmente, los ARNbc pueden digerirse intracelularmente, por ejemplo, para producir secuencias de ARNip en la célula. Sin embargo, el uso de ARN bicatenarios largos *in vivo* no siempre es práctico, supuestamente debido a efectos perjudiciales que pueden producirse por la respuesta de ARNbc independiente de secuencia. En tales realizaciones, se prefieren el uso de sistemas de administración locales y/o agentes que reducen los efectos de interferón o PKR.

Un ARNip puede estar en forma de una estructura de horquilla (por ejemplo, ARN en horquilla). Los ARN en horquilla pueden sintetizarse exógenamente o pueden formarse transcribiendo a partir de promotores de ARN polimerasa III *in vivo*. Ejemplos de preparación y uso de tales ARN en horquilla para el silenciamiento de genes en células de mamífero se describen en, por ejemplo, Paddison y col., Genes Dev, 2002, 16:948-58; McCaffrey y col., Nature, 2002, 418:38-9; McManus y col., RNA, 2002, 8:842-50; Yu y col., Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99:6047-52). Preferentemente, tales ARN en horquilla se manipulan en células o en un animal para garantizar la supresión continua y estable de un gen deseado. Se conoce en la técnica que los ARNip pueden producirse por procesamiento de un ARN en horquilla en la célula.

La solicitud PCT WO 01/77350 describe un vector a modo de ejemplo para la transcripción bidireccional de un transgén para dar tanto transcritos de ARN sentido como antisentido del mismo transgén en una célula eucariota. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un vector recombinante que tiene las siguientes características únicas: comprende un replicón viral que tiene dos unidades de transcripción que se solapan dispuestas en una orientación opuesta y que flanquean un transgén para un ARNip de interés, en el que las dos unidades de transcripción que se solapan dan tanto transcritos de ARN sentido como antisentido del mismo fragmento de transgén en una célula huésped.

Un agente terapéutico anti-ErbB o anti-MET puede ser un ácido nucleico enzimático. Por "ácido nucleico enzimático" se indica un ácido nucleico que tiene complementariedad en una región de unión al sustrato con un gen diana especificado, y también tiene una actividad enzimática que es activa para escindir específicamente un ácido nucleico diana. Se entiende que el ácido nucleico enzimático puede escindir intermolecularmente un ácido nucleico y así inactivar un ácido nucleico diana. Estas regiones complementarias permiten la suficiente hibridación del ácido nucleico enzimático con el ácido nucleico diana y así permiten la escisión. Se prefiere un cien por cien de complementariedad (identidad), pero también puede ser útil complementariedad de tan solo el 50-75 % (véase, por ejemplo, Werner y Uhlenbeck, 1995, Nucleic Acids Research, 23, 2092-2096; Hammann y col., 1999, Antisense and Nucleic Acids Drug Dev., 9, 25-31). Los ácidos nucleicos enzimáticos pueden modificarse en la base, azúcar y/o grupos fosfato. Como se describe en el presente documento, el término "ácido nucleico enzimático" se usa indistintamente con términos tales como ribozimas, ARN catalítico, ARN enzimático, ADN catalítico, aptazima o ribozima de unión al aptámero, ribozima regulable, oligonucleótidos catalíticos, nucleozima, ADNzima, enzima de ARN, endorribonucleasa, endonucleasa, minizima, leadzima, oligozima o enzima de ADN. Todas estas terminologías describen ácidos nucleicos con actividad enzimática. Los ácidos nucleicos enzimáticos específicos descritos en el presente documento no pretenden ser limitantes y aquellos expertos en la técnica reconocerán que todo lo que es importante en un ácido nucleico enzimático es que tenga un sitio de unión al sustrato específico que es complementario a una o más de las regiones de ácido nucleico diana, y que tenga secuencias de nucleótidos dentro o alrededor de ese sitio de unión al sustrato que confiere a un ácido nucleico actividad de escisión y/o de ligación a la molécula (Cech y col., patente de EE. UU. n.º 4.987.071; Cech y col., 1988, 260 JAMA 3030). Un ácido nucleico enzimático es una ribozima diseñada para escindir catalíticamente un transcrito de ARNm para prevenir la traducción de ARNm (véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT WO90/11364, publicada el 4 de octubre de 1990; Sarver y col., 1990, Science 247:1222-1225; y la patente de EE. UU. n.º 5.093.246). Un ácido nucleico enzimático es una enzima de ADN. Procedimientos de preparación y administración de enzimas de ADN pueden encontrarse, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.110.462.

Un agente terapéutico anti-ErbB o anti-MET puede ser un anticuerpo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo que se une a una proteína ErbB (por ejemplo, ErbB1, ErbB2, ErbB3, o ErbB4), una proteína MET, un ligando de ErbB (por ejemplo, EGF, TGF α , AR, BTC, HB-EPR, NRG1, NRG2, NRG3 o NRG4), o un ligando de MET (por ejemplo, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)). El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, pretende incluir fragmentos de unión al antígeno del mismo. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y cribarse los fragmentos para utilidad del mismo modo que es adecuado para anticuerpos completos. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos F(ab')₂ tratando anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante puede tratarse para reducir puentes de disulfuro para producir fragmentos Fab'. Se prevé adicionalmente que los anticuerpos incluyan moléculas biespecíficas y quiméricas, además de anticuerpos (scFv) monocatenarios. También se incluyen anticuerpos trímeros, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y anticuerpos monocatenarios. Todas estas formas modificadas de anticuerpos, además de fragmentos de anticuerpos, pretenden incluirse en el término "anticuerpo".

Los anticuerpos pueden provocarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un mamífero tal como un ratón, un hámster o conejo puede inmunizarse con una forma inmunogénica de una proteína ErbB, proteína MET, ligando de ErbB o ligando de MET (por ejemplo, un fragmento antigénico que puede provocar una respuesta de anticuerpos). Alternativamente, la inmunización puede producirse usando un ácido nucleico, que expresa *in vivo* una

proteína ErbB, proteína MET, ligando de ErbB o ligando de MET que da lugar a la respuesta inmunogénica observada. Técnicas para conferir inmunogenicidad a una proteína o péptido incluyen conjugación con vehículos u otras técnicas muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede administrarse una porción de peptidilo de un polipéptido en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización puede monitorizarse por la detección de títulos de anticuerpos en plasma o suero. Pueden usarse ELISA estándar u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

Tras la inmunización, pueden obtenerse los antisueros reactivos con un polipéptido y, si se desea, aislarse anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, las células productoras de anticuerpos (linfocitos) pueden recogerse de un animal inmunizado y fusionarse por procedimientos de fusión de células somáticas estándar con células inmortalizantes tales como células de mieloma para dar células de hibridoma. Tales técnicas son muy conocidas en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridoma (originalmente desarrollada por Kohler y Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), como la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbar y col., (1983) *Immunology Today*, 4: 72), y la técnica del hibridoma de VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pág. 77-96). Las células de hibridoma pueden cribarse inmunoquímicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con los polipéptidos y los anticuerpos monoclonales aislados.

Los agentes terapéuticos anti-ErbB y/o agentes terapéuticos anti-MET pueden ser un andamiaje que expresa proteína (véase, por ejemplo, Hosse, R.J., y col., *Protein Science*, 15:14-27 (2006)) que se une a una proteína ErbB (por ejemplo, ErbB1, ErbB2, ErbB3 o ErbB4), una proteína MET, un ligando de ErbB (por ejemplo, EGF, TGF α , AR, BTC, HB-EPR, NRG1, NRG2, NRG3 o NRG4) o un ligando de MET (por ejemplo, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)). En una realización, el andamiaje que expresa proteína es una molécula de unión terapéutica "direccionable" basada en fibronectina (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT n.º WO 00/34784, WO 01/64942 y WO 02/032925). Los bucles del dominio III de fibronectina (FnIII) comprenden regiones que pueden someterse a mutación al azar y esquemas evolutivos dirigidos de rondas iterativas de unión diana, selección y adicionalmente mutación con el fin de desarrollar herramientas terapéuticas útiles.

Un agente terapéutico anti-ErbB y/o un agente terapéutico anti-MET puede ser un polipéptido que reduce la unión entre un receptor de ErbB o receptor de MET y su ligando correspondiente. El polipéptido puede ser un polipéptido de ErbB o MET soluble, en particular un polipéptido que comprende el dominio extracelular de un ErbB o MET, tal como, por ejemplo, cualquier dominio extracelular que se produce naturalmente de una proteína ErbB o MET, además de cualquier variante de las mismas (incluyendo mutantes, fragmentos y formas de peptidomimético) que retienen la unión a ligandos.

Los polipéptidos de unión a ligandos de ErbB o MET incluyen peptidomiméticos. Peptidomiméticos se refiere a péptidos químicamente modificados y moléculas similares a péptidos que contienen aminoácidos que no se producen naturalmente, peptoides y similares. Los peptidomiméticos proporcionan diversas ventajas con respecto a un péptido, que incluyen estabilidad potenciada cuando se administran a un sujeto. Los procedimientos de identificación de un peptidomimético son muy conocidos en la técnica e incluyen el cribado de bases de datos que contienen bibliotecas de posibles peptidomiméticos. Por ejemplo, Cambridge Structural Database contiene un conjunto de más de 300.000 compuestos que tienen estructuras cristalinas conocidas (Allen y col., *Acta Crystallogr. Section B*, 35:2331 (1979)). Si no está disponible estructura cristalina de una molécula diana, puede generarse una estructura usando, por ejemplo, el programa CONCORD (Rusinko y col., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 29:251 (1989)). Otra base de datos, Available Chemicals Directory (Molecular Design Limited, Informations Systems; San Leandro Calif.), contiene aproximadamente 100.000 compuestos que están comercialmente disponibles y también pueden ser buscados para identificar posibles peptidomiméticos de los polipéptidos de unión a ligandos de ErbB o MET.

Variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos de unión a ligandos de ErbB o MET incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos de ErbB o MET y uno o más dominios de fusión. Ejemplos muy conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP), o albúmina de suero humano. En realizaciones a modo de ejemplo, un polipéptido de ErbB o MET está fusionado con un dominio que estabiliza el polipéptido de ErbB o MET *in vivo* (un dominio "estabilizador"). Por "estabilizador" se indica cualquiera que aumente la semivida en suero, independientemente de si esto es debido a disminución de la destrucción, disminución de la eliminación por el riñón u otro efecto farmacocinético. Las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina son conocidas por conferir propiedades farmacocinéticas deseables a una amplia variedad de proteínas. Asimismo, las fusiones con albúmina de suero humano pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse incluyen dominios multimerizantes (por ejemplo, dimerizantes, tetramerizantes) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional).

Se conocen en la técnica ejemplos de agentes terapéuticos anti-ErbB1 (anti-EGFR). Por ejemplo, agentes terapéuticos de molécula pequeña anti-ErbB1 (EGFR) incluyen inhibidores de cinasas de EGFR tales como, por ejemplo, gefitinib (IRESSA™; AstraZeneca, Londres), erlotinib (TARCEVA™; Genentech, South San Francisco, CA), lapatinib,

5 PF00299804, CI-1033, EKB-569, BIBW2992, ZD6474, AV-412 o HKI-272. Los agentes terapéuticos de proteína anti-EGFR incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-EGFR tales como cetuximab (ERBITUX™, ImClone Systems Inc, New York, NY y Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ), panitumumab (VECTIBIX™, Amgen, Thousand Oaks, CA), EMD-7200 (Merck AG), ABX-EGF (Amgen Inc. y Abgenix Inc.), HR3 (gobierno cubano), anticuerpos IgA (Universidad de Erlangen-Nuremberg), TP-38 (IVAX).

10 Ejemplos de agentes terapéuticos anti-ErbB2 incluyen, por ejemplo, CP-724-714, CI-1033 (canertinib), HERCEPTIN™ (trastuzumab), OMNITARG™ (pertuzumab), TAK-165, GW-572016 (lonafarnib), GW-282974, EKB-569, PI-166, dHER2 (vacuna de HER2), APC8024 (vacuna de HER2), anticuerpo biespecifico anti-HER2/neu, B7.her2lgG3, anticuerpos biespecifico trifuncional AS HER2, mAB AR-209 y mAB 2B-1. Agentes terapéuticos anti-ErbB2 adicionales incluyen aquellos descritos en los documentos WO 98/02434, WO 99/35146, WO 99/35132, WO 98/02437, WO 97/13760, WO 95/19970, WO 2001/98277, la patente de EE. UU. n.º 5.587.458, la patente de EE. UU. n.º 5.877.305, las patentes de EE. UU. n.º 6.465.449 y 6.284.764.

Ejemplos de agentes terapéuticos anti-ErbB3 incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-ErbB3 (véase por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. n.º 20040197332).

15 Ejemplos de agentes terapéuticos anti-ErbB4 incluyen, por ejemplo, ARNip anti-ErbB4 (véase por ejemplo, Maatta y col., Mol. Biol. Cell 17: 67-79 (2006), o inhibidores de cinasas de ErbB4 tales como, por ejemplo, CI-1033, EKB-569, lapatinib, PF00299804 y AV412.

Agentes terapéuticos anti-ErbB también engloban agentes terapéuticos con múltiples dianas, tales como, por ejemplo, inhibidores de receptores de pan ERBB que incluyen GW572016, CI-1033, EKB-569 y Omnitarg™.

20 Agentes terapéuticos anti-MET a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, inhibidores de cinasas de MET tales como, por ejemplo, PHA-665752 (Pfizer, Inc, La Jolla, CA), PF-02341066 (Pfizer, Inc, La Jolla, CA), SU11274, SU5416, XL-880, MGCD265, XL184, ARQ 197, MP-470, SGX-523, JNJ38877605, AMG 102 y OA-5D5

4. Procedimientos para la detección de modificaciones de ErbB y MET

25 En diversas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento pueden implicar la detección de una mutación activante de ErbB, una amplificación del gen ErbB, activación de ErbB inducida por ligando, una mutación activante de MET, una amplificación del gen MET y/o activación de MET mediada por ligando. Diversos ejemplos de mutaciones activantes de ErbB y MET se describen adicionalmente en el presente documento e incluyen mutaciones fuera de las propias secuencias de ErbB y MET que conducen a un aumento en al menos una actividad biológica de una proteína ErbB o MET. Puede usarse cualquier técnica reconocida en la técnica para detectar mutaciones o
30 amplificaciones génicas que incluyen procedimientos que implican el análisis de un ácido nucleico (tanto ADN como ARN), análisis de un producto de proteína y/o análisis de actividad de proteínas. Tales procedimientos de detección engloban procedimientos de detección tanto cualitativa como cuantitativa. Procedimientos a modo de ejemplo se describen adicionalmente en el presente documento.

Mutaciones genéticas

35 Puede detectarse una mutación genética poniendo en contacto una muestra de ácido nucleico con una sonda que puede hibridarse específicamente con la secuencia mutante y a continuación detectarse la hibridación de la sonda. La sonda está generalmente detectablemente marcada, tal como con un radioisótopo (³H, ³²P, ³³P, etc.), un agente fluorescente (rodamina, fluoresceína, etc.) o un agente cromogénico para facilitar la detección de la hibridación. Un experto en la técnica podrá diseñar fácilmente una sonda adecuada para detectar una mutación de interés basándose en la divulgación
40 proporcionada en el presente documento. Por ejemplo, las sondas pueden ser un oligómero antisentido, por ejemplo PNA, morfolino-fosforamidatos, LNA o 2'-alcoxialcoxi, y puede ser de aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 10 a aproximadamente 75, aproximadamente 15 a aproximadamente 50, o aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, una o más sondas pueden aislarse sobre un soporte sólido y una muestra de ácido nucleico detectablemente marcada puede hibridarse con la sonda
45 sobre el soporte. Por ejemplo, la sonda puede ser parte de una micromatriz que comprende una pluralidad de secuencias inmovilizadas. Los procedimientos para la hibridación y análisis de matrices son conocidos para aquellos expertos en la técnica.

Alternativamente, pueden detectarse mutaciones genéticas en una muestra amplificando una secuencia de ácidos nucleicos o porción de la misma que se sospecha que contiene una mutación, y comparando la movilidad electroforética
50 del ácido nucleico amplificado con la movilidad electroforética del gen no mutado correspondiente o fragmento del mismo. Una diferencia en la movilidad indica la presencia de una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos amplificada. La movilidad electroforética puede determinarse sobre gel de poliacrilamida. Este procedimiento es particularmente útil para la detección de mutaciones por inserción y/o por delección.

Otro procedimiento adecuado para la detección de mutaciones implica el uso de detección de mutaciones enzimáticas (EMD) (Del Tito y col., *Clinical Chemistry* 44:731-739, 1998). La EMD usa el bacteriófago resolvable T4 endonucleasa VII, que barre el ADN bicatenario hasta que detecta y escinde distorsiones estructurales producidas por desapareamientos de pares de bases resultantes de mutaciones puntuales, inserciones y deleciones. La detección de fragmentos formados por la escisión por resolvable, por ejemplo, por electroforesis en gel, indica la presencia de una mutación. Los beneficios del procedimiento de EMD son un protocolo único para identificar mutaciones puntuales, deleciones e inserciones ensayadas directamente a partir de reacciones de PCR que eliminan la necesidad de purificación de muestras, acortando el tiempo de hibridación y aumentando la relación de señal con respecto a ruido. Muestras mezcladas que contienen hasta 20 veces de exceso de ADN normal y fragmentos de hasta 4 kb de tamaño puede ensayarse usando este procedimiento. Sin embargo, el barrido por EMD no identifica cambios de bases particulares que se producen en muestras positivas para mutación que requieren procedimientos de secuenciación adicionales para la identidad de la mutación si fuera necesario. Puede usarse la enzima CEL I similarmente a la resolvable T4 endonucleasa VII como se demuestra en la patente de EE. UU. n.º 5.869.245.

La detección de mutaciones puntuales puede llevarse a cabo por clonación molecular y secuenciación de polinucleótido usando técnicas muy conocidas en la técnica. Alternativamente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede usarse para amplificar secuencias de genes directamente a partir de una preparación de ADN genómico de una muestra biológica, tal como, por ejemplo, células cancerosas. La secuencia de ADN de las secuencias amplificadas puede determinarse a continuación e identificarse mutaciones en ella. La reacción en cadena de la polimerasa es muy conocida en la técnica y se describe en, por ejemplo, Saiki y col., *Science* 239:487, 1988; patente de EE. UU. n.º 4.683.203; y la patente de EE. UU. n.º 4.683.195.

Adicionalmente, también puede usarse PCR específica de alelos para detectar mutaciones (véase Ruano y Kidd, *Nucleic Acids Research*, vol. 17, pág. 8392, 1989). Según esta técnica, se usan cebadores que se hibridan con los extremos 3' de una secuencia particular. Si la secuencia particular no está presente debido a una mutación, no se produce un producto de amplificación.

Las inserciones y deleciones de genes también pueden detectarse por clonación, secuenciación y amplificación. Además, puede usarse polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción (RFLP) para puntuar alteraciones de secuencia. También puede usarse análisis de polimorfismos de conformación monocatenaria (SSCP) para detectar variantes de cambios de bases (véanse, por ejemplo, Orita y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 86, pág. 2766-2770, 1989, y *Genomics*, vol. 5, pág. 874-879, 1989). Pueden usarse otras técnicas para detectar inserciones y deleciones como se conocen en la técnica según los procedimientos descritos en el presente documento.

También puede usarse la detección de desapareamientos (por ejemplo, detección de dúplex que no son el 100 % complementarios) para detectar mutaciones puntuales en una secuencia de ADN o ARN (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.459.039, 5.556.750, 5.679.522, 5.861.482, 5.922.539 y 6.008.031).

También puede usarse protección de RNasa, que implica la escisión por desapareamiento, para detectar mutaciones, que incluyen mutaciones puntuales (véanse por ejemplo, Winter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 82, pág. 7575, 1985 y Meyers y col., *Science*, vol. 230, pág. 1242, 1985). En resumen, este procedimiento implica el uso de una ribosonda marcada que es complementaria a una secuencia no mutada. La ribosonda y tanto el ARNm como el ADN aislados de una muestra se hibridan juntos y posteriormente se digieren con la enzima RNasa A que puede detectar algunos desapareamientos en una estructura de ARN de dúplex. Si se detecta un desapareamiento por RNasa A, se escinde en el sitio del desapareamiento, produciendo así fragmentos más cortos que pueden detectarse usando una tecnología de separación tal como electroforesis en gel.

De una manera similar, pueden usarse sondas de ADN para detectar desapareamiento, mediante escisión enzimática o química. Véanse, por ejemplo, Cotton y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 85, 4397, 1988; y Shenk y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 72, pág. 989, 1975. Alternativamente, pueden detectarse desapareamientos por desplazamientos en la movilidad electroforética de dúplex desapareados con respecto a dúplex apareados. Véase, por ejemplo, Cariello, *Human Genetics*, vol. 42, pág. 726, 1988. Con cualquier ribosonda o sonda de ADN, el ARNm o ADN celular que podría contener una mutación puede amplificarse usando PCR antes de la hibridación. También pueden detectarse cambios en las secuencias de ADN usando hibridación Southern, especialmente si los cambios son transposiciones claras, tales como deleciones e inserciones.

50 **Amplificación génica**

La presencia de un gen diana que ha experimentado amplificación puede evaluarse determinando el número de copias del gen diana, es decir, el número de secuencias de ADN en una célula que codifica la proteína diana. Generalmente, una célula diploide normal tiene dos copias de un gen autosómico dado, pero el número de copias puede aumentarse por amplificación génica o duplicación. Los procedimientos de evaluación del número de copias de un gen particular son muy conocidos en la técnica, e incluyen ensayos basados en hibridación y amplificación. En algunas realizaciones, se determina el número real de copias amplificadas del gen. Alternativamente, puede obtenerse una medida cualitativa de la

amplificación génica. Diversos procedimientos para detectar la amplificación génica incluyen, por ejemplo, procedimientos basados en amplificación y procedimientos basados en hibridación (tales como transferencia Southern, FISH, CGH y técnicas de micromatrices) y se describen adicionalmente en el presente documento.

Procedimientos basados en amplificación

- 5 Pueden usarse procedimientos basados en amplificación para detectar la amplificación génica para medir el número de copias de una secuencia amplificada e implica la amplificación (por ejemplo, usando reacción en cadena de la polimerasa o PCR) de una secuencia de interés. En una amplificación cuantitativa, la cantidad de producto de amplificación será proporcional a la cantidad de molde en la muestra original. La comparación con controles apropiados proporciona una medida del número de copias de una secuencia de interés en una muestra dada. La presencia de un mayor nivel de un producto de amplificación, en comparación con un control, es indicativa de secuencia amplificada.

Los procedimientos de amplificación cuantitativa son muy conocidos para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, la PCR cuantitativa implica co-amplificar simultáneamente una cantidad conocida de una secuencia de control usando los mismos cebadores. Esto proporciona un patrón interno que puede usarse para calibrar la reacción de PCR. Se proporcionan protocolos detallados para la PCR cuantitativa, por ejemplo, en Innis y col. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y. Las secuencias de ácidos nucleicos para los genes ErbB y MET son conocidas y son suficientes para permitir que un experto seleccione cebadores que pueden usarse para amplificar cualquier porción de estos genes.

La PCR en tiempo real es otra técnica de amplificación que puede usarse para determinar niveles de copias de genes o niveles de expresión de ARNm (véase, por ejemplo, Gibson y col., Genome Research 6:995-1001, 1996; Heid y col., Genome Research 6:986-994, 1996). La PCR en tiempo real evalúa el nivel de acumulación de productos de PCR durante la amplificación. Esta técnica permite la evaluación cuantitativa de niveles de ARNm en múltiples muestras. Para los niveles de copias de genes, se aísla ADN genómico total de una muestra. Para niveles de ARNm, se extrae ARNm de una muestra y se prepara ADNc usando técnicas convencionales. Puede realizarse PCR en tiempo real, por ejemplo, usando un instrumento 7700 Prism de Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, CA). Pueden diseñarse cebadores de apareamiento y sondas fluorescentes para genes de interés usando, por ejemplo, el programa Primer Express proporcionado por Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, CA). Pueden determinarse concentraciones óptimas de cebadores y sondas inicialmente por aquellos expertos habituales en la técnica, y pueden obtenerse cebadores y sondas de control (por ejemplo, beta-actina) comercialmente de, por ejemplo, Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, CA). Para cuantificar la cantidad de ácido nucleico específico de interés en una muestra, se genera una curva patrón usando un control. Pueden generarse curvas patrón usando los valores de Ct determinados en la PCR en tiempo real, que están relacionados con la concentración inicial del ácido nucleico de interés usado en el ensayo. Generalmente son suficientes diluciones estándar que oscilan de 10^{-10} a 10^{-6} copias del gen de interés. Además, se genera una curva patrón para la secuencia de control. Esto permite la normalización del contenido inicial del ácido nucleico de interés en una muestra de tejido a la cantidad de control para fines de comparación.

Los procedimientos de PCR cuantitativa en tiempo real usando sondas TaqMan™ son muy conocidos en la técnica. Se proporcionan protocolos detallados para PCR cuantitativa en tiempo real, por ejemplo, para ARN en: Gibson y col., 1996, A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res., 10:995-1001; y para ADN en: Heid y col., 1996, Real time quantitative PCR. Genome Res., 10:986-994. Los ensayos basados en TaqMan™ usan una sonda de oligonucleótidos fluorogénica que contiene un colorante fluorescente en 5' y un agente extintor en 3'. La sonda se hibrida con un producto de PCR, pero no puede por sí mismo prolongarse debido a un agente de bloqueo en el extremo 3'. Cuando el producto de PCR se amplifica en ciclos posteriores, la actividad de nucleasa en 5' de la polimerasa, por ejemplo, AmpliTaq™, produce la escisión de la sonda TaqMan™. Esta escisión separa el colorante fluorescente en 5' y el agente extintor en 3', produciendo así un aumento en la fluorescencia en función de la amplificación (véase, por ejemplo, la malla mundial en perkin-elmer.com).

Ensayos basados en hibridación

También puede usarse ensayos de hibridación para detectar el número de copias de genes. Los ensayos basados en hibridación incluyen, pero no se limitan a, procedimientos de "sonda directa" tradicionales tales como transferencias Southern o hibridación *in situ* (por ejemplo, FISH), y procedimientos de "sonda comparativa" tales como hibridación genómica comparativa (CGH). Los procedimientos pueden usarse en una amplia variedad de formatos que incluyen, pero no se limitan a, procedimientos unidos a sustrato (por ejemplo, membrana o vidrio) o enfoques basados en matriz como se describen más adelante.

Un procedimiento de evaluación del número de copias de genes implica transferencia Southern. Los procedimientos para hacer transferencias Southern son conocidos para aquellos expertos en la técnica (véanse Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 19, Ausubel y col., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1995, o Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, NY, 1989). En un ensayo tal, se hibrida ADN genómico (normalmente fragmentado y separado sobre un gel electroforético) con una sonda específica para

una región diana. La comparación de la intensidad de la señal de hibridación de la sonda para la región diana con la señal de la sonda de control del análisis de ADN genómico normal (por ejemplo, una porción no amplificada de la misma célula, tejido, órgano, etc., o relacionado) proporciona un cálculo estimado del número de copias relativo del ácido nucleico diana. Un nivel de intensidad que es superior al control es indicativo de una secuencia amplificada.

5 También puede usarse hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) para determinar el número de copias de un gen. FISH es conocido para aquellos expertos en la técnica (véase Angerer, 1987 Meth. Enzymol., 152: 649). En un ensayo de hibridación *in situ* típico, las células o secciones de tejido se fijan a un soporte sólido, normalmente un portaobjetos de vidrio. Si un ácido nucleico va a sondarse, las células normalmente se desnaturalizan con calor o álcali. Las células se ponen entonces en contacto con una disolución de hibridación a una temperatura moderada para permitir la hibridación de las sondas marcadas específicas para la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína. Las dianas (por ejemplo, células) se lavan normalmente a continuación a una rigurosidad predeterminada o a una rigurosidad creciente hasta que se obtiene una relación apropiada de señal con respecto a ruido. Las sondas usadas en tales aplicaciones normalmente se marcan, por ejemplo, con radioisótopos o indicadores fluorescentes. Las sondas preferidas son suficientemente largas, por ejemplo, de aproximadamente 50, 100 o 200 nucleótidos a aproximadamente 1000 o más nucleótidos, para permitir la hibridación específica con el (los) ácido(s) nucleico(s) diana(s) bajo condiciones rigurosas. En algunas aplicaciones es necesario bloquear la capacidad de hibridación de secuencias repetitivas. Así, en algunas realizaciones, se usa ARNt, ADN genómico humano o ADN de Cot-1 para bloquear la hibridación no específica.

También puede usarse hibridación genómica comparativa (CGH) para determinar el número de copias de genes. En los procedimientos de hibridación genómica comparativa, un conjunto "de prueba" de ácidos nucleicos (por ejemplo, de un posible tumor) se marca con una primera marca, mientras que un segundo conjunto (por ejemplo, de una célula normal o tejido) se marca con una segunda marca. La relación de hibridación de los ácidos nucleicos se determina por la relación de la primera y segunda marcas que se unen a cada fibra en una matriz. Se detectan las diferencias en la relación de las señales de las dos marcas, por ejemplo, debido a amplificación génica en el conjunto de prueba, y la relación proporciona una medida del número de copias de genes, correspondiente a la sonda específica usada. Puede generarse una representación citogenética de la variación del número de copias de ADN por CGH, que proporciona relaciones de fluorescencia a lo largo de la longitud de cromosomas de ADN genómicos de prueba y de referencia diferencialmente marcados.

También pueden analizarse números de copias de ADN mediante plataformas basadas en micromatrices. Detalles de diversos procedimientos de micromatrices pueden encontrarse en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.232.068; Pollack y col., Nat. Genet., 23(1):41-6, (1999), Pastinen (1997) Genome Res. 7: 606-614; Jackson (1996) Nature Biotechnology 14:1685; Chee (1995) Science 274: 610; documento WO 96/17958, Pinkel y col. (1998) Nature Genetics 20: 207-211 y otros.

El ADN usado para preparar una matriz no es crítico. Por ejemplo, las matrices pueden incluir ADN genómico, por ejemplo, clones que se solapan que proporcionan un barrido de alta resolución de una porción del genoma que contiene el gen deseado, o del propio gen. Pueden obtenerse ácidos nucleicos genómicos a partir, por ejemplo, de HAC, MAC, YAC, BAC, PAC, PI, cósmidos, plásmidos, productos de PCR de inter-Alu de clones genómicos, digestos de restricción de clones genómicos, clones de ADNc, productos de amplificación (por ejemplo, PCR), y similares. También pueden producirse matrices usando tecnología de síntesis de oligonucleótidos. Así, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.143.854 y las publicaciones de patente PCT n.º WO 90/15070 y WO 92/10092 enseñan cada una el uso de síntesis combinatoria dirigida por luz de matrices de oligonucleótidos de alta densidad.

Protocolos de hibridación adecuados para su uso con procedimientos de micromatrices se describen, por ejemplo, en Albertson (1984) EMBO J. 3:1227-1234; Pinkel (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9138-9142; publicación EPO n.º 430.402; Methods in Molecular Biology, vol. 33: *In Situ* Hybridization Protocols, Choo, ed., Humana Press, Totowa, N.J. (1994), Pinkel y col. (1998) Nature Genetics 20: 207-211, o de Kallioniemi (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5321-5325 (1992), etc.

La sensibilidad de los ensayos de hibridación puede potenciarse mediante el uso de un sistema de amplificación de ácidos nucleicos que multiplica el ácido nucleico diana que se detecta. Ejemplos de tales sistemas incluyen el sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el sistema de reacción en cadena de la ligasa (LCR). Otros procedimientos recientemente descritos en la técnica son los sistemas de amplificación basados en secuencias de ácidos nucleicos (NASBAO, Cangene, Mississauga, Ontario) y Q Beta replicasa.

Niveles de expresión

La detección de mutaciones activantes o amplificaciones génicas en ErbB y/o MET también puede detectarse analizando niveles de expresión de ErbB y/o de MET que incluyen niveles de expresión de ARN y niveles de expresión de proteínas. El análisis de niveles de expresión de ARN puede implicar la determinación de uno o más productos transcripcionales tales como ARN_h, ARN_m, y/o una o más variantes cortadas y empalmadas de un ARN_m. También pueden medirse diversos productos de proteína para determinar niveles de expresión que incluyen, por ejemplo, proteínas, variantes de

proteína que se producen a partir de variantes de ARNm cortadas y empalmadas y proteínas postraduccionalmente modificadas.

Expresión de ARN

5 Puede usarse cualquier medio adecuado de medición de niveles de expresión de productos de ARN según los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, los procedimientos pueden utilizar una variedad de polinucleótidos que se hibridan específicamente con uno o más productos de ARN de ErbB y/o MET que incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos, ADNc, ADN, ARN, productos de PCR, ADN sintético, ARN sintético, u otras combinaciones de nucleótidos modificados que se producen naturalmente que se hibridan específicamente con uno o más productos de ARN de ErbB y/o MET. Tales polinucleótidos pueden usarse en combinación con los procedimientos para medir la expresión de ARN descrita adicionalmente en el presente documento que incluye, por ejemplo, hibridación de matrices, RT-PCR, protección de nucleasa y transferencias Northern.

15 En ciertas realizaciones, puede usarse hibridación de matrices para evaluar los niveles de expresión de ARN de ErbB y/o MET. La hibridación de matrices utiliza miembros de ácido nucleico establemente asociados a un soporte que pueden hibridarse con productos de expresión de ARN de ErbB y/o MET. La longitud de un miembro de ácido nucleico unido a la matriz puede oscilar de 8 a 1000 nucleótidos de longitud y se eligen de manera que sean específicos para los productos de ARN de ErbB y/o MET. La matriz puede comprender, por ejemplo, uno o más miembros de ácido nucleico que son específicos para ErbB y/o MET, o variantes de los mismos (por ejemplo, variantes de corte y empalme), que incluyen, por ejemplo, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4 y MET, y ligandos de cualquiera de los anteriores, tales como, por ejemplo, ligandos de ErbB (por ejemplo, EGF, TGF α , AR, BTC, HB-EPR, NRG1, NRG2, NRG3 o NRG4) o un ligando de MET (por ejemplo, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)). Los miembros de ácido nucleico pueden ser ARN o ADN, mono o bicatenario, y/o pueden ser oligonucleótidos o fragmentos de PCR amplificados de ADNc. Preferentemente, los oligonucleótidos tienen aproximadamente 10-100, 10-50, 20-50 o 20-30 nucleótidos de longitud. Las porciones de las regiones expresadas de ErbB y/o MET pueden utilizarse como sondas sobre la matriz. Más particularmente, los oligonucleótidos complementarios a genes ErbB y/o MET y o ADNc derivados de los genes ErbB y/o MET son útiles. Para matrices basadas en oligonucleótidos, la selección de oligonucleótidos correspondientes al gen de interés que son útiles como sondas está bien entendida en la técnica. Más particularmente, es importante elegir regiones que permitirán la hibridación con los ácidos nucleicos diana. Factores tales como la Tm del oligonucleótido, el porcentaje de contenido de GC, el grado de estructura secundaria y la longitud de ácido nucleico son factores importantes. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.551.784.

30 Las matrices pueden construirse, pedirse personalizadas o comprarse de un proveedor comercial. Diversos procedimientos para construir matrices son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, procedimientos y técnicas aplicables a la síntesis de oligonucleótidos sobre un soporte sólido, por ejemplo, en un formato de matriz, se han descrito, por ejemplo, en el documento WO 00/58516, las patentes de EE. UU. n.º 5.143.854, 5.242.974, 5.252.743, 5.324.633, 5.384.261, 5.405.783, 5.424.186, 5.451.683, 5.482.867, 5.491.074, 5.527.681, 5.550.215, 5.571.639, 5.578.832, 5.593.839, 5.599.695, 5.624.711, 5.631.734, 5.795.716, 5.831.070, 5.837.832, 5.856.101, 5.858.659, 5.936.324, 5.968.740, 5.974.164, 5.981.185, 5.981.956, 6.025.601, 6.033.860, 6.040.193, 6.090.555, 6.136.269, 6.269.846 y 6.428.752 y Zhou y col., Nucleic Acids Res. 32: 5409-5417 (2004).

40 En una realización a modo de ejemplo, la construcción y/o oligonucleótidos de selección pueden sintetizarse sobre un soporte sólido usando sintetizador de matrices sin máscara (MAS). Los sintetizadores de matrices sin máscara se describen, por ejemplo, en la solicitud PCT n.º WO 99/42813 y en la correspondiente patente de EE. UU. n.º 6.375.903. Otros procedimientos para construir matrices incluyen, por ejemplo, procedimientos de luz dirigida que utilizan máscaras (por ejemplo, procedimientos VLSIPS™ descritos, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.143.854, 5.510.270 y 5.527.681), procedimientos de canales de flujo (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.384.261), procedimientos de manchas (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.807.522), procedimientos basados en agujas (véase por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.288.514) y procedimientos que utilizan múltiples soportes (véanse, por ejemplo, patentes de EE. UU. n.º 5.770.358, 5.639.603 y 5.541.061).

50 En ciertas realizaciones, una matriz de miembros de ácido nucleico establemente asociada a la superficie de un soporte se pone en contacto con una muestra que comprende ácidos nucleicos diana bajo condiciones de hibridación suficientes para producir un patrón de hibridación de miembros de ácido nucleico/complejos diana complementarios en los que uno o más miembros de ácido nucleico complementarios en posiciones únicas sobre la matriz se hibridan específicamente con ácidos nucleicos diana. La identidad de los ácidos nucleicos diana que se hibridan puede determinarse con referencia a la localización de miembros de ácido nucleico sobre la matriz.

55 Los miembros de ácido nucleico de control pueden estar presentes sobre la matriz que incluye miembros de ácido nucleico que comprenden oligonucleótidos o ácidos nucleicos correspondientes a ADN genómico, genes de mantenimiento, secuencias de vectores, genes de control negativo y positivo, y similares. Los miembros de ácido nucleico de control son genes de calibración o de control cuya función no es decir si un gen particular de interés se expresa, sino

proporcionar otra información útil, tal como el nivel de expresión de referencia o basal.

Pueden usarse otros ácidos nucleicos de control sobre la matriz como ácidos nucleicos de control de la expresión diana y nucleótidos de control del desapareamiento para monitorizar la unión no específica o hibridación cruzada con un ácido nucleico en la muestra distinto de la diana a la que se dirige la sonda. Así, las sondas de desapareamiento indican si una hibridación es específica o no. Por ejemplo, si la diana está presente, las sondas perfectamente apareadas deben ser coherentemente más brillantes que las sondas desapareadas. Además, si todos los desapareamientos de control están presentes, se usan sondas de desapareamiento para detectar una mutación.

Una matriz proporcionada en el presente documento puede comprender un sustrato suficiente para proporcionar soporte y estructura física a los ácidos nucleicos asociados presentes sobre ella bajo las condiciones de ensayo en las que la matriz se emplea, particularmente bajo condiciones de manipulación de alto rendimiento.

El sustrato puede ser biológico, no biológico, orgánico, inorgánico, o una combinación de cualquiera de estos, existiendo como partículas, hebras, precipitados, geles, hojas, tubos, esferas, perlas, recipientes, capilares, almohadillas, rebanadas, películas, placas, portaobjetos, chips, etc. El sustrato puede tener cualquier forma conveniente, tal como un disco, cuadrado, esfera, círculo, etc. El sustrato es preferentemente plano o planar, pero puede adoptar una variedad de configuraciones superficiales alternativas. El sustrato puede ser una película de Langmuir-Blodgett polimerizada, vidrio funcionalizado, Si, Ge, GaAs, GaP, SiO₂, SiN₄, silicio modificado, o uno cualquiera de una amplia variedad de geles o polímeros tales como (poli)tetrafluoroetileno, (poli)difluoruro de vinilideno, poliestireno, policarbonato, o combinaciones de los mismos. Otros materiales de sustrato serán rápidamente evidentes para aquellos expertos en la técnica en vista de la presente divulgación.

En ciertas realizaciones, una muestra de ácido nucleico diana puede comprender ARNm total o una muestra de ácido nucleico correspondiente al ARNm (por ejemplo, ADNc) aislado de una muestra biológica. El ARNm total puede aislarse de una muestra dada usando, por ejemplo, un procedimiento de extracción ácida con guanidinio-fenol-cloroformo y puede aislarse poliA+ARNm usando cromatografía en columna de oligo dT o usando perlas magnéticas (dT)_n (véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989), o *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel y col., ed. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987)). En ciertas realizaciones, el ARN total puede extraerse usando el reactivo TRIzol™ (GIBCO/BRL, Invitrogen Life Technologies, Cat. n.º 15596). La pureza e integridad del ARN puede evaluarse por absorbancia a 260/280 nm y electroforesis en gel de agarosa seguido de inspección bajo luz ultravioleta.

En ciertas realizaciones, puede desearse amplificar la muestra de ácido nucleico diana antes de la hibridación. Un experto en la técnica apreciará que, sea cual sea el procedimiento de amplificación que se use, si se desea un resultado cuantitativo, debe tenerse cuidado en usar un procedimiento que mantenga o controle las frecuencias relativas de los ácidos nucleicos amplificados. Los procedimientos de amplificación cuantitativa son muy conocidos para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, la PCR cuantitativa implica co-amplificar simultáneamente una cantidad conocida de una secuencia de control usando los mismos cebadores. Esto proporciona un patrón interno que puede usarse para calibrar la reacción de PCR. La matriz de alta densidad puede entonces incluir sondas específicas para el patrón interno para la cuantificación del ácido nucleico amplificado. Protocolos detallados para la PCR cuantitativa se proporcionan en *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Innis y col., Academic Press, Inc. N.Y., (1990).

En ciertas realizaciones, el ARNm de muestra del ácido nucleico diana se transcribe de forma inversa con una transcriptasa inversa y un cebador que consiste en oligo dT y una secuencia que codifica el promotor del fago T7 para proporcionar molde de ADN monocatenario. La segunda hebra de ADN se polimeriza usando una ADN polimerasa. Después de la síntesis de ADNc bicatenario, se añade ARN polimerasa T7 y el ARN se transcribe del molde de ADNc. Rondas de transcripción sucesivas de cada molde de ADNc individual producen ARN amplificado. Los procedimientos de transcripción *in vitro* son muy conocidos para aquellos expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, arriba) y este procedimiento particular se describe en detalle por Van Gelder, y col., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1663-1667, que demuestran que la amplificación *in vitro* según este procedimiento preserva las frecuencias relativas de los diversos transcritos de ARN. Además, Eberwine y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3010-3014, proporcionan un protocolo que usa dos rondas de amplificación mediante transcripción *in vitro* para lograr una amplificación superior a 10⁶ veces del material de partida original, permitiendo así monitorizar la expresión incluso cuando las muestras biológicas están limitadas.

Marcas detectables adecuadas para su uso según los procedimientos descritos en el presente documento incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Marcas útiles incluyen botina para la tinción con conjugado de estreptavidina marcado, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, Texas Red, rodamina, proteína verde fluorescente y similares), radiomarcas (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras comúnmente usadas en un ELISA) y marcas colorimétricas tales como oro coloidal o perlas de vidrio coloreado o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Las patentes

que enseñan el uso de tales marcas incluyen las patentes de EE. UU. n.º 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241.

Medios de detección de tales marcas son muy conocidos para aquellos expertos en la técnica. Así, por ejemplo, pueden detectarse radiomarcas usando película fotográfica o contadores de centelleo, pueden detectarse marcadores fluorescentes usando un fotodetector para detectar luz emitida. Las marcas enzimáticas normalmente se detectan proveyendo la enzima de un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y se detectan marcas colorimétricas visualizando simplemente la marca coloreada.

Las marcas pueden incorporarse por cualquiera de varios medios muy conocidos para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, la marca puede incorporarse simultáneamente durante la etapa de amplificación en la preparación de los ácidos nucleicos de muestra. Así, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores marcados o nucleótidos marcados proporcionará un producto de amplificación marcado. Adicionalmente, la amplificación por transcripción, como se ha descrito anteriormente, usando un nucleótido marcado (por ejemplo UTP y/o CTP marcados con fluoresceína) incorpora una marca en los ácidos nucleicos transcritos.

Alternativamente, una marca puede añadirse directamente a la muestra de ácido nucleico original (por ejemplo, ARNm, ARNm de poliA, ADNc, etc.) o al producto de amplificación después de completarse la amplificación. Medios de unión de las marcas a ácidos nucleicos son muy conocidos para aquellos expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, traducción de muescas o marcado de extremos (por ejemplo, con un ARN marcado) por reacción con cinasa del ácido nucleico y posterior unión (ligación) de un conector de ácidos nucleicos que une el ácido nucleico de muestra con una marca (por ejemplo, un fluoróforo).

En ciertas realizaciones, las modificaciones fluorescentes son por colorantes de cianina, por ejemplo, Cy-3/Cy-5 dUTP, Cy-3/Cy-5 dCTP (Amersham Pharmacia) o colorantes Alexa (Khan y col., 1998, Cancer Res. 58:5009-5013).

En ciertas realizaciones, puede desearse hibridar simultáneamente dos muestras de ácido nucleico diana con la matriz, que incluye, por ejemplo, un muestra de ácido nucleico diana de un sujeto (por ejemplo, un sujeto que tiene o está en riesgo de tener cáncer u otro trastorno hiperproliferativo) y una muestra de ácido nucleico de control (por ejemplo, un individuo sano). En otra realización, una muestra de ácido nucleico diana puede obtenerse de un tumor u otro crecimiento canceroso de un sujeto, mientras que la segunda muestra de ácido nucleico diana puede obtenerse de material biológico sano del mismo sujeto. Las dos muestras diana usadas para la comparación se marcan con diferentes colorantes fluorescentes que producen señales de detección distinguibles, por ejemplo, dianas de una muestra de control se marcan con Cy5 y dianas de un sujeto que va a monitorizarse o diagnosticarse se marcan con Cy3. Las muestras diana marcadas de forma diferente se hibridan con la misma micromatriz simultáneamente. Las dianas marcadas pueden purificarse usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, por purificación con etanol o purificación en columna.

En ciertas realizaciones, las muestras de ácido nucleico diana incluirán una o más moléculas de control que se hibridan para controlar sondas sobre la micromatriz para normalizar señales generadas de la micromatriz. Las dianas de normalización marcadas pueden ser, por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos que son perfectamente complementarias para controlar oligonucleótidos que están aplicados en puntos sobre la micromatriz como se ha descrito anteriormente. Las señales obtenidas de los controles de normalización después de la hibridación proporcionan un control para variaciones en condiciones de hibridación, intensidad de la marca, eficiencia de lectura y otros factores que pueden hacer que varíe la señal de una hibridación perfecta entre matrices. Las señales (por ejemplo, intensidad de fluorescencia) leídas de todas las otras sondas en la matriz pueden dividirse entre la señal (por ejemplo, intensidad de fluorescencia) de las sondas de control, normalizando así las mediciones.

Las dianas de normalización pueden seleccionarse para reflejar la longitud promedio de las otras dianas presentes en la muestra o pueden seleccionarse para cubrir un intervalo de longitudes. El (Los) control(es) de normalización también puede(n) seleccionarse para reflejar la composición de bases (promedio) de las otras sondas en la matriz. En ciertas realizaciones, solo se usan una o algunas sondas de normalización y están seleccionadas de forma que se hibriden bien (es decir, no tienen estructura secundaria y no se auto-hibridan) y no se apareen con ninguna molécula diana. Las sondas de normalización pueden estar localizadas en cualquier posición en la matriz o en múltiples posiciones en toda la matriz para controlar la variación espacial en la eficiencia de hibridación. Por ejemplo, los controles de normalización pueden localizarse en las esquinas o bordes de la matriz, además de en el centro.

La hibridación de ácidos nucleicos con una matriz implica incubar una sonda desnaturalizada o miembro de ácido nucleico diana sobre una matriz y una muestra de ácido nucleico diana en condiciones en las que la sonda o miembro de ácido nucleico diana y su diana complementaria puedan formar dúplex híbridos estables mediante apareamiento de bases complementarias. Los ácidos nucleicos que no forman dúplex híbridos se lavan entonces dejando los ácidos nucleicos hibridados que van a detectarse, normalmente mediante la detección de una marca detectable unida. Se reconoce generalmente que los ácidos nucleicos se desnaturalizan aumentando la temperatura o disminuyendo la concentración de sales del tampón que contienen los ácidos nucleicos. Bajo condiciones de baja rigurosidad (por ejemplo, baja temperatura

y/o alta sal), los dúplex híbridos (por ejemplo, ADN:ADN, ARN:ARN o ARN:ADN) se formarán incluso si las secuencias hibridadas no son perfectamente complementarias. Así, la especificidad de hibridación se reduce a menor rigurosidad. En cambio, a mayor rigurosidad (por ejemplo, mayor temperatura o menor sal), la hibridación satisfactoria requiere menos desapareamientos. Los procedimientos de optimización de condiciones de hibridación son muy conocidos para aquellos expertos en la técnica (véase, por ejemplo, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 24: *Hybridization With Nucleic acid Probes*, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y., (1993)).

Tras la hibridación, los ácidos nucleicos marcados o no marcados no hibridados se eliminan de la superficie del soporte lavando, generando así un patrón de ácido nucleico diana hibridado sobre la superficie del sustrato. Una variedad de disoluciones de lavado son conocidas para aquellos expertos en la técnica y pueden usarse. Los patrones de hibridación resultantes de oligonucleótidos y/o ácidos nucleicos hibridados marcados pueden visualizarse o detectarse en una variedad de formas, siendo el modo particular de detección elegido basándose en la marca particular de la muestra de ácido nucleico diana, en la que medios de detección representativos incluyen recuento por centelleo, autorradiografía, medición de fluorescencia, medición calorimétrica, medición de emisión de luz y similares.

Tras la etapa de hibridación, lavado y/o tratamientos posteriores, se detecta el patrón de hibridación resultante. En la detección o visualización del patrón de hibridación, el valor de intensidad o de señal de la marca no solo se detectará, sino que se cuantificará, por ejemplo, la señal de cada mancha sobre la matriz hibridada se medirá y comparará con un valor unitario correspondiente a la señal emitida por un número conocido de ácidos nucleicos diana marcados en el extremo para obtener una cifra o valor absoluto del número de copias de cada diana marcada en los extremos que se hibrida con una mancha particular sobre la matriz en el patrón de hibridación.

Los procedimientos de análisis de los datos recogidos de las hibridaciones en matriz son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, si la detección de la hibridación implica una marca fluorescente, el análisis de datos puede incluir las etapas de determinar la intensidad fluorescente en función de la posición del sustrato a partir de los datos recogidos, eliminando valores atípicos, es decir, datos que se desvían de una distribución estadística predeterminada, y calcular la afinidad de unión relativa de los ácidos nucleicos de prueba de los restantes datos. Los datos resultantes se muestran como una imagen con la intensidad en cada región variando según la afinidad de unión entre oligonucleótidos y/o ácidos nucleicos asociados y los ácidos nucleicos de prueba.

En ciertas realizaciones, pueden medirse niveles de expresión de productos de ARN de ErbB y/o MET amplificando los productos de ARN a partir de una muestra usando transcripción inversa (RT) en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En ciertas realizaciones, la RT puede ser cuantitativa como entendería un experto en la técnica.

Puede usarse ARN total, o ARNm de una muestra, como molde y se usa un cebador específico para la porción transcrita de una RTK para iniciar la transcripción inversa. Los procedimientos de transcripción inversa de ARN en ADNc son muy conocidos y se describen, por ejemplo, en Sambrook y col., 1989, arriba. El diseño de cebadores puede llevarse a cabo utilizando software comercialmente disponible (por ejemplo, Primer Designer 1.0, Scientific Software etc.) o procedimientos que son convencionales y muy conocidos en la técnica. Los programas Primer Software que pueden usarse para ayudar en el diseño y la selección de cebadores incluyen, por ejemplo, The Primer Quest software que está disponible mediante el siguiente enlace al sitio web: biotools.idtdna.com/primerquest/. Adicionalmente, los siguientes enlaces a sitios web son útiles cuando se busca y actualiza información de secuencias de Human Genome Database para su uso en el diseño de cebadores por RTK: 1) la página de inicio de NCBI LocusLink: [malla mundial en ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/](http://malla.mundial.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/), y 2) navegador de Ensemble Human Genome: [malla mundial en ensembl.org/Homo_sapiens](http://malla.mundial.ensembl.org/Homo_sapiens), preferentemente usando información de RTK pertinente tal como Descripción del gen o secuencia, ID de acceso o de la secuencia, símbolo génico, RefSeq # y/o UniGene #.

Pautas generales para diseñar cebadores que pueden usarse según los procedimientos descritos en el presente documento incluyen las siguientes: la longitud del producto o amplicón puede ser ~100-150 bases, la T_m óptima puede ser ~60 °C, o aproximadamente 58-62 °C, y el contenido de GC puede ser ~50 %, o aproximadamente 45-55 %. Adicionalmente, puede desearse evitar ciertas secuencias tales como una o más de las siguientes: (i) tiras de tres o más bases en el extremo 3' de cada cebador que son complementarias a otra parte del mismo cebador o a otro cebador con el fin de reducir la formación de cebador-dímero, (ii) secuencias dentro de un cebador que son complementarias a otra secuencia de cebador, (iii) giros de 3 o más G o C en el extremo 3', (iv) repeticiones de una única base superiores a 3 bases, (v) distribuciones no equilibradas de dominios ricos en G/C y A/T, y/o (vi) una T en el extremo 3'.

El producto de la transcripción inversa se usa posteriormente como molde para la PCR. La PCR proporciona un procedimiento para amplificar rápidamente una secuencia de ácidos nucleicos particular usando múltiples ciclos de replicación de ADN catalizada por una ADN polimerasa dependiente de ADN termostable para amplificar la secuencia diana de interés. La PCR requiere la presencia de un ácido nucleico que va a amplificarse, dos cebadores de oligonucleótidos monocatenarios que flanquean la secuencia que va a amplificarse, una ADN polimerasa, trifosfatos de desoxirribonucleósido, un tampón y sales. El procedimiento de PCR es muy conocido en la técnica. La PCR se realiza como se describen en Mullis y Faloona, 1987, *Methods Enzymol.*, 155: 335.

También puede realizarse QRT-PCR, que es de naturaleza cuantitativa, para proporcionar una medida cuantitativa de los niveles de expresión génica de RTK. En QRT-PCR, la transcripción inversa y la PCR puede realizarse en dos etapas, o la transcripción inversa combinada con la PCR puede realizarse simultáneamente. Una de estas técnicas, para la que están comercialmente disponibles kits tales como TaqMan™ (Perkin Elmer, Foster City, CA), se realiza con una sonda antisentido específica de transcrito. Esta sonda es específica para el producto de PCR (por ejemplo, un fragmento de ácido nucleico derivado de un gen) y se prepara con una sonda extintora e indicadora fluorescente complejada con el extremo 5' del oligonucleótido. Diferentes marcadores fluorescentes están unidos a diferentes indicadores, permitiendo la medición de dos productos en una reacción. Cuando se activa la Taq ADN polimerasa, escinde los indicadores fluorescentes de la sonda unidos al molde en virtud de su actividad de exonucleasa de 5' a 3'. En ausencia de los extintores, los indicadores fluorescen ahora. El cambio de color en los indicadores es proporcional a la cantidad de cada producto específico y se mide por un fluorímetro; por tanto, la cantidad de cada color se mide y se cuantifica el producto de PCR. Las reacciones de PCR se realizan en placas de 96 pocillos de manera que muestras derivadas de muchos individuos se procesan y se miden simultáneamente. El sistema TaqMan™ tiene la ventaja adicional de no requerir electroforesis en gel y permite la cuantificación cuando se usa con una curva patrón.

Una segunda técnica útil para detectar productos de PCR cuantitativamente es usar un colorante intercalante tal como el QuantiTect SYBR Green PCR comercialmente disponible (Qiagen, Valencia Calif.). La RT-PCR se realiza usando SYBR verde como marca fluorescente que se incorpora en el producto de PCR durante la etapa de PCR y produce una fluorescencia proporcional a la cantidad de producto de PCR. Adicionalmente, son conocidos otros sistemas para medir cuantitativamente productos de expresión de ARNm que incluyen Molecular Beacons™.

Técnicas adicionales para medir cuantitativamente la expresión de ARN incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la ligasa, Qbeta replicasa (véase, por ejemplo, solicitud internacional n.º PCT/US87/00880), procedimiento de amplificación isotérmica (véase, por ejemplo, Walker y col. (1992) PNAS 89:382-396), amplificación por desplazamiento de hebras (SDA), reacción de reparación de cadenas, PCR cuantitativa asimétrica (véase, por ejemplo, la publicación de EE. UU. n.º US200330134307A1) y el ensayo de perlas de microesferas múltiple descrito en Fuja y col., 2004, Journal of Biotechnology 108:193-205.

El nivel de expresión génica puede medirse amplificando ARN de una muestra usando sistemas de amplificación basados en transcripción (TAS), que incluyen la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) y 3SR. Véanse, por ejemplo, Kwoh y col. (1989) PNAS USA 86:1173; publicación internacional n.º WO 88/10315; y la patente de EE. UU. n.º 6.329.179. En NASBA, los ácidos nucleicos pueden prepararse para la amplificación usando extracción convencional con fenol/cloroformo, desnaturalización térmica, tratamiento con tampón de lisis y columnas MiniSpin para el aislamiento de ADN y ARN o extracción con cloruro de guanidinio de ARN. Estas técnicas de amplificación implican hibridar una sonda que tiene secuencias específicas de diana. Tras la polimerización, los híbridos de ADN/ARN se digieren con RNasa H mientras que las moléculas de ADN bicatenarias se desnaturalizan por calor de nuevo. En cualquier caso, el ADN monocatenario se hace completamente bicatenario mediante la adición del segundo cebador específico de diana, seguido de polimerización. A continuación, las moléculas de ADN bicatenario se transcriben múltiplemente por una polimerasa tal como T7 o SP6. En una reacción cíclica isotérmica, los ARN se transcriben de forma inversa en ADN bicatenario, y se transcriben una vez con una polimerasa tal como T7 o SP6. Los productos resultantes, tanto truncados como completos, indican secuencias específicas de diana.

Pueden usarse varias técnicas para separar productos de amplificación. Por ejemplo, los productos de amplificación pueden separarse por electroforesis en gel de agarosa, agarosa-acrilamida o de poli(acrilamida) usando procedimientos convencionales. Véase Sambrook y col., 1989. También pueden usarse varias técnicas para detectar productos de PCR cuantitativamente sin electroforesis (véase, por ejemplo, PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis y col., Academic Press, Inc. N.Y., (1990)). Por ejemplo, pueden emplearse técnicas cromatográficas para efectuar la separación. Hay muchos tipos de cromatografía que pueden usarse: adsorción, reparto, intercambio iónico y tamiz molecular, HPLC, y muchas técnicas especializadas para usarlas que incluyen cromatografía en columna, papel, capa fina y de gases (Freifelder, Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology, 2ª ed., Wm. Freeman and Co., New York, N.Y., 1982).

Los productos de amplificación deben visualizarse con el fin de confirmar la amplificación de las secuencias de ácidos nucleicos de interés. Un procedimiento de visualización típico implica la tinción de un gel con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV. Alternativamente, si los productos de amplificación están íntegramente marcados con nucleótidos radio-marcados o fluorométricamente marcados, los productos de amplificación pueden entonces exponerse a película de rayos X o visualizarse bajo espectros estimulantes apropiados, tras la separación.

Alternativamente, la visualización puede lograrse indirectamente. Tras la separación de los productos de amplificación, una sonda de ácido nucleico marcada se pone en contacto con la secuencia de ácidos nucleicos amplificada de interés. La sonda puede conjugarse con un cromóforo, radiomarcarse o conjugarse con un componente de unión, tal como un anticuerpo o biotina, en la que el otro miembro del par de unión lleva un resto detectable.

Adicionalmente, la detección puede llevarse a cabo usando transferencia Southern e hibridación con una sonda marcada. Las técnicas que participan en la transferencia Southern son muy conocidas para aquellos expertos en la técnica y pueden encontrarse en muchos libros estándar sobre protocolos moleculares. Véase Sambrook y col., 1989, arriba.

5 Brevemente, se separan productos de amplificación por electroforesis en gel. El gel se pone entonces en contacto con una membrana, tal como nitrocelulosa, permitiendo la transferencia del ácido nucleico y la unión no covalente. Posteriormente, la membrana se incuba con una sonda conjugada con cromóforo que puede hibridarse con un producto de amplificación diana. La detección es por exposición de la membrana a película de rayos X o dispositivos de detección emisores de iones.

10 En ciertas realizaciones, pueden usarse ensayos de protección de nucleasa (incluyendo tanto ensayos de protección de ribonucleasa como ensayos de nucleasa S1) para detectar y cuantificar productos de ARN de ErbB y/o MET. En los ensayos de protección de nucleasa, una sonda antisentido (por ejemplo, radiomarcada o marcada no isotópicamente) se hibrida en disolución con una muestra de ARN. Tras la hibridación, la sonda no hibridada monocatenaria y el ARN se degradan por nucleasas. Se usa un gel de acrilamida para separar los restantes fragmentos protegidos. Normalmente, la hibridación en disolución puede acomodar hasta ~100 µg de ARN de muestra mientras que las hibridaciones por 15 transferencia solo pueden acomodar ~20-30 µg de muestra de ARN.

El ensayo de protección de ribonucleasa, que es el tipo más común de ensayos de protección de nucleasa, requiere el uso de sondas de ARN. Los oligonucleótidos y otras sondas de ADN monocatenario solo pueden usarse en ensayos que contienen nucleasa S1. La sonda antisentido monocatenaria debe normalmente ser completamente homóloga al ARN diana para prevenir la escisión del híbrido de sonda:diana por nucleasa.

20 En ciertas realizaciones, puede usarse un ensayo de transferencia Northern para determinar un tamaño de transcrito de ARN, identificar transcritos de ARN alternativamente cortados y empalmados, y las cantidades relativas de productos de ARN de los genes ErbB y/o MET. En transferencias Northern, muestras de ARN se separan primero por tamaño mediante electroforesis en un gel de agarosa bajo condiciones desnaturalizantes. A continuación, el ARN se transfiere a una membrana, se reticula y se hibrida con una sonda marcada. Pueden usarse sondas no isotópicas o radiomarcadas con 25 alta actividad específica que incluyen sondas de ADN aleatoriamente cebadas, traducidas por mellas o generadas por PCR, sondas de ARN transcritas *in vitro* y oligonucleótidos. Adicionalmente, pueden usarse secuencias con solo homología parcial (por ejemplo, ADNc de una especie diferente o fragmentos genómicos de ADN que podrían contener un exón) como sondas. La sonda marcada, por ejemplo, un ADNc radiomarcado, que tanto contiene el ADN monocatenario de longitud completa como un fragmento de esa secuencia de ADN, puede ser de cualquier longitud hasta al menos 20, al 30 menos 30, al menos 50, o al menos 100 nucleótidos consecutivos de longitud. La sonda puede marcarse por cualquiera de los muchos procedimientos diferentes conocidos para aquellos expertos en esta técnica. Las marcas más comúnmente empleadas para estos estudios son elementos radiactivos, enzimas, sustancias químicas que fluorescen cuando se exponen a la luz ultravioleta, y otros. Se conocen varios materiales fluorescentes y pueden utilizarse como marcas. Estos incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, auramina, Texas Red, azul AMCA y Lucifer Yellow.

35 Un material de detección particular es anticuerpo anti-conejo preparado en cabras y conjugado con fluoresceína mediante un isotiocianato. Ejemplos no limitantes de isótopos incluyen ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I y ¹⁸⁶Re. Las marcas de enzima son asimismo útiles, y pueden detectarse por cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas presentemente utilizadas. La enzima puede conjugarse con la sonda seleccionada mediante reacción con moléculas de puente tales como carbodiimidas, 40 diisocianatos, glutaraldehído y similares. Puede utilizarse cualquier enzima conocida para un experto en la técnica, que incluye, por ejemplo, peroxidasa, beta-D-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa más peroxidasa y fosfatasa alcalina. Las patentes de EE. UU. n.º 3.654.090, 3.850.752 y 4.016.043 se citan a modo de ejemplo para su divulgación de material de marcado alternativo y procedimientos.

Expresión de proteínas

45 También pueden detectarse mutaciones activantes o amplificaciones génicas examinando niveles de expresión de proteína ErbB y/o MET. Cualquier técnica reconocida en la técnica para medir niveles de expresión de proteína puede incluir, por ejemplo, electroforesis en gel (incluyendo electroforesis en gel 2-D), espectrometría de masas y unión a anticuerpo. El procedimiento preferido para ensayar niveles de proteína en una muestra biológica incluye técnicas basadas en anticuerpos, tales como inmunotransferencia (transferencia Western), ensayos inmunohistológicos, 50 enzimoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayos (RIA) o chips de proteína. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos monoclonales específicos de ErbB y/o MET tanto como un inmunoabsorbente como una sonda marcada con enzima para detectar y cuantificar ErbB y/o MET. La cantidad de ErbB y/o MET presente en la muestra puede calcularse por referencia a la cantidad presente en una preparación estándar usando un algoritmo informático de regresión lineal. En otra realización, ErbB y/o MET pueden inmunoprecipitarse de una muestra biológica usando un anticuerpo específico para 55 una proteína ErbB y/o MET. Las proteínas aisladas pueden entonces migrarse sobre un gel de SDS-PAGE y transferirse (por ejemplo, a nitrocelulosa u otro material adecuado) usando procedimientos convencionales. La transferencia puede entonces sondarse con un anticuerpo anti-ErbB y/o anti-MET específico para determinar el nivel de expresión de la proteína ErbB y/o MET.

Pueden llevarse a cabo electroforesis en gel, inmunoprecipitación y espectrometría de masas usando técnicas convencionales, por ejemplo, tales como aquellas descritas en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989), Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988 Cold Spring Harbor Laboratory), G. Suizdak, *Mass Spectrometry for Biotechnology* (Academic Press 1996), además de otras referencias citadas en el presente documento.

Anticuerpos adecuados para el aislamiento y detección de ErbB y/o MET pueden comprarse comercialmente de una variedad de fuentes. Los anticuerpos específicos para ErbB y/o MET también pueden producirse usando técnicas convencionales como se describen adicionalmente en el presente documento (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology and Using Antibodies: A Laboratory Manual*).

10 **Niveles de actividad**

También pueden detectarse mutaciones activantes de ErbB y/o MET o amplificaciones génicas midiendo la actividad de ErbB y/o de MET. Aquellos expertos en la técnica conocen diversos procedimientos para determinar la actividad de ErbB y/o de MET y se describen adicionalmente en el presente documento. Procedimientos a modo de ejemplo para medir la actividad de ErbB y/o de MET incluyen, por ejemplo, examinar uno o más de los siguientes: fosforilación de ErbB y/o de MET, actividad de cinasa de ErbB y/o de MET, o señalización mediada por ErbB y/o MET. La actividad de ErbB y/o de MET puede determinarse en ensayos basados en células, usando un lisado celular, o *in vitro* usando componentes purificados o parcialmente purificados. En una realización, la fosforilación de ErbB y/o de MET puede examinarse usando una matriz de anticuerpos como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.197.599. Matrices de anticuerpos comercialmente disponibles que se unen a una pluralidad de tirosina cinasas del receptor de fosforilación incluyen la matriz de anticuerpos de fosforilación RayBio™ y la matriz fosfo-RTK de R&D Systems.

Activación mediada por ligando

La activación mediada por ligando de ErbB y/o MET puede determinarse usando una variedad de técnicas reconocidas en la técnica que se describen adicionalmente en el presente documento. Por ejemplo, la activación mediada por ligando puede determinarse detectando una amplificación génica del gen del ligando o detectando una mutación activante en el gen del ligando. Anteriormente se han descrito en el presente documento diversos procedimientos para detectar la amplificación génica y mutaciones génicas. En realizaciones alternativas, la activación mediada por ligando de ErbB o MET puede analizarse determinando el nivel de ErbB o actividad de MET cuando un aumento en la actividad de ErbB o de MET está asociado a un aumento en la cantidad de ligando. Procedimientos para determinar la actividad de ErbB y de MET se describen en el presente documento anteriormente. En otras realizaciones, la activación mediada por ligando de ErbB o MET puede determinarse ensayando el nivel de expresión o actividad de proteínas de ligando, por ejemplo, usando análisis inmunohistoquímico, ELISA, o un ensayo de actividad. Los ligandos de ErbB se conocen en la técnica e incluyen EGF, TGF α , AR, BTC, HB-EPR, NRG1, NRG2, NRG3 y NRG4. El factor de crecimiento de hepatocitos o HGF es un ligando para MET.

5. Ensayos, kits y líneas celulares

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para identificar un agente terapéutico anti-MET. En general, los procedimientos implican poner en contacto una célula con una combinación de uno o más agentes terapéuticos anti-ErbB como se define en las reivindicaciones y un compuesto de prueba, por ejemplo, un agente terapéutico anti-MET candidato. La célula es una célula cancerosa que ha adquirido resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB. La célula también comprende una amplificación del gen MET. La eficacia del compuesto de prueba como agente terapéutico anti-MET se determina detectando una disminución en una o más actividades biológicas de una proteína MET como se define en las reivindicaciones. La determinación de una disminución en una actividad biológica de una proteína MET se examina detectando uno o más de los siguientes cambios en un procedimiento celular: disminución de la fosforilación de ErbB, disminución de la fosforilación de MET, disminución de la asociación ErbB-MET, disminución de la actividad de PI3K, disminución de la fosforilación de AKT, disminución del crecimiento celular, disminución de la proliferación celular o aumento de la apoptosis. En ciertas realizaciones, puede desearse comparar los resultados con un control tal como, por ejemplo, un ensayo por duplicado realizado en ausencia de un compuesto de prueba o un ensayo por duplicado realizado en presencia de un compuesto de prueba que tiene actividad anti-MET conocida. En todavía otras realizaciones, un control puede ser un número de referencia en una base de datos. En ciertas realizaciones, los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse para identificar un compuesto de prueba que disminuye una actividad biológica de una proteína MET al menos aproximadamente 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, o más, con respecto a la actividad biológica en ausencia del compuesto de prueba. Actividades biológicas de MET a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, actividad de cinasa, interacciones proteína-proteína (tales como, por ejemplo, homo- o hetero-dimerización de receptores, unión a ligandos, o unión a un sustrato, etc.), o señalización mediada por MET.

Los compuestos de prueba que van a probarse para actividad en los ensayos descritos en el presente documento pueden incluir proteínas (incluyendo proteínas postraduccionalmente modificadas), péptidos (incluyendo péptidos químicamente o enzimáticamente modificados), o moléculas pequeñas (incluyendo hidratos de carbono, esteroides, lípidos, aniones o

cationes, fármacos, moléculas orgánicas pequeñas, oligonucleótidos, anticuerpos y genes que codifican proteínas de los agentes o moléculas antisentido), que incluyen bibliotecas de compuestos. Los compuestos de prueba pueden producirse naturalmente (por ejemplo, encontrarse en la naturaleza o aislarse de la naturaleza) o pueden no producirse naturalmente (por ejemplo, sintéticos, químicamente sintetizados o hechos por el hombre).

- 5 Si se desea, los compuestos de prueba pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos procedimientos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas biológicas, bibliotecas en fase sólida o en fase de disolución paralelas espacialmente direccionables, procedimientos en bibliotecas sintéticas que requieren deconvolución, el procedimiento de bibliotecas de "una perla un compuesto", y procedimientos de bibliotecas sintéticas usando selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de bibliotecas biológicas está limitado a bibliotecas de polipéptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a bibliotecas de polipéptidos, oligómeros no peptídicos o de moléculas pequeñas de compuestos. Véase Lam, *Anticancer Drug Des.* 12, 145, 1997.

Los procedimientos para la síntesis de bibliotecas moleculares son muy conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, DeWitt y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann y col., *J Med Chem.* 37,2678, 1994; Cho y col., *Science* 261, 1303, 1993; Carell y col., *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 33, 2059, 1994; Carell y col., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop y col., *J. Med Chem.* 37, 1233, 1994). Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en disolución (véase, por ejemplo, Houghten, *BioTechniques* 13, 412-421, 1992), o sobre perlas (Lam, *Nature* 354, 82-84, 1991), chips (Fodor, *Nature* 364, 555-556, 1993), bacterias o esporas (Ladner, patente de EE. UU. n.º 5.223.409), plásmidos (Cull y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1865-1869, 1992) o fago (Scott & Smith, *Science* 249, 386-390, 1990; Devlin, *Science* 249, 404-406, 1990); Cwirla y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6378-6382, 1990; Felici, *J. Mol. Biol.* 222, 301-310, 1991; y Ladner, patente de EE. UU. n.º 5.223.409).

Los compuestos de prueba pueden cribarse para la capacidad para antagonizar la actividad de MET usando cribado de alto rendimiento. Usando cribado de alto rendimiento, pueden probarse muchos compuestos discretos en paralelo de manera que pueden cribarse rápidamente grandes números de compuestos de prueba. Las técnicas más ampliamente establecidas utilizan placas de microtitulación de 96 pocillos. Además de las placas, muchos instrumentos, materiales, pipeteadores, robots, lavadores de placas y lectores de placas están comercialmente disponibles para ajustarse al formato de 96 pocillos.

Alternativamente, pueden usarse ensayos de formato libre, o ensayos que no tienen barrera física entre las muestras. Ensayos que implican formatos libres se describen, por ejemplo, en Jayawickreme y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 19, 1614-18 (1994); Chelsky, "Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches", informado en la Primera Conferencia Anual de La Sociedad de Cribado Biomolecular en Filadelfia, Pa. (7-10 de noviembre de 1995); y Salmon y col., *Molecular Diversity* 2, 57-63 (1996). Otro procedimiento de cribado de alto rendimiento se describe en Beutel y col., patente de EE. UU. n.º 5.976.813.

También se describe un procedimiento de producción de una célula con resistencia adquirida a un agente terapéutico anti-ErbB. Los procedimientos implican poner en contacto una célula que es sensible a un agente terapéutico anti-ErbB con al menos un agente terapéutico anti-ErbB e identificar células que adquieren resistencia al agente terapéutico anti-ErbB. La célula producida mediante los procedimientos descritos en el presente documento no contiene una mutación en un gen ErbB que confiera resistencia al agente terapéutico anti-ErbB, por ejemplo, la célula ha adquirido una resistencia debido a un mecanismo diferente o una mutación en una secuencia que no es una secuencia de ErbB. Las células pueden ponerse en contacto con el agente terapéutico anti-ErbB durante al menos 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o más. Las células pueden ponerse en contacto con una concentración creciente del agente terapéutico anti-ErbB con el tiempo. Por ejemplo, a medida que se recupera el crecimiento celular en presencia de una concentración dada, la concentración puede aumentarse, y repetirse el procedimiento. Por ejemplo, la concentración del agente terapéutico anti-ErbB puede aumentarse de aproximadamente Cl_{30} a aproximadamente Cl_{40} , Cl_{50} y Cl_{60} , o mayor, con el tiempo. Pueden usarse diversos procedimientos para identificar células que han adquirido una resistencia al agente terapéutico anti-ErbB y se describen adicionalmente en el presente documento. Por ejemplo, la identificación de células que han adquirido una resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB incluyen, por ejemplo, uno o más de los siguientes en presencia del agente terapéutico anti-ErbB: elevado crecimiento celular, elevada proliferación celular, disminución de la apoptosis, elevada fosforilación de ErbB, elevada fosforilación de MET, elevada asociación ErbB-MET, elevada fosforilación de AKT, elevada señalización mediada por cinasa de PI3, elevada señalización mediada por ErbB, elevada señalización mediada por MET, presencia de mutación en MET activante, presencia de una amplificación del gen MET, expresión en exceso de MET, expresión en exceso de un ligando de MET, etc. Puede desearse comparar la sensibilidad de la célula con un control tal como, por ejemplo, un ensayo duplicado realizado en ausencia del agente terapéutico anti-ErbB. Un control puede ser un número de referencia en una base de datos. Los procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse para producir una línea celular que tiene al menos aproximadamente 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, o mayor, aumento en la resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB con respecto a un control.

Puede ser deseable poner en contacto la célula con uno, dos, tres, cuatro, cinco o más agentes terapéuticos anti-ErbB

diferentes de manera que la célula desarrolle una resistencia a uno o más de los agentes terapéuticos anti-ErbB. Puede desearse poner en contacto la célula con un único tipo de agente terapéutico anti-ErbB (por ejemplo, agentes terapéuticos de molécula pequeña, agentes terapéuticos de ácido nucleico o agentes terapéuticos de proteína). Alternativamente, también pueden usarse combinaciones de clases de agentes terapéuticos anti-ErbB diferentes, tales como, por ejemplo, una combinación de un inhibidor de cinasas de ErbB y un ARNip, o un inhibidor de cinasas de ErbB y un anticuerpo anti-ErbB, etc. Puede desearse poner en contacto la célula con un agente terapéutico anti-ErbB que se dirige a solo uno de ErbB1, ErbB2, ErbB3 o ErbB4 de manera que la célula desarrolle una resistencia, por ejemplo, a un agente terapéutico anti-ErbB1. Puede desearse poner en contacto la célula con una combinación de agentes terapéuticos anti-ErbB que eligen como diana diferentes proteínas ErbB. Por ejemplo, puede desearse poner en contacto la célula con un agente terapéutico anti-ErbB1 (anti-EGFR) y un agente terapéutico anti-ErbB2 de manera que la célula desarrolle una resistencia a ambos tipos de agentes terapéuticos. Los procedimientos pueden implicar poner en contacto una célula con uno o más agentes terapéuticos para ErbB multiespecíficos, por ejemplo, uno o más reactivos inhibidores de cinasas que eligen como diana dos o más proteínas ErbB. Ejemplos de tales agentes terapéuticos se describen adicionalmente en el presente documento.

También se describe una célula o línea celular producida mediante los procedimientos descritos en el presente documento. En particular, en el presente documento se proporcionan células que han adquirido una resistencia a un agente terapéutico anti-ErbB que no contienen una mutación en una secuencia de ErbB que da lugar a tal resistencia.

También se describen kits útiles para fines de investigación, descubrimiento de fármacos, fines de diagnóstico, monitorización del progreso terapéutico, optimización de la dosificación, etc.

Se describen kits para tratar pacientes que padecen un cáncer que es resistente a un agente terapéutico anti-ErbB. Tales kits pueden comprender al menos un componente para detectar una mutación activante de MET, una amplificación del gen MET, o activación de MET mediada por HGF (como se ha descrito anteriormente) y agente terapéutico anti-ErbB y/o un agente terapéutico anti-MET (como se ha descrito anteriormente). Por ejemplo, un kit puede comprender un agente terapéutico anti-ErbB y al menos un componente para detectar una mutación activante de MET, una amplificación del gen MET, o activación de MET mediada por HGF. Tales kits pueden ser útiles para monitorizar sujetos que están tratándose con un agente terapéutico anti-ErbB para identificar sujetos que desarrollan una resistencia al tratamiento. Un kit puede comprender al menos un componente para detectar una mutación activante de MET, una amplificación del gen MET, o activación de MET mediada por HGF, un agente terapéutico anti-ErbB y un agente terapéutico anti-MET. Tales kits son útiles para monitorizar sujetos que están tratándose con un agente terapéutico anti-ErbB para identificar aquellos sujetos que desarrollan una resistencia al tratamiento y también proporcionan una pauta terapéutica modificada para aquellos sujetos que se descubre que son resistentes a la terapia anti-ErbB y tienen una mutación activante de MET o una amplificación del gen MET. Tales kits son simplemente a modo de ejemplo y un experto en la técnica puede imaginarse muchos otros tipos de kits basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento.

Los componentes para detectar una mutación activante o amplificación génica de MET pueden ser cualquier componente que pueda usarse conjuntamente con los diversos procedimientos descritos en el presente documento para detectar mutaciones o amplificaciones génicas. Componentes a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a MET (o fosfo-MET), un ligando de MET, o un sustrato de MET, un conjunto de cebadores de PCR que amplifican específicamente MET, o un ligando de MET, o un soporte sólido que comprende al menos un fragmento de la secuencia de polinucleótidos que codifica MET o ligando de MET unido al mismo (tal como un chip de micromatriz). El kit puede contener adicionalmente uno o más de los siguientes: una marca de detección, un control positivo, un control negativo, una proteína MET, reactivos para realizar un ensayo de cinasa, reactivos para realizar un ensayo de unión, reactivos para medir la señalización mediada por cinasa de ErbB, MET y/o PI3, instrucciones para su uso, un recipiente de reacción, tampones, etc. El kit también puede comprender componentes para detectar una mutación activante o amplificación génica de ErbB.

Además, un kit puede comprender una célula cancerosa que tiene las mutaciones activantes o amplificaciones génicas de ErbB y MET que es resistente al tratamiento con un agente terapéutico anti-ErbB. El kit también puede comprender uno o más de los siguientes: una marca de detección, un control positivo, un control negativo, instrucciones para su uso, un recipiente de reacción, tampones, un agente terapéutico anti-ErbB, un agente terapéutico anti-MET, reactivos para medir la proliferación, crecimiento y/o apoptosis celular, reactivos para realizar un ensayo de cinasa, reactivos para realizar un ensayo de unión, reactivos para medir ErbB, MET y/o señalización mediada por cinasa de PI3, etc. Tales kits pueden ser útiles, por ejemplo, para identificar agentes terapéuticos para MET, probar combinaciones de agentes terapéuticos anti-ErbB y anti-MET, optimizar la dosificación de fármacos o pautas de tratamiento, etc.

Componentes respectivos del kit pueden combinarse de manera que se alcance una concentración final que es adecuada para la reacción. Adicionalmente, además de estos componentes, el kit puede comprender un tampón que da una condición adecuada a la reacción. Pueden combinarse componentes de proteína, tales como anticuerpos, sustratos, ligandos, cinasas, etc., con agentes estabilizantes. Por ejemplo, los componentes del kit pueden almacenarse y/o transportarse en presencia de aproximadamente 1 % de BSA y aproximadamente 1 % de polioles (por ejemplo, sacarosa

o fructosa) para prevenir la desnaturalización de proteínas después de la liofilización.

Los kits proporcionados en el presente documento también pueden comprender componentes para medir la expresión de proteína ErbB y/o MET y productos de ARN. Tales componentes incluyen materiales y reactivos requeridos para medir la expresión de tal proteína y productos de ARN, tales como, por ejemplo: (1) reactivos para purificar ARN de una muestra biológica; (2) cebadores para generar ácidos nucleicos de prueba; (3) dNTPs y/o rNTPs (tanto previamente mezclados como separados), opcionalmente con uno o más dNTP y/o rNTP únicamente marcados (por ejemplo, dNTP biotinilados o marcados con Cy3 o Cy5); (4) reactivos de marcado después de la síntesis, tales como derivados químicamente activos de colorantes fluorescentes; (5) enzimas, tales como transcriptasas inversas, ADN polimerasas, y similares; (6) diversos medios de tampón, por ejemplo, tampones de hibridación y de lavado; (7) reactivos y componentes de purificación marcados con sondas, como columnas Spin, etc.; (8) reactivos de purificación de proteínas; y (9) reactivos de generación y detección de señales, por ejemplo, conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina, sustrato quimiofluorescente o quimioluminiscente, y similares. En realizaciones particulares, los kits comprenden proteína de calidad controlada premarcada y o ARN aislado de una muestra biológica para su uso como un control.

Adicionalmente, los kits pueden comprender componentes de RT-PCR, o componentes de hibridación. Por ejemplo, los kits pueden comprender matrices de ácido nucleico, matrices de proteína, matrices de anticuerpos, matrices de fosfo-proteína, matrices de fosfo-anticuerpo, etc. Tales kits pueden usarse para determinar el nivel de expresión de MET, ErbB, ligando del mismo, y/o sustratos del mismo.

6. Composiciones farmacéuticas

En ciertas realizaciones, los medios o procedimientos descritos en el presente documento pueden implicar la administración de uno o más agentes terapéuticos anti-ErbB y/o uno o más agentes terapéuticos anti-MET a un sujeto. Los agentes terapéuticos anti-ErbB y/o agentes terapéuticos anti-MET pueden formularse de un modo convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, los agentes terapéuticos anti-ErbB y/o agentes terapéuticos anti-MET, y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables, pueden formularse para administración por, por ejemplo, inyección (por ejemplo SubQ, IM, IP), inhalación o insuflación (tanto por la boca como la nariz) o administración oral, bucal, sublingual, transdérmica, nasal, parenteral o rectal. En una realización, los agentes terapéuticos anti-ErbB y/o agentes terapéuticos anti-MET pueden administrarse localmente, en el sitio en el que las células diana están presentes, es decir, en un tejido, órgano, o fluido específico (por ejemplo, sangre, líquido cefalorraquídeo, masa tumoral, etc.).

Los agentes terapéuticos anti-ErbB y/o agentes terapéuticos anti-MET pueden formularse para una variedad de modos de administración, que incluyen administración sistémica y tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones generalmente pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA. Para administración parenteral, se prefiere inyección, que incluye intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para inyección, los compuestos pueden formularse en disoluciones líquidas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank o disolución de Ringer. Además, los compuestos pueden formularse en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes de uso. También están incluidas formas liofilizadas.

Para administración por vía oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos, pastillas para chupar o cápsulas preparadas mediante medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica. Preparaciones líquidas para administración por vía oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, aromatizantes, colorantes y edulcorantes según convenga. Las preparaciones para administración por vía oral pueden formularse adecuadamente para dar liberación controlada del compuesto activo.

Para administración por inhalación (por ejemplo, administración pulmonar), agentes terapéuticos anti-ErbB y/o agentes terapéuticos anti-MET pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación de espray en aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor apropiado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para su uso en un inhalador

que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Pueden formularse agentes terapéuticos anti-ErbB y/o agentes terapéuticos anti-MET para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multi-dosis, con un conservante añadido. Las composiciones puede adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril, antes de uso.

Además, los agentes terapéuticos anti-ErbB y/o agentes terapéuticos anti-MET también pueden formularse como una preparación de liberación prolongada. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los agentes terapéuticos anti-ErbB y/o agentes terapéuticos anti-MET pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble. La fórmula de liberación controlada también incluye parches.

En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse para la administración al sistema nervioso central (SNC) (revisado en Begley, *Pharmacology & Therapeutics* 104: 29-45 (2004)). Enfoques convencionales para la administración de fármacos al SNC incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (por ejemplo, inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (por ejemplo, producción de una proteína de fusión quimérica que comprende un péptido de transporte que tiene una afinidad por una molécula de la superficie de células endoteliales en combinación con un agente que por sí mismo es incapaz de cruzar la BHE) en un intento por explotar uno de las rutas de transporte endógenas de la BHE; estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad en lípidos de un agente (por ejemplo, conjugación de agentes solubles en agua con vehículos de lípido o colesterol); y la rotura transitoria de la integridad de la BHE por rotura hiperosmótica (resultante de la infusión de una disolución de manitol en la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina).

En una realización, un agente terapéutico anti-ErbB y/o un agente terapéutico anti-MET se incorporan en una formulación tópica que contiene un vehículo tópico que es generalmente adecuado para la administración tópica de fármacos y que comprende cualquier material tal conocido en la técnica. El vehículo tópico puede seleccionarse de manera que se proporcione la composición en la forma deseada, por ejemplo, como una pomada, loción, crema, microemulsión, gel, aceite, disolución, o similares, y puede comprender un material de tanto origen que se produce naturalmente como sintético. Es preferible que el vehículo seleccionado no afecte adversamente el agente activo u otros componentes de la formulación tópica. Ejemplos de vehículos tópicos adecuados para su uso en el presente documento incluyen agua, alcoholes y otros disolventes orgánicos no tóxicos, glicerina, aceite mineral, silicona, vaselina, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, parabenos, ceras y similares.

Las composiciones farmacéuticas (incluyendo preparaciones cosméticas) pueden comprender de aproximadamente 0,00001 al 100 % tal como del 0,001 al 10 % o del 0,1 % al 5 % en peso de uno o más agentes terapéuticos anti-ErbB y/o agentes terapéuticos anti-MET descritos en el presente documento. En ciertas formulaciones tópicas, el agente activo está presente en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,25 % en peso al 75 % en peso de la formulación, preferentemente en el intervalo de aproximadamente el 0,25 % en peso al 30 % en peso de la formulación, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente el 0,5 % en peso al 15 % en peso de la formulación, y lo más preferentemente en el intervalo de aproximadamente el 1,0 % en peso al 10 % en peso de la formulación.

Las afecciones del ojo puede tratarse o prevenirse por, por ejemplo, inyección sistémica, tópica, intraocular de un agente terapéutico anti-ErbB y/o un agente terapéutico anti-MET, o por inserción de un dispositivo de liberación sostenida que libera un agente terapéutico anti-ErbB y/o un agente terapéutico anti-MET. Un agente terapéutico anti-ErbB y/o un agente terapéutico anti-MET pueden administrarse en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de forma que el compuesto se mantenga en contacto con la superficie ocular durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el compuesto penetre en la córnea y regiones internas del ojo, como, por ejemplo, la cámara anterior, cámara posterior, cuerpo vítreo, humor acuoso, humor vítreo, córnea, iris/cuerpo ciliar, cristalino, coroides/retina y esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede, por ejemplo, ser una pomada, aceite vegetal o un material de encapsulamiento. Alternativamente, los compuestos pueden inyectarse directamente en el humor vítreo y acuoso. En otra alternativa, los compuestos pueden administrarse sistémicamente, tal como por infusión intravenosa o inyección, para el tratamiento del ojo.

Se conocen en la técnica procedimientos para administrar agentes terapéuticos de ácido nucleico (véanse, por ejemplo, Akhtar y col., 1992, *Trends Cell Bio.*, 2, 139; y *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar, 1995; Sullivan y col., publicación PCT n.º WO 94/02595). Estos protocolos pueden utilizarse para la administración de

prácticamente cualquier ácido nucleico. Los ácidos nucleicos pueden administrarse a células mediante una variedad de procedimientos conocidos para aquellos familiarizados con la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, encapsulación en liposomas, por iontoforesis o por incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas. Alternativamente, la combinación de ácido nucleico/vehículo se administra localmente por inyección directa o por el uso de una bomba de infusión. Otras vías de administración incluyen, pero no se limitan a, administración oral (forma de comprimido o píldora) y/o intratecal (Gold, 1997, Neuroscience, 76, 1153-1158). Otros enfoques incluyen el uso de diversos sistemas de transporte y portadores, por ejemplo, mediante el uso de conjugados y polímeros biodegradables. Para una revisión completa de las estrategias de administración de fármacos véase Ho y col., 1999, Curr. Opin. Mol. Ther., 1, 336-343 y Jain, Drug Delivery Systems: Technologies and Commercial Opportunities, Decision Resources, 1998 y Groothuis y col., 1997, J. NeuroVirol., 3, 387-400. Descripciones más detalladas de la liberación y administración de ácidos nucleicos se proporcionan en Sullivan y col., arriba, Draper y col., publicación PCT n.º WO 93/23569, Beigelman y col., publicación PCT n.º WO 99/05094, y Klimuk y col., publicación PCT n.º WO 99/04819.

La toxicidad y eficacia terapéutica de los agentes terapéuticos anti-ErbB y/o agentes terapéuticos anti-MET pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales. La DL_{50} es la dosis letal para el 50 % de la población. La DE_{50} es la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población. La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos (DL_{50}/DE_{50}) es el índice terapéutico. Se prefieren agentes terapéuticos anti-ErbB y/o agentes terapéuticos anti-MET que presentan grandes índices terapéuticos. Aunque pueden usarse agentes terapéuticos anti-ErbB y/o agentes terapéuticos anti-MET que presentan efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado en el diseño del sistema de administración que dirige tales compuestos al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el posible daño a células no afectadas, y así reducir los efectos secundarios.

Pueden usarse datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios animales en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos puede encontrarse dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos en cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra la inhibición al 50 % de los síntomas) como se determina en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos. Pueden medirse los niveles en plasma, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Ejemplo

La invención que se ha descrito ahora generalmente se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos que están incluidos simplemente para los fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención de ningún modo.

Ejemplo 1: La amplificación de MET conduce a resistencia a inhibidores de cinasas de EGFR

Los inhibidores de tirosina cinasas (TKI) han surgido como eficaces terapias contra el cáncer para tumores en los que la cinasa diana se activa por un mecanismo genético. Ejemplos clínicos contundentes incluyen el uso de imatinib para el tratamiento de leucemia mielógena crónica (LMC; translocalización *BCR-ABL*) o tumores del estroma gastrointestinal (TEGI; las mutaciones activantes en *KIT* o *PDGFRA*), y los TKI del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) gefitinib y erlotinib para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) que alojan mutaciones activantes en *EGFR* (1-4).

Las mutaciones somáticas en *EGFR* se producen en el 10-15 % de los tumores CPCNP de caucásicos y el 30-40 % de asiáticos y están localizadas en los exones 18-21 del dominio de tirosina cinasa de *EGFR*. Dos tipos comunes de mutaciones, una serie de deleciones del exón 19 que se solapa y una mutación de aminoácido del exón 21 (L858R), representan el 85 % de todas las mutaciones en *EGFR* conocidas (5). El tratamiento de líneas celulares mutantes en *EGFR* con gefitinib conduce a apoptosis similar a las impresionantes respuestas clínicas observadas en pacientes (6). Sin embargo, aunque los CPCNP mutantes en *EGFR* responden inicialmente a inhibidores de *EGFR*, la resistencia adquirida a gefitinib y erlotinib se desarrolla finalmente en la gran mayoría de los pacientes tratados con estos agentes. En el 50 % de tales pacientes se ha identificado una única mutación secundaria, una sustitución de treonina por metionina en la posición 790 (T790M) (7, 8). Sin embargo, los mecanismos para la resistencia adquirida en los tumores restantes son desconocidos. Se ha mostrado que tumores mutantes en *EGFR* utilizan específicamente ERBB3 para activar la señalización de PI3K/Akt y que la regulación por disminución de la ruta de señalización de ERBB3/PI3K/Akt es necesaria para que gefitinib induzca la apoptosis en CPCNP mutante en *EGFR* (9, 10). En particular, también se ha demostrado que la fosforilación de ERBB3 persistente conduce a resistencia a gefitinib en células de cáncer de mama amplificadas con ERBB2 (11).

Para explorar mecanismos adicionales de resistencia a gefitinib se generaron clones resistentes de la línea celular de

CPCNP mutante en la delección del exón 19 (del E746_A750) en *EGFR* hipersensibles a gefitinib (CI_{50} 10 nM), HCC827, exponiendo las células a concentraciones crecientes de gefitinib durante 6 meses. La línea celular resultante HCC827 RG (resistente a gefitinib) y 6 clones aislados de las células individuales fueron resistentes a gefitinib *in vitro* ($CI_{50} > 10 \mu M$; Figura 1A). A diferencia de en la línea celular parental, la fosforilación de ERBB3 y de Akt se mantuvo en presencia de gefitinib en las células RG (Figura 1B). Para determinar si esta observación fue debida a una mutación secundaria en *EGFR*, se secuenció la región codificante entera de *EGFR* de los 6 clones RG, que reveló la mutación por delección del exón 19 conocida. Sin embargo, no se detectó la mutación T790M. Además, se usó un procedimiento enzimático sensible (Surveyor™), que puede detectar variantes genéticas incluso a una frecuencia del 1 %, para cribar alteraciones en la secuencia codificante entera de *EGFR* de los 6 clones de HCC827 RG (12). No se detectaron diferencias de la línea celular HCC827 parental. Además, el inhibidor de EGFR irreversible CL-387.785, que puede inhibir el crecimiento de líneas celulares de CPCNP que alojan la mutación T790M, no suprimió el crecimiento de las líneas celulares HCC827 RG (13).

Para determinar si la activación anómala de otro receptor podría estar mediando en la resistencia observada, se usó una matriz de fosfo-tirosina cinasa del receptor (RTK) (R&D Systems) para comparar los efectos de gefitinib en un panel de 42 RTK diferentes fosforiladas en células HCC827 y HCC827 RG5 (Figura 1C). En la Línea celular HCC827, EGFR, ERBB3, ERBB2 y MET estuvieron todos fosforilados, que se redujeron tanto completamente como sustancialmente tras el tratamiento con gefitinib 1 μM . A diferencia, hubo una marcada fosforilación de MET y fosforilación persistente de ERBB3 y EGFR en la células HCC827 RG incluso en presencia de gefitinib (Figura 1C). Para explorar adicionalmente el mecanismo subyacente de resistencia, los presentes inventores realizaron análisis del número de copias del genoma completo de las líneas celulares HCC827 RG y los compararon con las células HCC827 parentales usando la matriz de polimorfismo de un único nucleótido (SNP) Human Mapping 250K Sty (Figura 1D). En las líneas celulares resistentes, se detectó una marcada amplificación focal en el brazo largo del cromosoma 7 (que engloba 7g31.1 a 7g33.3) que no estuvo presente en la línea celular parental. Esta región contiene el proto-oncogén de MET (Figura 1E). Se usó PCR cuantitativa para confirmar que *MET* se amplificó 5-10 veces en todas las líneas celulares resistentes HCC827 en comparación con la línea celular HCC827 parental (Figura 6). Usando el perfilado de expresión de ARNm, los presentes inventores compararon adicionalmente perfiles de expresión de ARNm en las líneas celulares RG y parentales (Figura 8). De las 20 secuencias más diferencialmente expresadas en exceso en células RG, la propia *MET* se representó 3 veces. Se secuenció la región codificante de *MET* completa de los 6 clones de HCC827 RG y no se detectaron mutaciones en *MET*. Juntos, estos hallazgos sugieren que la amplificación de *MET* conduce a aumentar la expresión de *MET* que está asociada a la fosforilación de MET, EGFR y ERBB3 en presencia de gefitinib y la resistencia *in vitro* a gefitinib en las líneas celulares HCC827 RG.

Para determinar si un aumento en la señalización de MET podría ser la base de la resistencia adquirida a gefitinib, se examinó si la inhibición de MET suprimiría el crecimiento de células HCC827 RG. Se expusieron células HCC827 RG a PHA-665.752, un inhibidor de tirosina cinasas de MET, solo o en combinación con gefitinib (14). Aunque las células HCC827 RG5 fueron resistentes tanto a gefitinib como a PHA-665.752 solos, en combinación hubo más del 85 % de inhibición del crecimiento a concentraciones de > 33 nM de ambos fármacos (Figura 2A), acompañado por una marcada apoptosis (Figura 7). Se observaron hallazgos similares con todos los otros clones de HCC827 RG. A continuación, se examinaron los efectos de gefitinib y PHA-665.752 sobre la señalización de EGFR en las líneas celulares resistentes. En las células HCC827 RG, a diferencia de en las células parentales, gefitinib se reduce él mismo, pero es inestable para inhibir completamente la fosforilación de EGFR, y tiene efecto mínimo sobre p-ERBB3 o p-Akt (Figura 2B). Sin embargo, en combinación con PHA-665.752, la fosforilación de ERBB3 y Akt se suprime completamente en las células HCC827 RG. De importancia, la fosforilación de EGFR residual observada con el tratamiento con gefitinib también se eliminó tras la adición de PHA-665.752, sugiriendo que la fosforilación de EGFR residual era debida a la actividad de cinasa de MET como se ha descrito previamente (15). Para definir con más precisión el mecanismo por el que PI3K/Akt estaba siendo activado en las células HCC827 RG, la subunidad reguladora de p85 de PI3K se inmunoprecipitó y se analizaron proteínas co-precipitantes. En la línea celular HCC827 parental, dos proteínas de fosfotirosina importantes, ErbB3 y el ligando 1 (Gab1) asociado a la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb2), una conocida proteína adaptadora de MET (16), coprecipitaron con p85 (Figura 2C). Ambas interacciones se rompieron en presencia de gefitinib. A diferencia, tanto ERBB3 como Gab1 todavía se co-precipitaron con p85 en las células HCC827 RG en presencia de gefitinib solo, sin embargo estas interacciones se rompieron completamente en presencia de tanto gefitinib como PHA-665.752 (Figura 2C). Estas observaciones están de acuerdo con la pérdida de fosfo-ERBB3 observada en extractos celulares (Figura 2B) y sugieren que MET puede desencadenar la activación de ERBB3 independiente de actividad de cinasa de EGFR. El tratamiento de las células HCC827 RG con PHA-665.752 solo bloquea la asociación de Gab-1 a p85, pero tiene efecto mínimo sobre los niveles de P-Akt (Figuras 2B y 2C), demostrando así que la asociación de Gab-1 con PI3K no es necesaria para la fosforilación de Akt en estas líneas celulares resistentes a gefitinib. Y, lo que es más importante, la regulación por disminución de *MET* usando ARN de horquilla pequeña (hp) dirigido contra dos regiones diferentes de *MET* también restauró la sensibilidad de HCC827 RG a gefitinib (Figura 2D) (17). Además, ambos de los ARNhp específicos de *MET* regularon por disminución *MET* al nivel encontrado en la línea celular HCC827 parental (véase la Figura 2B) y restauraron la capacidad de gefitinib para regular por disminución tanto la fosforilación de ERBB3 como de Akt en estas líneas celulares (Figura 2E). Juntos, estos hallazgos sugieren que la amplificación de *MET* conduce

a activación persistente de la señalización de PI3K/Akt en presencia de gefitinib manteniendo la fosforilación de ERBB3.

La amplificación de *MET* y su asociación con sensibilidad *in vitro* a PHA-665.752 se ha informado recientemente en líneas celulares de cáncer gástrico (18). Así, se determinó si otras líneas celulares con amplificación de *MET* también utilizaban ERBB3 para activar la señalización de PI3K/Akt. Similar a las células HCC827 RG, se encontró que ERBB3 se asociaba a p85 en células de CPCNP H1993 y en células de cáncer gástrico SNU638 y MKN45. Esta asociación se rompió por PHA-665.752, pero no por gefitinib, el inhibidor dual de EGFR/ERBB2 lapatinib o por CL-387.785 (Figura 3A). Así, *MET* conduce a la fosforilación de ERBB3 y el acoplamiento a PI3K en una manera independiente de EGFR y ERBB2. Similarmente, la fosforilación de ERBB3 y de Akt solo se inhibió por PHA-665.752 (Figura 3A). Además, ERBB3 se reguló por disminución en las células SNU-638, infectándolas lentiviralmente con un ARNhp específico de ERBB3 que condujo a una marcada disminución en p-AKT (Figura 3B) y a inhibición del crecimiento (Figura 3C). Juntos, estos estudios sugieren las observaciones con células HCC827 RG de que ERBB3 está fosforilado con tirosina en una manera dependiente de *MET* como mecanismo para la activación de PI3K/Akt y son generalizables a otras moléculas amplificadas por *MET*.

Entonces se determinó si *MET* podría conducir directamente a la fosforilación de ERBB3. ERBB3 se expresó solo o en combinación con *MET* en células de ovario de hámster chino (CHO) que normalmente no expresan niveles detectables de EGFR, ERBB2 o ERBB3. En células CHO que co-expresan *MET* y ERBB3, hubo una marcada fosforilación de ERBB3 que se bloqueó por PHA-665.752, pero no por alta dosis de gefitinib, lapatinib o el inhibidor PP2 de cinasas de la familia SRC (Figura 3D). En estas células, ERBB3 fosforilado con tirosina co-inmunoprecipitó p85 en un modo dependiente de cinasa de *MET* (Figura 3E). También se observó que ERBB3 y *MET* se co-precipitaron de las células CHO (Figuras 3E y 3F). Juntos, estos hallazgos sugieren que *MET* puede asociarse a ERBB3 y promover la fosforilación de ERBB3 y el acoplamiento a PI3K en un modo dependiente no de ERBB o SRC.

A continuación se examinó si la amplificación de *MET* podría producirse en pacientes con CPCNP mutante en *EGFR* con resistencia adquirida a gefitinib. Se analizaron 18 pacientes, todos los cuales habían obtenido respuestas parciales iniciales a gefitinib o erlotinib, pero habían desarrollado posteriormente el crecimiento de su cáncer mientras que recibían gefitinib o erlotinib. Se usaron tanto PCR cuantitativa (n=11; cuando solo estuvo disponible el ADN derivado de tumor) como hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH; n=7 cuando estuvieron disponibles secciones de tumor) para el sitio de *MET*. En 8 pacientes, especímenes de tumor emparejados estuvieron disponibles antes y después del desarrollo de resistencia a gefitinib mientras que en 10 pacientes solo estuvieron disponibles especímenes tras la resistencia clínica a gefitinib o erlotinib (Figura 5 y Figura 9). Entre los 8 pacientes con muestras emparejadas, la amplificación de *MET* se detectó en 2 de los especímenes después del tratamiento, pero no estuvo presente en los especímenes antes del tratamiento. En el paciente 1, la amplificación de *MET* en el espécimen después del tratamiento fue similar al nivel de amplificación observado en las líneas celulares HCC827 RG (Figura 5 y Figura 6). Además, la amplificación de *MET* también se detectó en otros 2 pacientes en los que solo estuvieron disponibles especímenes después del tratamiento (pacientes 12 y 13). En general, la amplificación de *MET* se detectó en 4/18 (22 %) especímenes de tumores resistentes a gefitinib/erlotinib. Y, lo que es más importante, la amplificación de *MET* se observó en 3 especímenes sin una mutación T790M en *EGFR* y en 1 espécimen con una mutación T790M en *EGFR* simultánea. De forma interesante, el paciente 12 tuvo tanto T790M en *EGFR* como la amplificación de *MET*, pero cada modo de resistencia se produjo por separado en 2 sitios de recaída diferentes (Figura 5). Estos hallazgos sugieren que la amplificación de *MET* puede detectarse en pacientes con CPCNP con resistencia a gefitinib. Además, pueden producirse múltiples mecanismos de resistencia simultáneamente en el mismo paciente.

40 Procedimientos

Cultivo celular y reactivos

Se usaron en este estudio las líneas celulares HCC827 de CPCNP mutante en *EGFR* (del E746_A750), H3255 (L858R) y H3255 RG y se caracterizaron ampliamente (3, 30-31, 10). Se obtuvieron células 111993 y BT474 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Manassas, VA). Se obtuvieron células de cáncer gástrico SNU-638 y MKN-45 del Dr. Won Ki Kang (Centro Médico Samsung, Seúl, Corea) y se caracterizaron previamente (18, 32). Las líneas celulares HCC827, H1993 SNU-638 y MKN-45 se mantuvieron en RPMI 1640 (Cellgro; Mediatech Inc., Herndon, CA) complementado con 10 % de SBF (20 % para MKN-45), 100 unidades/ml de penicilina, 100 unidades/ml de estreptomina y glutamina 2 mM. Se mantuvieron 113255 y H3255 RG en medio ACL-4 (Life Technologies, Inc., Rockville, MD) complementado con 5 % de SBF, 100 unidades/ml de penicilina, 100 unidades/ml de estreptomina y glutamina 2 mM.

Se obtuvo gefitinib de fuentes comerciales y se purificó mediante una extracción con acetato de etilo. El producto resultante se verificó por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas. Se compró lapatinib de American Custom Chemical Corporation (San Diego, CA). Se compró C1-387.785 de Calbiochem. PHA-665.752 fue una donación de Pfizer. Se prepararon disoluciones madre de todos los fármacos en DMSO y se guardaron a -20 °C.

55 *Ensayos de proliferación y crecimiento celular*

Se evaluaron el crecimiento y la inhibición del crecimiento por ensayo con MTS. Este ensayo, un procedimiento colorimétrico para determinar el número de células viables, se basa en la biorreducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) por células a un producto de formazano que es soluble en medio de cultivo celular, puede detectarse espectrofotométricamente y se realizó según procedimientos previamente establecidos (3, 31, 10).

Las células se expusieron a tratamiento durante 72 horas y el número de células usado por experimento se determinó empíricamente y se ha establecido previamente (31). Todos los puntos experimentales se establecieron en seis a doce pocillos y todos los experimentos se repitieron al menos tres veces. Los datos se mostraron gráficamente usando GraphPad Prism versión 3.00 para Windows (software GraphPad; malla mundial en graphpad.com). Las curvas se ajustaron usando un modelo de regresión no lineal con una respuesta de dosis sigmoide.

Anticuerpos y transferencia Western

Células cultivadas bajo las condiciones previamente especificadas se lisaron en el siguiente tampón de lisis: Tris 20 mM, pH 7,4/ NaCl 150 mM /1 % de Nonidet P-40/ 10 % de glicerol/ EDTA 1 mM / EGTA 1 mM / pirofosfato de sodio 5 mM / NaF 50 mM / β -glicerofosfato 10 nM / vanadato de sodio 1 mM / DTT 0,5 mM / 4 μ g/ml de leupeptina/ 4 μ g/ml de pepstatina/ 4 μ g/ml de apoproteína/ PMSF 1 mM. Después de la lisis celular, los lisados se centrifugaron a 16.000 x g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se usó para procedimientos posteriores. Se realizaron análisis de transferencia Western después de la separación por electroforesis en SDS/PAGE y transferencia a membranas de nitrocelulosa. Se realizó inmunotransferencia según las recomendaciones de los fabricantes de anticuerpos. Se detectó la unión al anticuerpo usando un sistema de quimioluminiscencia potenciado (New England Nuclear Life Science Products Inc.).

Se obtuvieron anticuerpos anti-fosfo-Akt (Ser-473), anti-Akt total, anti-EGFR y anti-fosfo-ErbB-3 (Tyr-1289) de Cell Signaling Technology. El anticuerpo anti-ErbB-3 se obtuvo de Lab Vision. Los anticuerpos para EGFR específicos de fosfo (pY1068), para MET (pY 1234/1235), para ERK1/2 total, para fosfo-ERK1/2 (pT185/pY187) se compraron de Biosource International Inc. El anticuerpo anti-p85 se obtuvo de Upstate Biotechnology. El anticuerpo para Met total (C-28) se compró de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Generación de HCC827 resistente a gefitinib in vitro

Con el fin de generar una línea celular resistente, células HCC827 se expusieron a concentraciones crecientes de gefitinib similarmente a los procedimientos de los presentes inventores previamente descritos usando H3255 (10). Se aumentaron escalonadamente las concentraciones de gefitinib de 1 a 100 nM cuando las células reanudaron la cinética de crecimiento similar a las células parentales no tratadas. Las células que pudieron crecer en 100 nM de gefitinib se obtuvieron después de 6 meses de la exposición inicial al fármaco. Para confirmar la emergencia de un clon resistente, se realizaron ensayos de MTS siguiendo el crecimiento a cada concentración después de dejar que las células crecieran en condición de fármaco libre durante al menos 4 días. Las células HCC827 resistentes se sometieron a 17 pases en ausencia de gefitinib y mantuvieron su resistencia como se ha confirmado por ensayos con MTS. Se aislaron seis clones individuales (HCC827 RG1, RG2, RG5, RG6, RG7 y RG8) y se confirmó que todos eran independientes resistentes a gefitinib. Se mantuvieron células HCC827 concomitantemente sin gefitinib y su sensibilidad a gefitinib se examinó cada 5 pases. No hubo cambio significativo en la sensibilidad a gefitinib en células parentales durante el periodo.

Análisis SURVEYOR™

Se examinó la región codificante entera de *EGFR* de los clones de HCC827 RG para alteraciones genéticas usando una modificación del procedimiento de barrido de genes sensibles previamente descrito (10, 12). Se generaron siete segmentos de ADNc solapantes que cubrían la región codificante entera de *EGFR* y se analizaron como se ha descrito previamente (12). Los cebadores de PCR están disponibles a petición.

Secuenciación de ADNc de líneas celulares

Se aisló ARN total de líneas celulares usando Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se purificó usando el kit RNeasy™ minielute cleanup (Qiagen, Valencia, CA). Se transcribió ADNc a partir de 2 μ g de ARN total con transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). El ADNc se usó como molde para las posteriores amplificaciones por PCR de *EGFR* y *MET*. Previamente se han publicado los detalles de las condiciones de PCR y los cebadores (3, 17).

Construcciones de ARNhp de MET e infección lentiviral

Se obtuvieron construcciones de ARNhp de *MET* clonadas en el vector pLKO. 1 puro de Harvard RNAi consortium y se caracterizaron previamente (10, 17). Cada construcción contuvo una secuencia de 21 pb que elige como diana diferentes regiones de *MET*, una secuencia en horquilla de 6 nucleótidos (CTCGAG) y una secuencia de hebra complementaria de 21 pb. Como control se usó un vector que contiene proteína verde fluorescente (GFP). Las secuencias de ARNhp

específicas están disponibles a petición. Se realizaron producción de lentivirus e infecciones como se ha descrito previamente (10).

Análisis de SNP y de expresión

5 Se sembraron células HCC827 y HCC827 RG en placa al 60 % de confluencia en medio que contenía suero y se recogió ARN total como se ha descrito anteriormente 6 horas tras la alimentación de las células. A continuación se procesaron especímenes de ARN y se hibridaron con micromatrices de HGU133A de Affymetrix y se barrieron. El valor de expresión para cada gen se calculó usando el software GeneChip de Affymetrix y los datos se analizaron usando el software dChip (malla mundial en biosun1.harvard.edu/complab/dchip/).

10 Se aisló ADN genómico de células HCC827 y HCC827 RG usando el kit de tejido DNeasy (Qiagen, Inc., Valencia, CA). Se procesaron las muestras para la matriz de polimorfismo de un único nucleótido (SNP) Human Mapping 250K Sty según las instrucciones del fabricante (Affymetrix Mapping 500K Assay Manual, excepto que el ciclador térmico de MJ Research se fijó en el modo "Block", y todos los ciclos de desnaturalización se llevaron a cabo a 92 °C, se realizaron cuatro reacciones de PCR para cada muestra y se fragmentaron 120 ug de producto de PCR, se marcaron y se hibridaron con cada matriz. La comparación de las diferencias del número de copias de genes entre HCC827 y los clones RG se realizó usando el software dChip según procedimientos previamente establecidos (33).

PCR cuantitativa

20 Se determinó el número relativo de copias para *MET* usando PCR cuantitativa en tiempo real usando un kit de detección de secuencias PRISM 7500 (Applied Biosystems) y un kit de PCR QuantiTect SYBR Green (Qiagen, Inc., Valencia, CA). Se usó el procedimiento de la curva patrón para calcular el número de copias del gen *MET* en la línea celular o muestra de ADN de tumor con respecto a una referencia, el elemento repetitivo de la línea 1 cuyo número de copias es similar entre células normales y cancerosas (33). La cuantificación se basó en curvas patrón de una dilución sucesiva de ADN genómico humano normal. Todos los especímenes se analizaron por triplicado. Los cebadores de PCR están disponibles a petición.

Xenoinjertos

25 Se usaron ratones sin pelo (nu/nu; 6-8 semanas de edad; Charles River Laboratories) para estudios *in vivo* y se cuidaron según los patrones del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (IACUC) bajo un protocolo aprobado por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales del Hospital Infantil de Boston. Los ratones se anestesiaron usando una mezcla de oxígeno para inhalación con 2 % de isoflurano (Baxter). Se inoculó subcutáneamente una suspensión de 5×10^6 células HCC827 o HCC827 RG5 de cáncer de pulmón (en 0,2 ml de PBS) en el cuadrante derecho inferior del costado de cada ratón. Los tumores se midieron dos veces a la semana usando compases calibradores, y se calculó el volumen usando la fórmula (longitud x anchura² x 0,52). Los ratones se monitorizaron diariamente para peso corporal y estado general. Los tumores se recogieron cuando su tamaño medio alcanzó 1000 mm³.

Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes

35 Se realizó hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) usando una sonda D7S522 y sonda del centrómero del cromosoma 7 (CEP7) comprada de Vysis (Des Plaines, IL). Se pretrataron secciones de tumor de cinco micrómetros (5 pm) generadas de xenoinjertos o de espécimen de paciente desparafinando en xileno y deshidratando en etanol. Las secciones se digirieron sumergiendo en Tris-base y EDTA (TE), lavando en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y digiriendo con Digest-All (Zymed). Las secciones se fijaron usando formalina y se deshidrataron en etanol. Se completó la co-desnaturalización de las secciones y la sonda (D7S522 y CEP7) y las secciones se hibridaron a 37 grados durante 40 dos a tres noches. Se hicieron lavados después de la hibridación usando solución salina-citrato de sodio y solución salina tamponada con fosfato con disoluciones de Tween-20 y se aplicó un cubreobjetos sobre contratinción con DAPI. La sonda D7S522 está contenida dentro del amplicón pequeño de las células HCC827 RG (Figura IF). Se analizaron cien células de cada espécimen de tumor y se cuantificó el número de señales de D7S522 y CEP 7. Las células se clasificaron como (1) < 1 copia adicional de D7S522 en comparación con CEP 7, (2) > 2 copias adicionales de D7S522 en comparación con CEP 7, o (3) > 3 copias adicionales de D7S522 en comparación con CEP 7.

Pacientes

50 Se obtuvieron especímenes de tumor de pacientes tratados con gefitinib o erlotinib del Instituto Oncológico Dana-Farber/Brigham and Women's Hospital (Boston, MA), Centro Hospitalario Oncológico Aichi (Nagoya, Japón), Universidad China (Hong Kong, China) y del Hospital Bellaria (Bologna, Italia) bajo estudios aprobados por el Comité de ética médica. Todos los pacientes proporcionaron consentimiento informado por escrito. La presencia de una mutación en *EGFR* en cada espécimen se confirmó usando la amplificación específica de exones (exones 18-21), seguida de subclonación y secuenciación directa o usando la endonucleasa Surveyor™ acoplada a HPLC desnaturalizante (DHPLC), fraccionamiento y secuenciación usando procedimientos previamente publicados (12, 7). La detección de la mutación

T790M en *EGFR* se realizó usando endonucleasa Surveyor™ acoplada a DHPLC o usando un ensayo de PCR en tiempo real Cycleave (10, 32, 12). Ambos procedimientos pueden detectar la mutación T790M en *EGFR* en una frecuencia alélica del 1-5 %.

Ejemplo 2: La inducción de MET conduce a resistencia al inhibidor de cinasas de EGFR

- 5 Se indujo actividad de MET tratando células HCC827 con su ligando, HGF (factor de crecimiento de hepatocitos). Se co-administró el inhibidor de cinasas de ErbB gefitinib. El panel izquierdo superior de la Figura 10 muestra la curva de supervivencia generada cuando células HCC827 se trataron con diferentes concentraciones de HGF (2, 10 y 50 ng/ml) y se sometieron a un ensayo de supervivencia con MTS en presencia de gefitinib. El tratamiento con 50 ng/ml de HGF conduce a supervivencia notablemente mejorada.
- 10 El panel derecho superior de la Figura 10 muestra que HGF mantiene la activación de PI3K/AKT en HCC827 en presencia de gefitinib. Se trataron células HCC827 con gefitinib solo o con HGF durante 6 horas antes de la lisis. Se analizaron lisados por análisis de transferencia Western con los anticuerpos indicados. Los resultados indican que mientras que los niveles de proteína AKT fueron relativamente constantes, la disminución en la fosforilación de AKT producida por el tratamiento con gefitinib (TKI) se invirtió al menos parcialmente por el tratamiento con HGF.
- 15 El panel inferior de la Figura 10 muestra la supervivencia celular cuando se co-administraron HGF y gefitinib. Se sembraron células 50t0K en una placa de Petri de 10 cm y se trataron con las condiciones indicadas durante 10 días. Se usó gefitinib a 1 μ M, y se usó HGF a 50, 10 o 2 ng/ml. A continuación, las placas se tñeron con cristal violeta para visualizar células viables. El pocillo sin tratar muestra la mayor población de células viables, y las células tratadas solo con gefitinib mostraron la mayor muerte celular. La supervivencia de células tratadas con gefitinib aumenta con concentraciones elevadas de HGF.
- 20

Tomados conjuntamente, los datos indican que la activación inducida por ligando de MET induce resistencia a TKI de EGFR en células HCC827.

Referencias

1. B. J. Druker y col., *New England Journal of Medicine* 344, 1038 (2001).
- 25 2. G. D. Demetri y col., *New England Journal of Medicine* 347, 472 (2002).
3. J. G. Paez y col., *Science* 304, 1497 (2004).
4. T. J. Lynch y col., *New England Journal of Medicine* 350, 2129 (2004).
- H. Shigematsu y col., *Journal of the National Cancer Institute* 97, 339 (2005).
6. S. Tracy y col., *Cancer Research* 64, 7241 (2004).
- 30 7. T. Kosaka y col., *Clinical Cancer Research* 12, 5764 (2006).
8. M. N. Balak y col., *Clinical Cancer Research* 12, 6494 (2006).
9. J. A. Engelman y col., *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 3788 (2005).
10. J. A. Engelman y col., *Journal of Clinical Investigation* 116, 2695 (2006).
11. N. V. Sergina y col., *Nature* (2007).
- 35 12. P. A. Janne y col., *Clinical Cancer Research* 12, 751 (2006).
13. E. L. Kwak y col., *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 7665 (2005).
14. J. G. Christensen y col., *Cancer Research* 63, 7345 (2003).
15. M. Jo y col., *Journal of Biological Chemistry* 275, 8806 (2000).
16. K. M. Weidner y col., *Nature* 384, 173 (1996).
- 40 17. T. Mukohara y col., *Clinical Cancer Research* 11, 8122 (2005).
18. G. A. Smolen y col., *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2316 (2006).
19. M. C. Heinrich y col., *Journal of Clinical Oncology* 24, 4764 (2006).

20. M. Debiec-Rychter y col., *Gastroenterology* 128, 270 (2005).
21. A. Hochhaus y col., *Leukemia* 16, 2190 (2002).
22. M. Pocaly y col., *Leukemia* 21, 93 (2007).
23. N. J. Donato y col., *Blood* 101, 690 (2003).
- 5 24. A. Ptasznik, Y. Nakata, A. Kalota, S. G. Emerson, A. M. Gewirtz, *Nature Medicine* 10, 1187 (2004).
25. T. Kosaka y col., *Cancer Research* 64, 8919 (2004).
26. T. Shibata y col., *Clinical Cancer Research* 11, 6177 (2005).
27. A. Inoue y col., *Journal of Clinical Oncology* 24, 3340 (2006).
28. F. M. Yakes y col., *Cancer Research* 62, 4132 (2002).
- 10 29. X. Zhao y col., *Cancer Research* 64, 3060 (2004).
30. J. Amann y col., *Cancer Research* 65, 226 (2005).
31. T. Mukohara y col., *Journal of the National Cancer Institute* 97, 1185 (2005).
32. M. Park, H. Park, W. H. Kim, H. Cho, J. H. Lee, *Exp Mol Med* 37, 213 (2005).
33. X. Zhao y col., *Cancer Research* 65, 5561 (2005).

15 **Equivalentes**

La presente invención proporciona, entre otras cosas, medios para tratar cáncer usando una combinación de un agente terapéutico anti-ErbB y un agente terapéutico anti-MET como se define en las reivindicaciones. Muchas variaciones de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la técnica en la revisión de esta memoria descriptiva. El alcance completo de la invención debe determinarse por referencia a las reivindicaciones, junto con su alcance completo de equivalentes, y la memoria descriptiva, junto con tales variaciones.

20

REIVINDICACIONES

1. Un agente terapéutico anti-ErbB y un agente terapéutico anti-MET para su uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto que ha desarrollado resistencia al tratamiento con un agente terapéutico anti-ErbB,
en el que el sujeto tiene una amplificación del gen MET,
- 5 en el que el agente terapéutico anti-ErbB es gefitinib, erlotinib, lapatinib, PF00299804, CI-1033, EKB-569, BIBW2992, ZD6474, AV-412 o HKI-272, y
en el que el agente terapéutico anti-MET es PHA-665.752, SU11274, SU5416, PF-02341066, XL-880 o MGCD265.
2. El agente terapéutico anti-ErbB y el agente terapéutico anti-MET para su uso según la reivindicación 1, en el que el
10 cáncer es cáncer de pulmón, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer gástrico o cáncer pancreático.
3. El agente terapéutico anti-ErbB y el agente terapéutico anti-MET para su uso según la reivindicación 2, en el que el
cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.
4. El agente terapéutico anti-ErbB y el agente terapéutico anti-MET para su uso según la reivindicación 1, en el que el
sujeto tiene una mutación activante de EGFR o amplificación génica.
- 15 5. El agente terapéutico anti-ErbB y el agente terapéutico anti-MET para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además un agente terapéutico adicional.
6. Un procedimiento de identificación de un sujeto como candidato para el tratamiento con un agente terapéutico anti-
ErbB y un agente terapéutico anti-MET,
20 en el que el agente terapéutico anti-ErbB es gefitinib, erlotinib, lapatinib, PF00299804, CI-1033, EKB-569, BIBW2992, ZD6474, AV-412 o HKI-272, y
en el que el agente terapéutico anti-MET es PHA-665.752, SU11274, SU5416, PF-02341066, XL-880 o MGCD265,
en el que dicho sujeto ha sido tratado con un agente anti-ErbB que es gefitinib, erlotinib, lapatinib, PF00299804, CI-1033, EKB-569, BIBW2992, ZD6474, AV-412 o HKI-272 y padece cáncer que ha adquirido resistencia a dicho agente anti-ErbB, que comprende detectar una amplificación del gen MET en una célula cancerosa de dicho sujeto.
- 25 7. Un procedimiento de identificación de un agente terapéutico anti-MET *in vitro* que comprende poner en contacto una célula cancerosa que ha adquirido resistencia a gefitinib, erlotinib, lapatinib, PF00299804, CI-1033, EKB-569, BIBW2992, ZD6474, AV-412 o HKI-272, en el que dicha célula cancerosa comprende una amplificación del gen MET, con un agente
30 terapéutico anti-ErbB y un compuesto de prueba y detectar un cambio en un proceso celular seleccionado del grupo que consiste en: disminución de la fosforilación de ErbB, disminución de la fosforilación de MET, disminución de la asociación ErbB-MET, disminución de la fosforilación de EGFR, disminución de la fosforilación de AKT, disminución del crecimiento celular, disminución de la proliferación celular y aumento de la apoptosis, en comparación con dicho proceso celular en una célula idéntica puesta solo en contacto con el agente terapéutico anti-ErbB,
en el que el agente terapéutico anti-ErbB es gefitinib, erlotinib, lapatinib, PF00299804, CI-1033, EKB-569, BIBW2992, ZD6474, AV-412 o HKI-272.
- 35 8. Un procedimiento de identificación de un sujeto que está tratándose con un agente terapéutico anti-ErbB que está en riesgo de adquirir resistencia a dicho agente terapéutico anti-ErbB, en el que el agente terapéutico anti-ErbB es gefitinib, erlotinib, lapatinib, PF00299804, CI-1033, EKB-569, BIBW2992, ZD6474, AV-412 o HKI-272, que comprende detectar la presencia de una amplificación del gen MET en una célula cancerosa de dicho sujeto, en el que la presencia de dicha
40 amplificación del gen MET indica un riesgo de adquirir dicha resistencia.

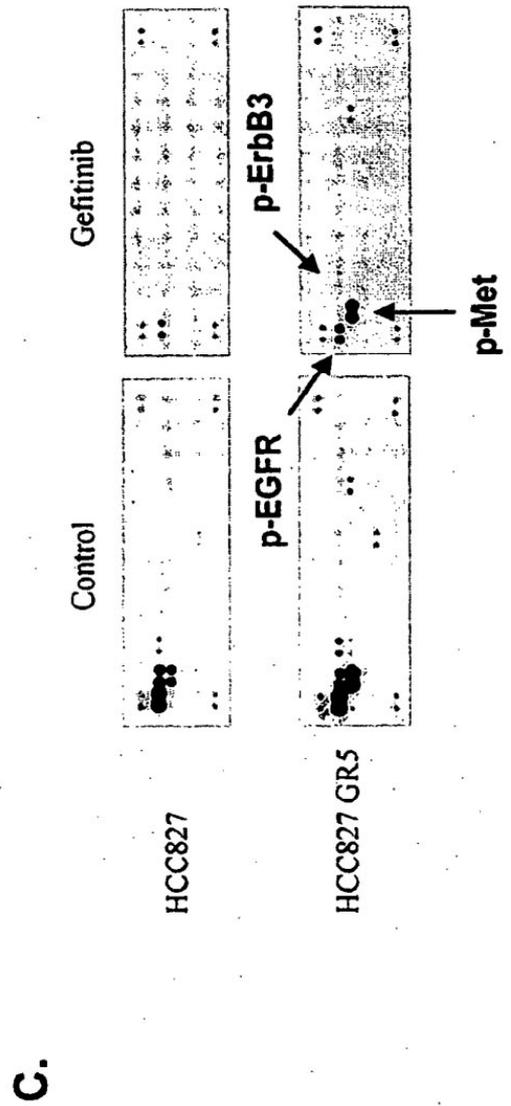
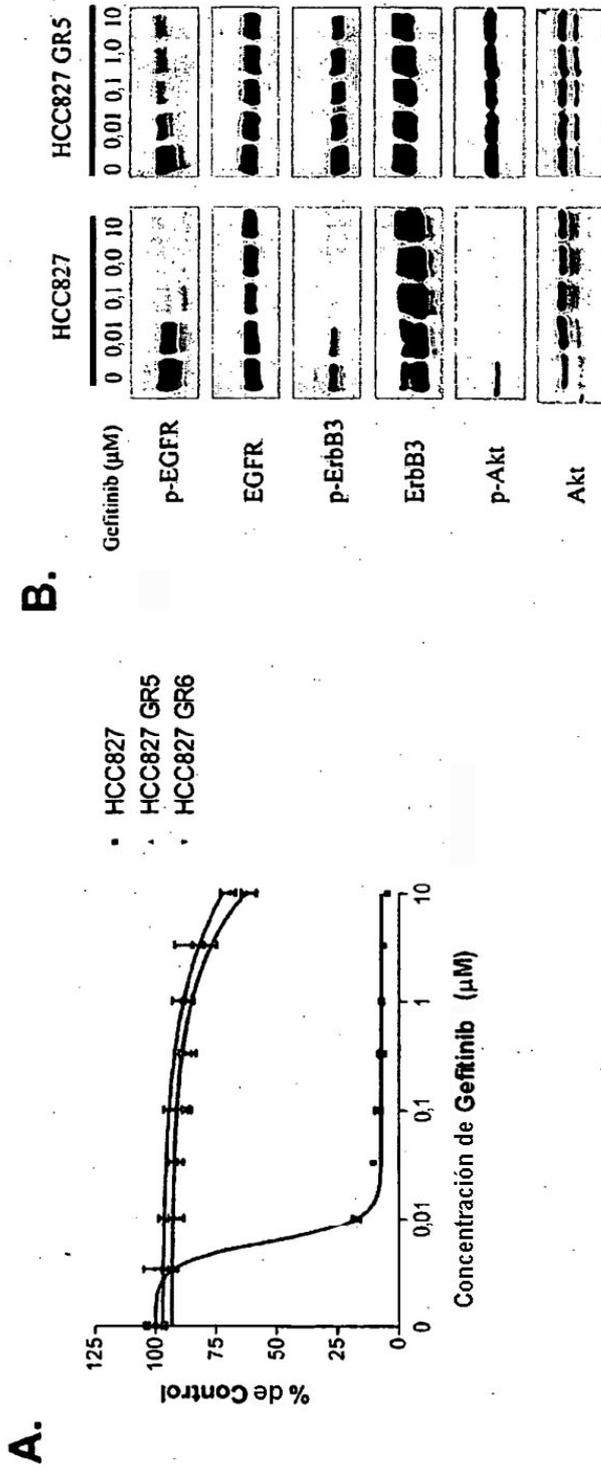


Fig. 1A-C

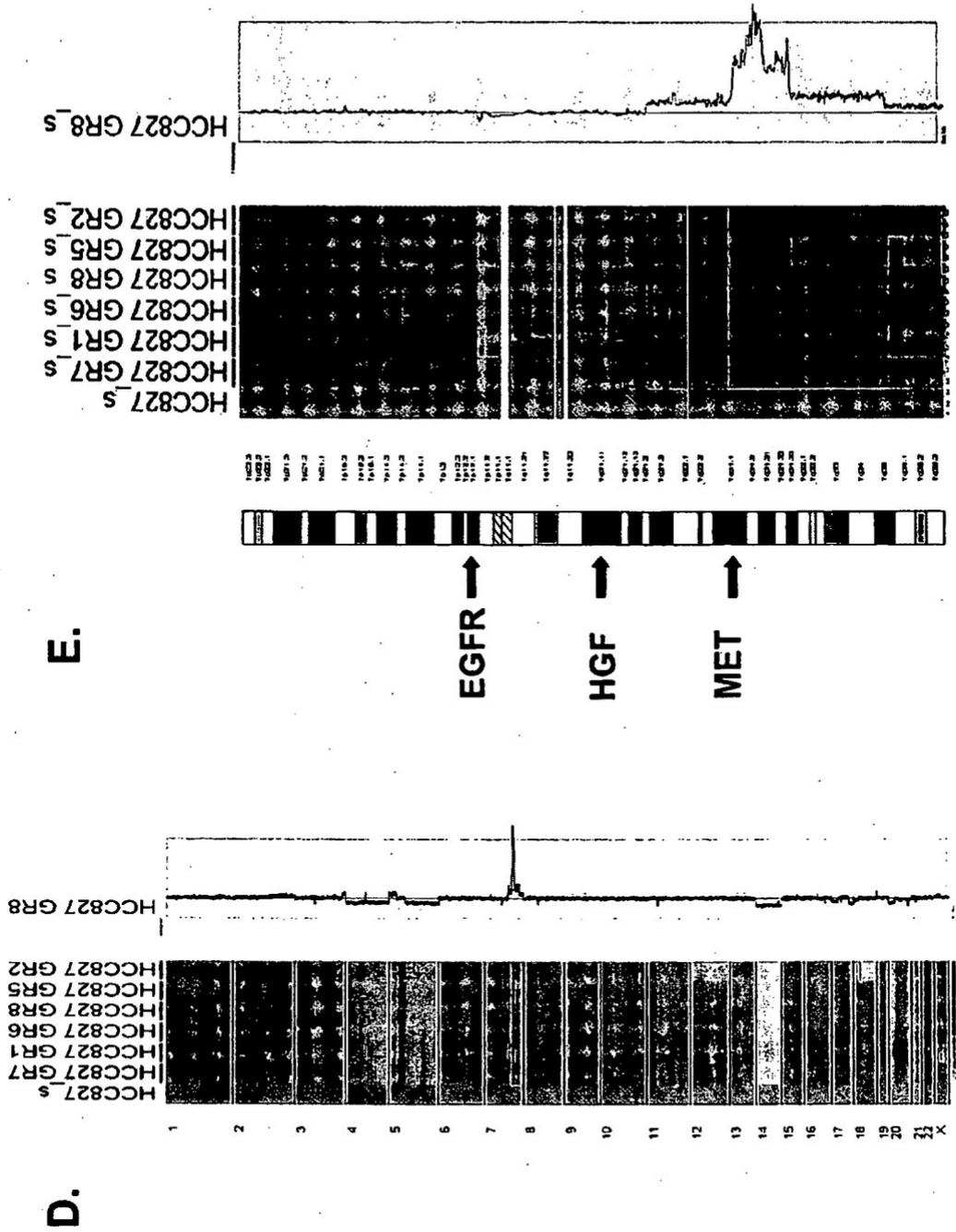


Fig. 1D-E

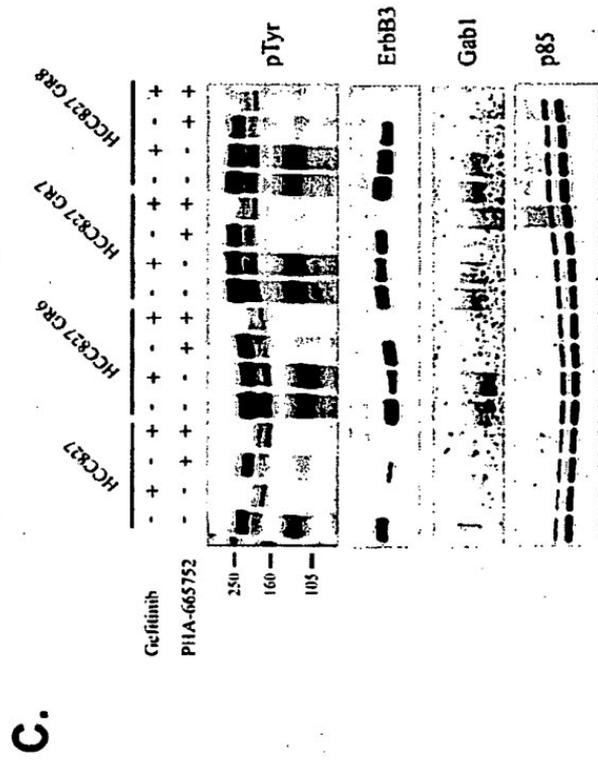
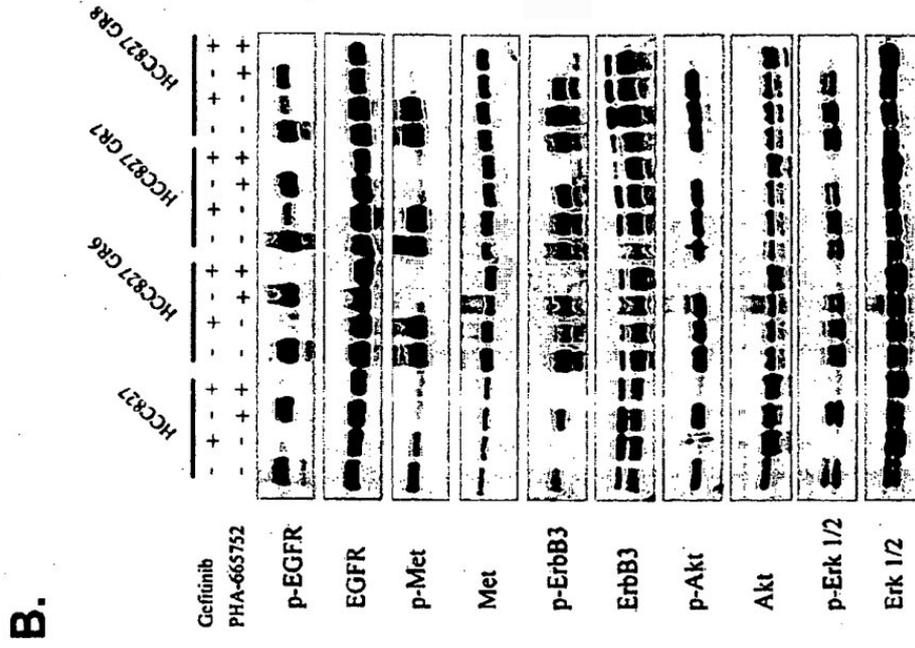
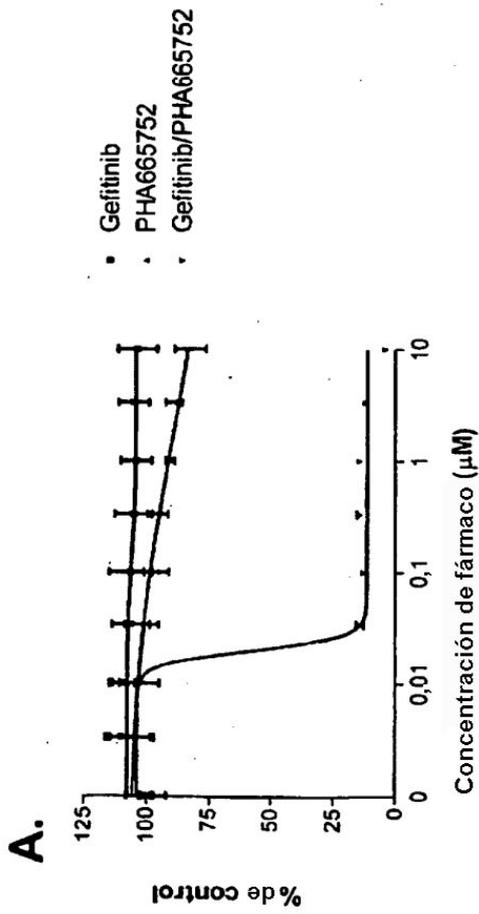


Fig. 2A-C

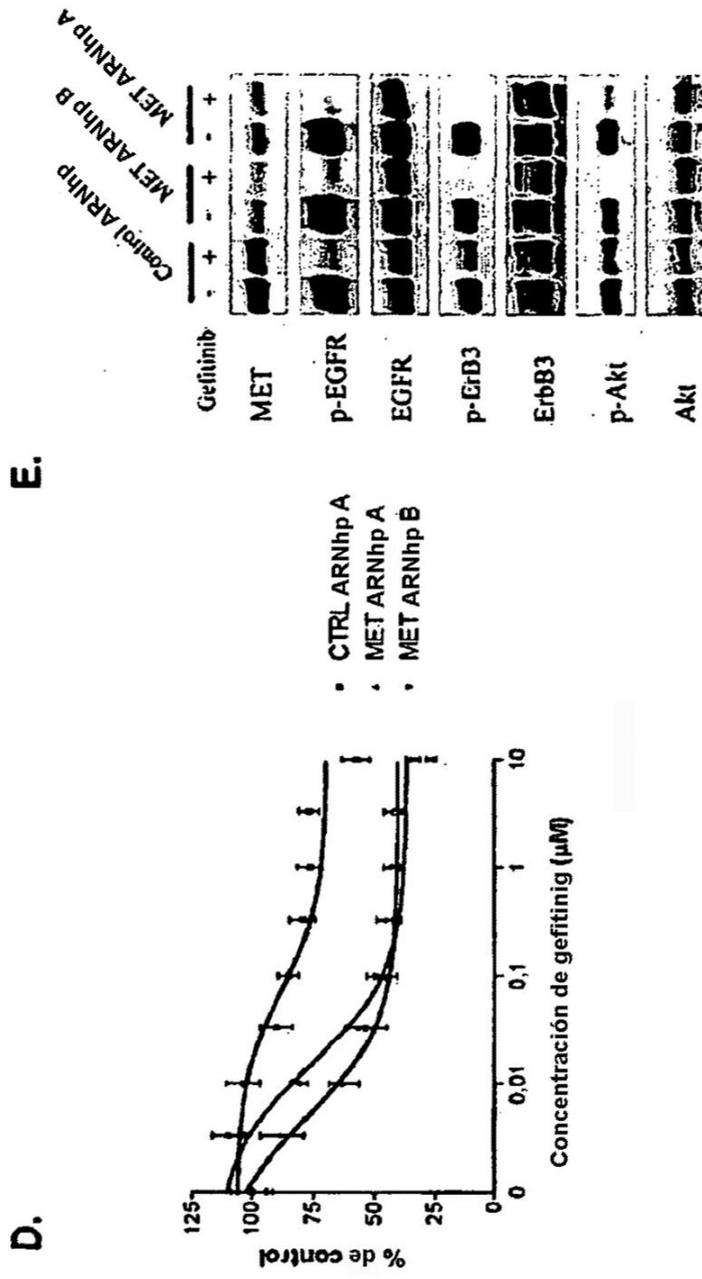


Fig. 2D-E

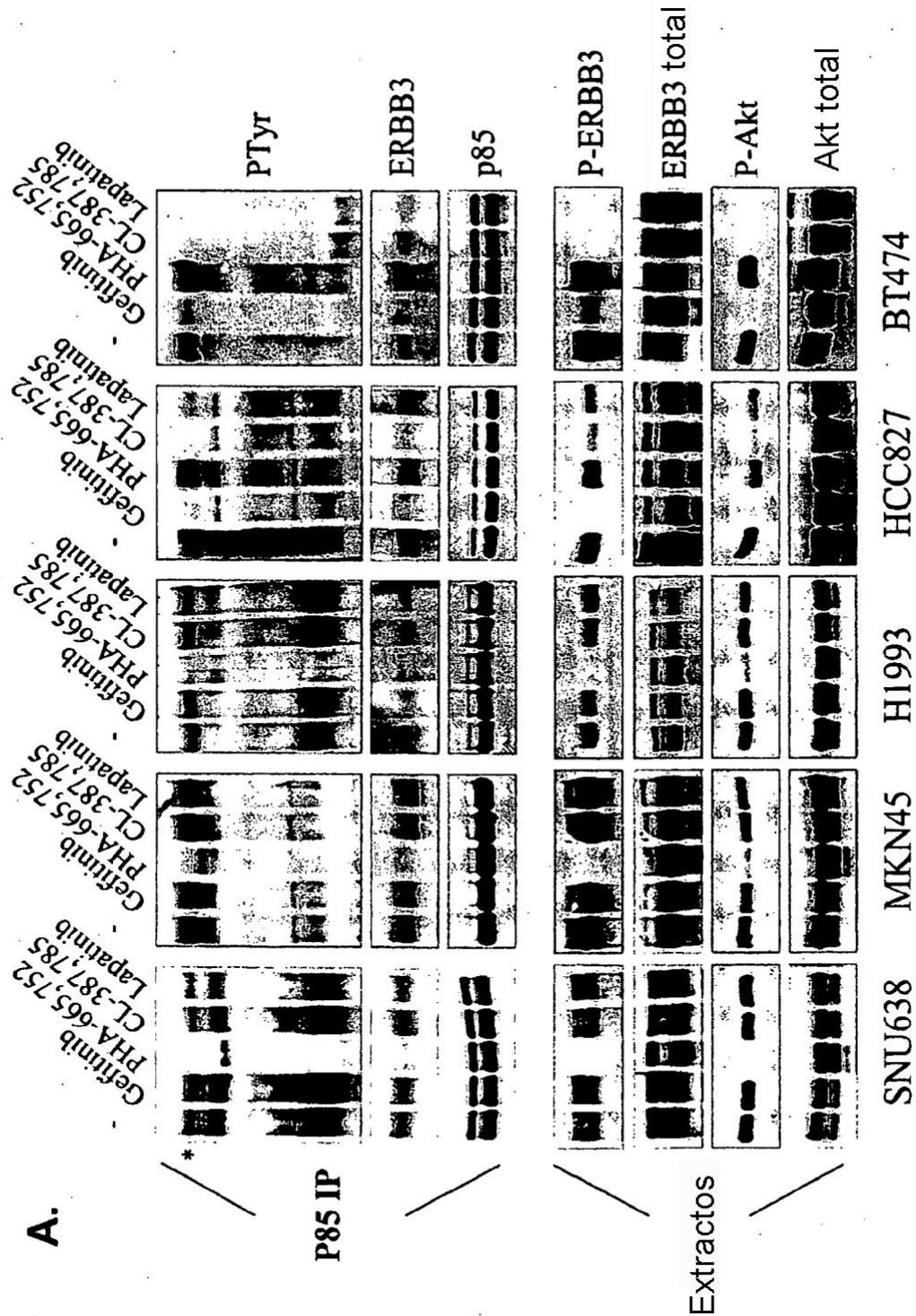
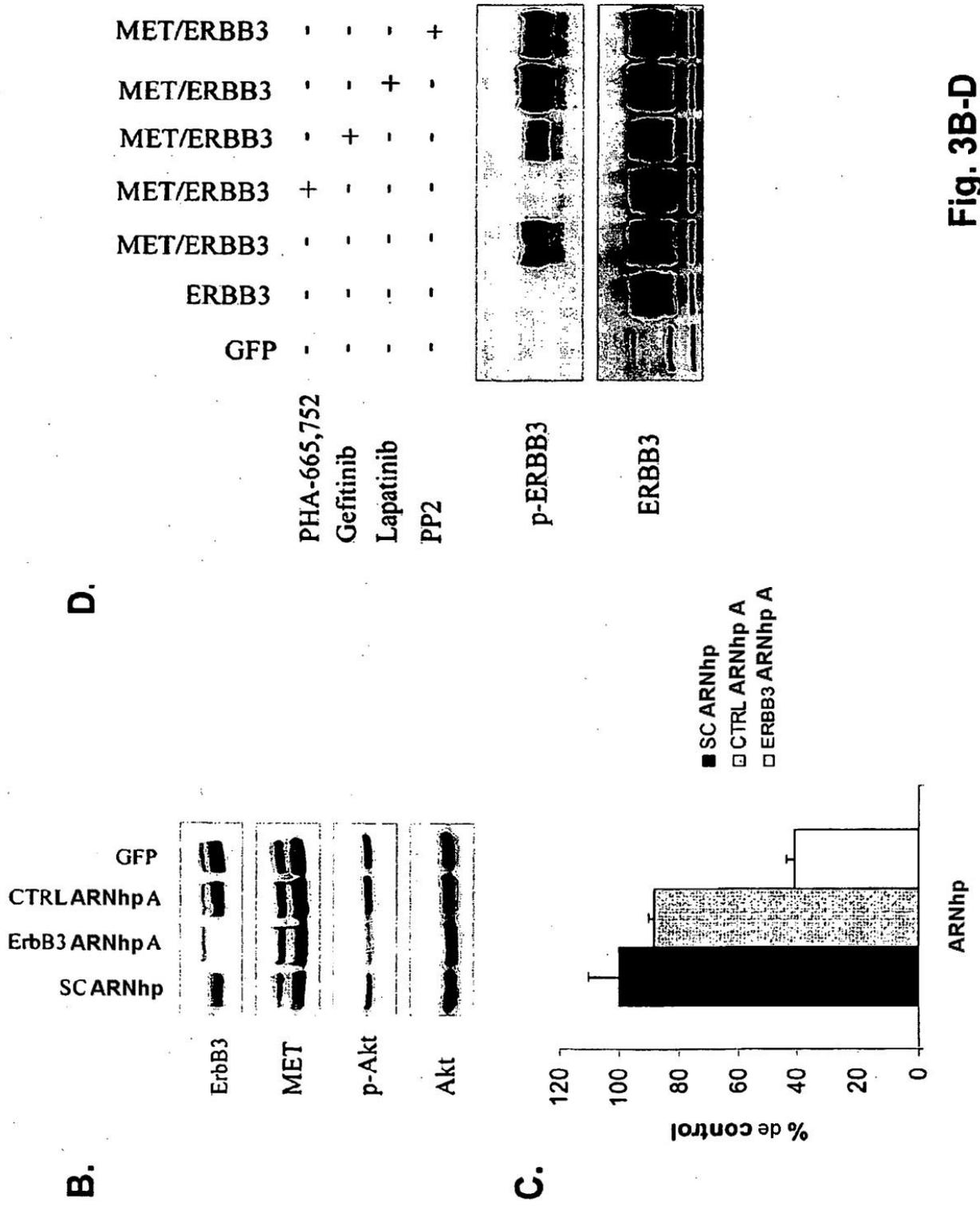


Fig. 3A



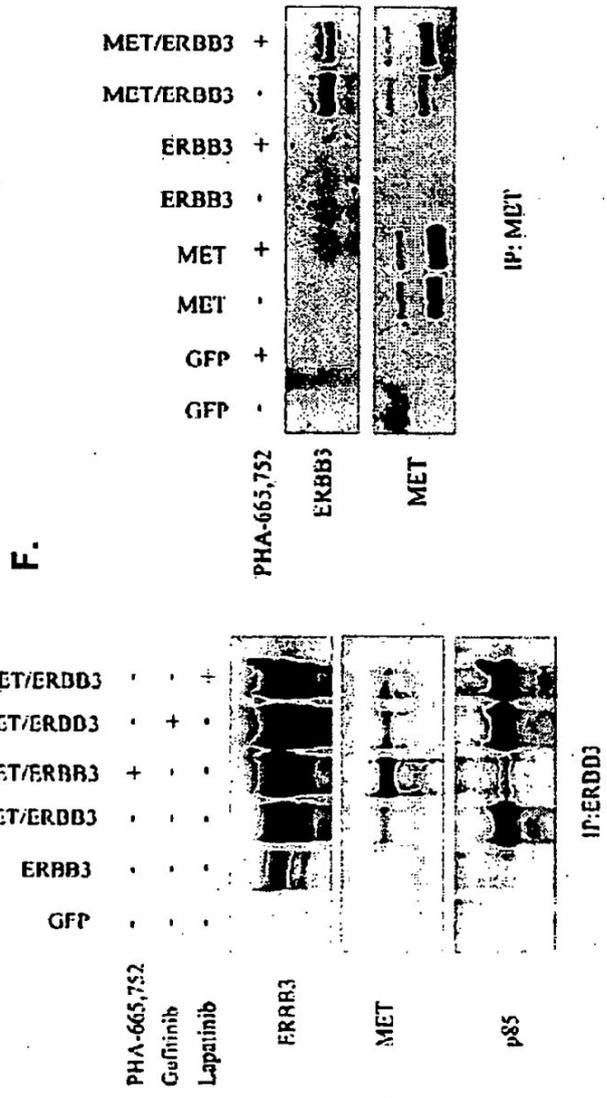


Fig. 3E-F

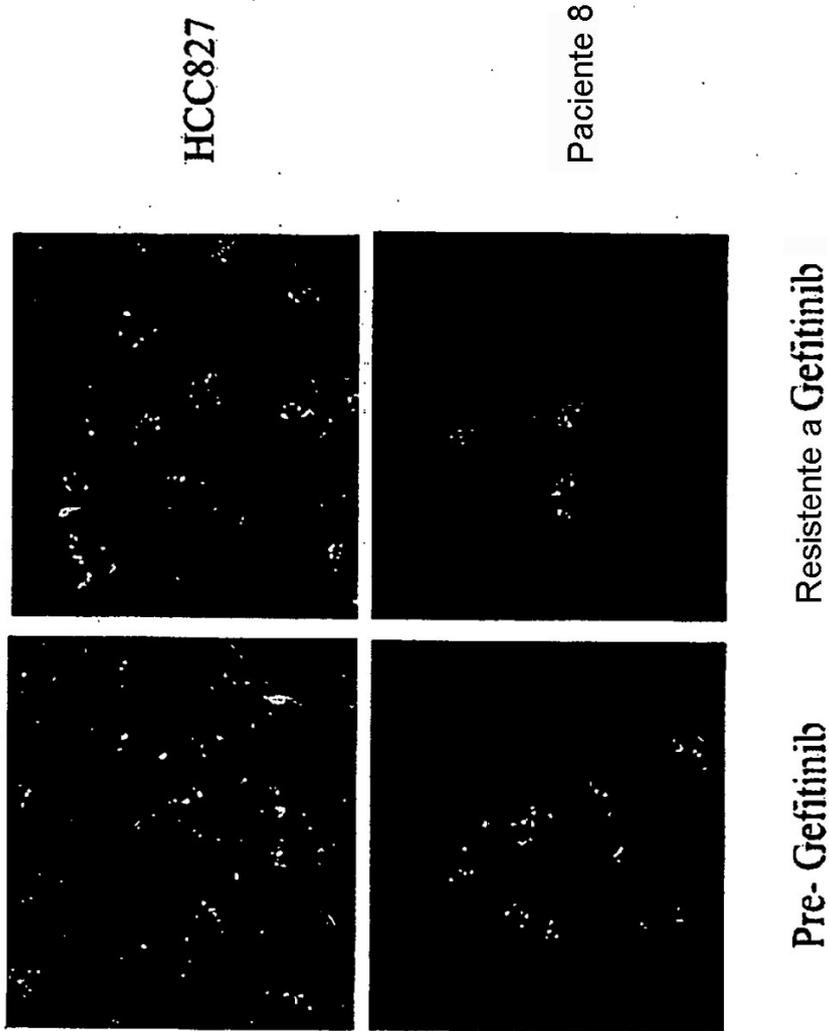


Fig. 4

Paciente	Espécimen	Tipo	Mutación de EGFR	T790M	Procedimiento	Resultado
Especímenes emparejados						
1	Pre-gefitinib	Cáncer primario de pulmón	L858R	No	QPCR	2,10 (0,27)
	Post-gefitinib	Derrame pleural	L858R	No	QPCR	5,83 (1,41)*
2	Pre-gefitinib	Cáncer primario de pulmón	Del L747 P753 ins S	No	QPCR	1,83 (0,45)
	Post-gefitinib	Ganglio cervical	Del L747 P753 ins S	Sí	QPCR	1,97 (0,15)
3	Pre-gefitinib	Cáncer primario de pulmón	Del L747_P753 ins S	No	QPCR	1,87 (0,38)
	Post-gefitinib	Cáncer primario de pulmón	Del L747 P753 ins S	No	QPCR	1,75 (0,94)
4	Pre-gefitinib	Cáncer primario de pulmón	Del L747 E749, A750P	No	QPCR	3,07 (0,81)
	Post-gefitinib	Biopsia pleural	Del L747 E749, A750P	Sí	QPCR	3,17 (0,63)
5	Pre-gefitinib	Ganglio linfático	Del L747 S752del.E746V	No	FISH	0 %
	Post-gefitinib	Cerebro	Del L747 S752del.E746V	No	FISH	0 %
6	Pre-gefitinib	Pleura	Del L747~E749del, A750P	No	FISH	1 %
	Post-gefitinib	Pericardio	Del L747 E749del, A750P	No	FISH	2 %
7	Pre-gefitinib	Pleura	Del L747 E749del, A750P	No	FISH	0 %
	Post-gefitinib	Hígado	Del L747 E749del, A750P	Sí	FISH	3 %
8	Pre-gefitinib	Pulmón	Del E746 A750	No	FISH	0 %
	Post-gefitinib	Ganglio linfático	Del E746_A750	No	FISH	26 %*
Especímenes con tratamiento posterior						
9	Post-gefitinib	Derrame pleural	Del E746 A750	No	QPCR	2,30 (0,25)
10	Post-gefitinib	Ganglio linfático axilar	L858R	No	QPCR	1,98 (0,48)
11	Post-gefitinib	Cáncer primario de pulmón	L858R	Sí	QPCR	1,92 (0,46)
12	Post-gefitinib	Cáncer primario de pulmón	Del L747_T751.K754E	Sí	QPCR	3,90 (0,61)
	Post-gefitinib	Ganglio linfático mediastínico	Del L747~T751, K754E	No	QPCR	6,58 (1,35)*
13	Post-gefitinib	Cáncer primario de pulmón	L858R	Sí	QPCR	58,21 (7,69)*
14	Post-gefitinib	Metástasis pulmonar	L858R	Sí	QPCR	1,86 (0,23)
15	Post-gefitinib	Cáncer primario de pulmón	L858R	No	QPCR	1,92 (0,23)
16	Post-erlotinib	Metástasis pulmonar	Del E746 A750	Sí	FISH	0 %
17	Post-gefitinib	Metástasis pulmonar	Del L747 T751	Sí	FISH	0 %
18	Post-gefitinib	Metástasis pulmonar	L858R	Sí	FISH	0 %
				Pacientes con EGFR T790M	55 % (10/18)	
				Pacientes con amplificación de MET		4/18 (22 %)

Fig. 5

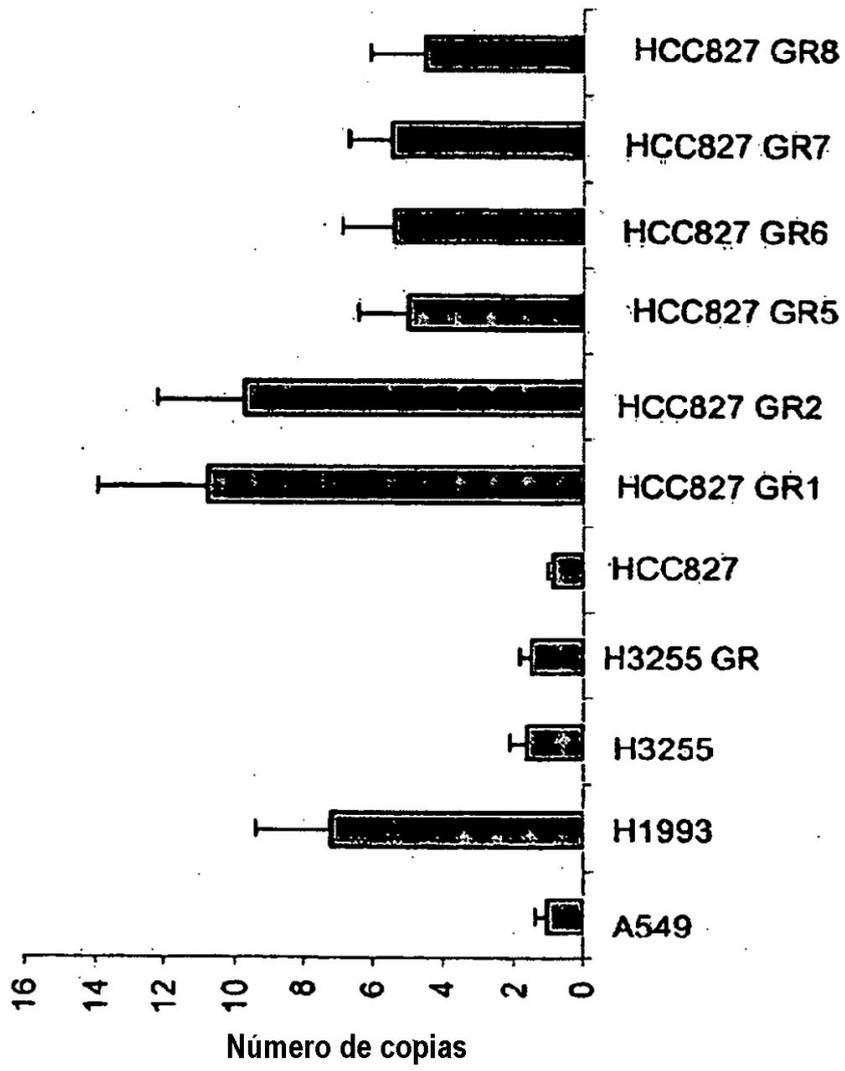


Fig.6

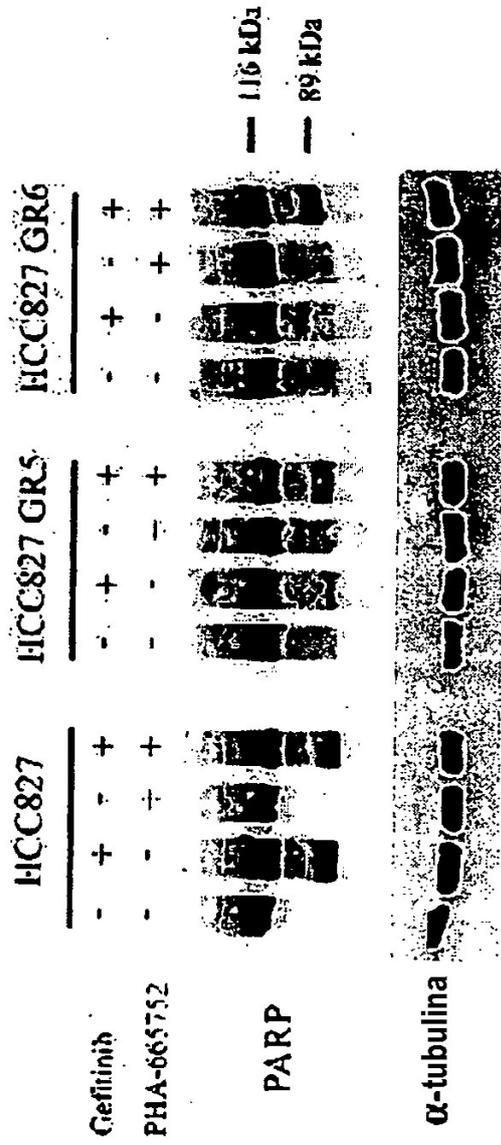


Fig. 7

Gen	Localización cromosómica	Media del cambio múltiplo
factor de transcripción EC	7q31.2	48,42
proteína accesoria del receptor de interleucina I tipo I	Xp22.1-p21.3	33,50
factor de transcripción EC	7q31.2	27,20
proteína de unión a calcio S100 A4	1q21	20,34
mucina 20, asociada a superficie celular	N/A	19,00
fosfodiesterasa 2A, estimulada por cGMP	11q13.4	18,93
protooncogén met	7q31	16,41
proteína con protección (filamento de actina) línea Z de músculo, alfa 2	7q31.2-q31.3	15,92
colágeno, tipo VI, alfa 1	21q22.3	15,01
factor de transcripción EC	7q3U	14,99
protooncogén met	7q31	13,,85
colágeno, tipo VI, alfa 2	21q22.3	13,65
gen variante de ETS I	N/A	13,60
proteína accesoria del receptor de interleucina I tipo I	Xp22.1-p21.3	13,27
familia con similitud de secuencia 3, miembro C	N/A	12,77
protooncogén met	7q31	11,99
ADNC: FU21769 fis, cion COLF7354	N/A	11,12
mucina 20, asociada a superficie celular	N/A	10,77
grupo de alta movilidad AT-gancho 1	N/A	10,38
relacionado con Ras asociado con diabetes	16q22	9,83

Fig. 8

Paciente	Espécimen	Tipo	Células con > 2 MET > CEP 7	Células con > 3 MET > CEP 7
5	Pre-gefitinib	Ganglio linfático	2 %	0 %
	Post-gefitinib	Cerebro	1 %	0 %
6	Pre-gefitinib	Pleura	3 %	0 %
	Post-gefitinib	Pericardio	2 %	0 %
7	Pre-gefitinib	Pleura	0 %	0 %
	Post-gefitinib	Hígado	4 %	3 %
8	Pre-gefitinib	Pulmón	3 %	0 %
	Post-gefitinib	Ganglio linfático	59 %	26 %
16	Post-erlotinib	Metástasis pulmonar	4 %	2 %
17	Post-gefitinib	Metástasis pulmonar	0 %	0 %
18	Post-gefitinib	Metástasis pulmonar	0 %	0 %

Fig. 9

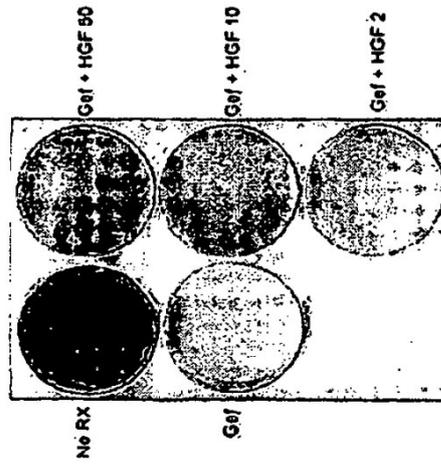
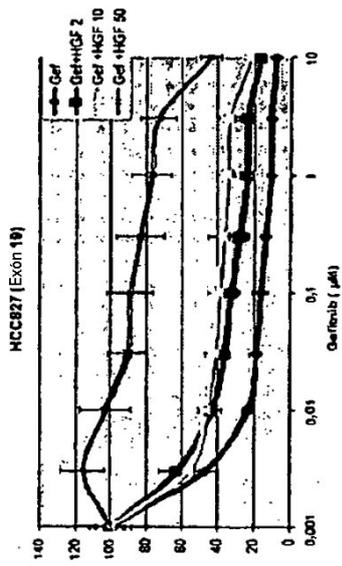
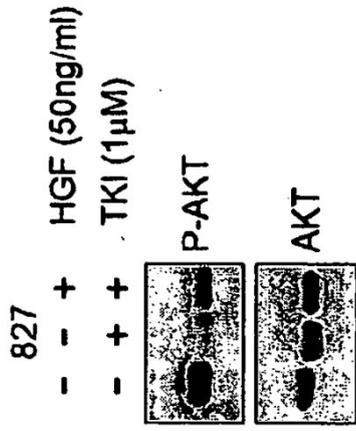


Fig. 10