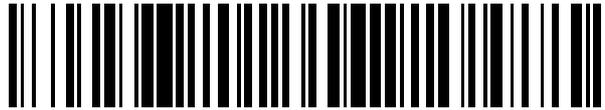


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 438**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2007 E 11170400 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2386655**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón utilizando el gen de KIT o KDR como marcador genético**

30 Prioridad:

12.09.2006 US 825369 P

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

02.03.2015

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**CHANT, JOHN;
GUERRERO, ANTHONY, S.;
HAVERTY, PETER;
HONCHELL, CYNTHIA;
JUNG, KENNETH y
WU, THOMAS, D.**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 530 438 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

Procedimientos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón utilizando el gen de KIT o KDR como marcador genético

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para el diagnóstico y composiciones para el tratamiento de cánceres asociados con la amplificación génica.

ANTECEDENTES

[0002] El cáncer se caracteriza por un aumento en el número de células anómalas, o neoplásicas, derivadas de un tejido normal que proliferan y, en determinadas circunstancias, invaden tejidos adyacentes y finalmente se metastatizan a través de la sangre o del sistema linfático. La alteración de la expresión génica está íntimamente relacionada con el crecimiento celular incontrolado y la dediferenciación, que son características frecuentes del cáncer. Determinados cánceres se caracterizan por la sobreexpresión de determinados genes, es decir, oncogenes. Un mecanismo bien conocido de la sobreexpresión génica en las células cancerígenas es la amplificación génica. La amplificación génica es un proceso en el que se producen múltiples copias de uno o más genes en el cromosoma de una célula. En ciertos casos, el proceso implica la replicación no programada de la región del cromosoma que contiene estos genes, seguida de la recombinación de los segmentos replicados de nuevo dentro del cromosoma (Alitalo y col., Adv. Cancer Res., 47:235-281 [1986]). En determinados casos, la sobreexpresión de un gen se correlaciona con la amplificación génica, es decir, es proporcional al número de copias producidas.

[0003] La amplificación y/o sobreexpresión de determinados protooncogenes, es decir, aquellos que codifican factores de crecimiento y receptores de los factores de crecimiento, tiene una función importante en la patogénesis de diversos tumores humanos. En ciertos casos, la amplificación y/o sobreexpresión se asocian con formas más malignas del cáncer y, por tanto, pueden predecir el resultado clínico (Schwab y col., Genes Chromosomes Cancer, 1:181-193 [1990]; Alitalo y col., *supra*). Por ejemplo, el gen humano *erbB2* (también conocido como *her2* o *c-erbB-2*), que codifica un receptor de glicoproteína transmembrana de 185 kd (p185^{HER2} o HER2) relacionado con el receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR, se sobreexpresa en aproximadamente el 25% a 30% de los cánceres de mama humanos (Slamon y col., Science, 235:177-182 [1987]; Slamon y col., Science, 244:707-712 [1989]). La sobreexpresión de *erbB2* se considera un factor de predicción de un mal pronóstico, especialmente en pacientes con enfermedad primaria que afecta a los ganglios linfáticos axilares (Slamon y col., [1987] y [1989], *supra*; Ravdin y Chamness, Gene, 159:19-27 [1995] y Hynes y Stern, Biochim. Biophys. Acta, 1198:165-184 [1994]). La sobreexpresión de *erbB2* también se ha ligado a la sensibilidad y/o resistencia a determinada terapia hormonal y a regímenes quimioterapéuticos, incluyendo CMF (ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo) y antraciclinas (Baselga y col., Oncology, 11 (3 supl. 1): 43-48 [1997]). Sin embargo, los pacientes que sobreexpresan *erbB2* muestran una respuesta mayor al tratamiento con taxanos. *Id.*

[0004] La sobreexpresión de *erbB2* ha proporcionado la base para los tratamientos dirigidos de cáncer de mama. Se ha utilizado con éxito un anticuerpo monoclonal anti-ErbB2 (anti-HER2) humanizado recombinante (Herceptin™, Genentech, Inc.) para tratar a pacientes con cáncer de mama metastásico que sobreexpresa ErbB2. (Baselga y col., J. Clin. Oncol., 14:737-744 [1996]).

[0005] Existe una necesidad continua de composiciones y procedimientos que se dirijan a los genes amplificados y a los productos de estos genes en el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

[0006] También existe la necesidad continua de composiciones y procedimientos para el diagnóstico y/o tratamiento del cáncer de pulmón. El carcinoma primario de pulmón afecta a más de 170.000 personas en los Estados Unidos cada año, el 86% de los cuales mueren a los cinco años del diagnóstico. El cáncer de pulmón es la causa principal de la muerte por cáncer tanto en hombres como mujeres, representando el 28% de las muertes por cáncer. Véase Minna (2005) "Neoplasms of the Lung," en Harrison's Principles of Internal Medicine, 16th ed., Kasper et al., eds. (Mac-Graw-Hill, USA), Capítulo 75.

[0007] SETO T et al. LUNG CANCER, volumen 53, no. 1, 1 de julio de 2006, examinaron el valor de pronóstico de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular y sus receptores flt-1 y KDR en el cáncer de pulmón de célula no pequeña de la fase I.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA

[0008] En un aspecto, se proporcionan procedimientos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de cánceres de pulmón asociados con la amplificación del gen de KDR.

[0009] En un aspecto, se proporciona un procedimiento para el diagnóstico de la presencia de un cáncer de pulmón en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la detección de si el gen de KDR está amplificado en una muestra

de pulmón para análisis del mamífero en relación con una muestra control, donde la amplificación del gen de KDR indica la presencia de cáncer de pulmón en el mamífero. En una realización, detectar si el gen de KDR está amplificado comprende detectar si el número de copias del gen de KDR está aumentado en al menos 5 veces.

5 **[0010]** En la presente invención, en la que se utiliza un antagonista de KDR, el antagonista de KDR es un anticuerpo anti-KDR, es un fragmento de anticuerpo anti-KDR, es un oligopéptido que se une a KDR, es una forma soluble de KDR o es un ácido nucleico antisentido de 10-30 nucleótidos de longitud que se une a y reduce la expresión de un ácido nucleico que codifica KDR.

10 **[0011]** En otro aspecto, se proporciona un antagonista de KDR para utilizar en un procedimiento de tratamiento de un cáncer de pulmón asociado con la amplificación del gen de KDR, comprendiendo el procedimiento administrar a un individuo que tiene el cáncer de pulmón una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende el antagonista de KDR. En una realización, el antagonista de KDR es un anticuerpo anti-KDR. En una realización, el anticuerpo anti-KDR se une al dominio extracelular de KDR. En una realización, el anticuerpo anti-KDR es un fragmento de anticuerpo. En una realización, el anticuerpo anti-KDR es un anticuerpo quimérico o humanizado. En una realización, el anticuerpo anti-KDR es un anticuerpo humano. En una realización, el antagonista de KDR es un oligopéptido que se une a KDR. En una realización, el antagonista de KDR es una forma soluble de KDR. En una realización, el antagonista de KDR es un ácido nucleico antisentido de 10-30 nucleótidos de longitud que se une a y reduce la expresión de un ácido nucleico que codifica KDR.

20 **[0012]** En otro aspecto, se proporciona un formulación farmacéutica que comprende (a) un anticuerpo anti-KDR citotóxico o (b) un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-KDR y un agente citotóxico para utilizar en un procedimiento de tratamiento de un cáncer de pulmón asociado con la amplificación del gen de KDR, comprendiendo el procedimiento administrar a un individuo que tiene el cáncer de pulmón una cantidad eficaz de la formulación farmacéutica. En una realización, el procedimiento comprende administrar a un individuo que tiene el cáncer de pulmón una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-KDR citotóxico. En una realización, el procedimiento comprende administrar a un individuo que tiene el cáncer de pulmón una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-KDR y un agente citotóxico. En una realización, el agente citotóxico es un maitansinoide o una auristatina.

25 **[0013]** En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para determinar si un individuo que tiene un cáncer de pulmón responderá a un agente terapéutico que reconoce KDR o el gen de KDR, comprendiendo el procedimiento determinar si el gen de KDR está amplificado en el cáncer de pulmón, en donde la amplificación del gen de KDR indica que el individuo responderá al agente terapéutico. En una realización, el agente terapéutico se selecciona entre (a) un antagonista de KDR, (b) un anticuerpo anti-KDR citotóxico, o (c) un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-KDR y un agente citotóxico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

40 **[0014]** En la Figura 1 se muestra el análisis del número de copias de ADN para el cromosoma 4 en cinco muestras de tumor de pulmón. En la Figura 2 se muestra el análisis del número de copias de ADN para una región del cromosoma 4 desde aproximadamente el nucleótido 50.000.000 a 60.000.000 en las cinco muestras de tumor de pulmón descritas en la figura 1. En la Figura 2 también se muestran las localizaciones de los marcos de lectura abiertos que aparecen dentro de la región del cromosoma 4 mostrada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

50 **[0015]** Se proporcionan procedimientos para el diagnóstico y composiciones para el tratamiento de cánceres asociados con la amplificación génica. En ciertas realizaciones, la invención proporciona procedimientos y composiciones para el tratamiento del cáncer de pulmón asociado con la amplificación del gen de KDR.

I. DEFINICIONES

55 **[0016]** Las frases "amplificación génica" y "duplicación génica" (y variantes como "amplificación de un gen" o "duplicación de un gen") se usan indistintamente y se refieren a un proceso por el cual se forman múltiples copias de un gen o fragmento génico en una célula o línea celular particular. La región duplicada (un tramo de ADN amplificado) se refiere a menudo como un "amplicón". Normalmente, la cantidad del ARN mensajero (ARNm) producida, es decir, el nivel de expresión génica, también aumenta en proporción al número de copias hechas del gen en particular.

60 **[0017]** El término "PDGFRA", tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas nativo de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamífero, tales como primates (por ejemplo, humanos y monos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término comprende PDGFRA no procesado de "longitud completa", así como cualquier forma de PDGFRA que

resulta del procesado en la célula. El término también comprende variantes naturales de PDGFRA, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas y otras isoformas. El término también comprende fragmentos o variantes de un PDGFRA nativo que mantienen por lo menos una actividad biológica de PDGFRA.

5 **[0018]** El término "KIT", tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier c-Kit nativo de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamífero, tales como primates (por ejemplo, humanos y monos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término comprende KIT no procesado de "longitud completa", así como cualquier forma de KIT que resulta del procesado en la célula. El término también comprende variantes naturales de KIT, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas y otras isoformas. El término también
10 comprende fragmentos o variantes de un KIT nativo que mantienen por lo menos una actividad biológica de KIT.

[0019] El término "KDR", tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier receptor de dominio de inserción de quinasa nativo de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamífero, tales como primates (por ejemplo, humanos y monos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término comprende KDR
15 no procesado de "longitud completa", así como cualquier forma de KDR que resulta del procesado en la célula. El término también comprende variantes naturales de KDR, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas y otras isoformas. El término también comprende fragmentos o variantes de un KDR nativo que mantienen por lo menos una actividad biológica de KDR.

20 **[0020]** El término "PRO" se refiere a cualquiera entre PDGFRA, KIT, o KDR, a menos que se indique lo contrario.

[0021] Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que se asocian con cierto grado de proliferación celular anómala, tal como cáncer.

25 **[0022]** "Tumor", tal como se utiliza aquí, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásicos, tanto malignos como benignos, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son exclusivos entre sí tal como se refieren en este documento.

30 **[0023]** Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que habitualmente se caracteriza por un crecimiento/proliferación celular no regulada. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin), blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más en particular de estos cánceres son carcinoma de células escamosas, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón,
35 cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioma, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de pulmón, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, carcinoma de riñón, cáncer hepático, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otras enfermedades linfoproliferativas y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

40 **[0024]** El término "cáncer de pulmón" se refiere a cualquier cáncer del pulmón, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma de pulmón microcítico y carcinoma de pulmón no microcítico, incluyendo el último, pero sin limitación, adenocarcinoma, carcinoma escamoso y carcinoma de célula grande.

45 **[0025]** El término "neoplasma" o "célula neoplásica" se refiere a tejido o célula anormal que prolifera más rápidamente que los correspondientes tejidos o células normales y continúa creciendo después de la eliminación del estímulo que inició el crecimiento.

50 **[0026]** Una "célula de cáncer de pulmón" se refiere a una célula de cáncer de pulmón, ya sea in vivo o in vitro, y comprende líneas celulares derivadas de células de cáncer de pulmón.

[0027] Tal como se utiliza aquí, "tratamiento" (y variaciones como "tratar" o "tratando") se refieren a una intervención clínica en un intento por alterar la evolución natural del individuo o de la célula que está siendo tratada, y puede realizarse como profilaxis o durante la evolución de la patología clínica. Entre los efectos deseables del tratamiento se incluyen prevenir la aparición o recurrencia de la enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de la enfermedad y remisión o mejora del pronóstico.
55

60 **[0028]** Un "individuo" es un vertebrado. En determinadas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Entre los mamíferos se incluyen, pero sin limitaciones, animales de granja (como vacas), animales de compañía, mascotas (como gatos, perros o caballos), primates, ratones y ratas. En determinadas realizaciones, el mamífero es un humano.

65 **[0029]** Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

- 5 [0030] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención puede variar según factores, tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz abarca una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula se ve superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Habitualmente, pero no necesariamente, puesto que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa inicial de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz debería ser menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.
- 10 [0031] El término "agente citotóxico", tal como se utiliza aquí, se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o causa la muerte o destrucción celular. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, Ar²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas, tales como toxinas que son moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos descritos a continuación. A continuación se describen otros agentes citotóxicos. Un agente "tumoricida" causa la destrucción de las células tumorales.
- 20 [0032] Una "toxina" es cualquier sustancia capaz de tener un efecto perjudicial sobre el crecimiento o proliferación de una célula.
- 25 [0033] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes como tiotepa y CYTOXAN[®], ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamidas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL[®]); beta-lapacina; lapacol; colquicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN[®]), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR[®]), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposido; criptoficinas (especialmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina, mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafacina, cholofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato del óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enedina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma I y caliqueamicina omega II (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos de cromoproteínas relacionadas de antibióticos de enedina), aclacinomisinina, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina de ADRIAMYCIN[®] (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziouona; elfornitina; acetato de eliptino; una epotilona; etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK[®] (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziouona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente la toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE[®], FILDESIN[®]); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel de TAXOL[®] (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE[™] sin Cremofor, formulación de nanopartículas de paclitaxel diseñadas con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y docetaxel de TAXOTERE[®] (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR[®]); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN[®]); platino (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN[®]); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE[®]); novantrona; edatraxato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina

(DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquier de los anteriores, así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

[0034] También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer y, a menudo, están en forma de tratamiento sistémico, o para el cuerpo completo. Pueden ser hormonas ellos mismos. Entre los ejemplos se incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno de NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; antiprogesteronas; reguladores por disminución de los receptores de estrógenos (ERD); agentes que actúan para suprimir o anular las funciones de los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), tales como LUPRON® y ELIGARD® acetato de leuprolóido, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, los que regulan la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megesterol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RNISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID® o risedronato ACTONEL®; así como troxacitabina (un análogo del nucleósido de citosina 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, especialmente aquellos que inhiben la expresión de los genes de las rutas de señalización implicados en la proliferación de células aberrantes, tales como por ejemplo, alfa-PKC, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas, tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; lapatinib ditosilato (una pequeña molécula inhibidora de la tirosina quinasa dual ErbB-2 y EGFR también conocida como GW572016); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

[0035] Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en este documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa PRO) *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser aquel que reduzca significativamente el porcentaje de células (tales como una célula que expresa PRO) en fase S. Entre los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento se incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto a la fase S), tales como agentes que inducen la detención en G1 y la detención en fase M. Entre los bloqueantes de la fase-M clásicos se incluyen los derivados de la vinca (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de la topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen el ciclo celular en la fase G1 también afectan a la detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami y col. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerígenos derivados ambos del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos previniendo la despolimerización, lo que da lugar a la inhibición de la mitosis celular.

[0036] Tal como se utiliza aquí, el término "inhibidor de EGFR" se refiere a compuestos que se unen o en cualquier caso interaccionan directamente con EGFR y evitar o reducir su actividad de señalización, y es referido alternativamente como un "antagonista de EGFR". Entre los ejemplos de dichos agentes se incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase la patente de Estados Unidos No. 4.943. 533, Mendelsohn et al.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano reconformado (H225) (véase, WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11 F8, un anticuerpo dirigido a EGFR completamente humano (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (Patente de Estados Unidos No. 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR tal como se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF o Panitumumab (véase WO98/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab), un anticuerpo de EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compite con EGF y TGF-alfa por la unión a EGFR (EMD/Merck); anticuerpo de EGFR humano, HuMax-EGFR (GenMab); anticuerpos totalmente humanos conocidos como E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6. 3 y E7.6. 3 y descritos en la patente de Estados Unidos 6.235.883; MDX-447 (Medarex Inc); y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR se puede conjugar con un agente citotóxico, generando así un inmunocombinado (véase, por ejemplo, EP659,439A2, Merck Patent GmbH). Los antagonistas de EGFR incluyen moléculas pequeñas, tales como compuestos descritos en las

Patentes de Estados Unidos Nos: 5,616,582, 5,457,105, 5,475,001, 5,654,307, 5,679,683, 6,084,095, 6,265,410, 6,455,534, 6,521,620, 6,596,726, 6,713,484, 5,770,599, 6,140,332, 5,866,572, 6,399,602, 6,344,459, 6,602,863, 6,391,874, 6,344,455, 5,760,041, 6,002,008, y 5,747,498, así como las siguientes publicaciones PCT: WO98/14451, WO98/50038, WO99/09016, y WO99/24037. Los antagonistas de EGFR de molécula pequeña particulares incluyen OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-, diclorhidrato, Pfizer Inc.); ZD1839, gefitinib (IRESSA™) 4-(3'-Cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi) quinazolina, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-N2-(1-metilpiperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidina-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletil) amino]-1H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)- 4-[(1-feniletil)amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil) amino]-6-quinazolinil]-2-butanamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4- fluorofenil) amino]- 3-ciano-7-etoxi- 6- quinolinil]- 4-(dimetilamino)- 2- butenamida) (Wyeth); AG1478 (Pfizer); AG 1571 (SU 5271; Pfizer); inhibidores de tirosina quinasa duales EGFR/HER2, tales como lapatinib (TYKERB®, GSK572016 o N-[3-cloro-4-[(3-fluorofenil) metoxil]fenil]6[5[[2-metilsulfonil) etil] amino] metil]- 2- furanil]- 4- quinazolinamina; Glaxo-SmithKline).

[0037] Un "inhibidor de tirosina quinasa" es una molécula que inhibe la actividad de tirosina quinasa de una tirosina quinasa, tal como un receptor HER. Ejemplos de dichos inhibidores incluyen los fármacos dirigidos a EGFR indicados en el párrafo anterior; in hbididor de tirosina quinasa de HER2 de molécula pequeña, ta como TAK165 disponible en Takeda; CP-724,714, un inhibidor selectivo oral del receptor tirosina quinasa ErbB2 (Pfizer y OSI); inhibidores de HER duales, tales como EKB-569 (disponible de Wyeth) que se unen preferiblemente a EGFR, pero inhiben las células que sobreexpresan tanto HER2 como EGFR; lapatinib (GSK572016; disponible de Glaxo-SmithKline), un inhibidor oral de tirosina quinasa de HER2 y EGFR; PKI-166 (disponible de Novartis); inhibidores pan-HER, tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores Raf-1, tales como agente antisentido ISIS-5132 disponible de ISIS Pharmaceuticals que inhiben la señalización de Raf-1; inhibidores de TK no dirigidos a HER, tales como mesilato de imatinib (GLEEVEC™, disponible de Glaxo SmithKline); inhibidores de tirosina quinasa multi-dirigidos, tales como sunitinib (SUTENT®, disponible de Pfizer); inhibidores de tirosina quina de receptor de VEGF, tales como vatalanib (PTK787/ZK222584, disponible de Novartis/Schering AG); inhibidor CI-1040 de uinasa I regulada por MAPK extracelular (disponible de Pharmacia); indolinonas (véase, por ejemplo, Mohammadi et al. (1997) Science 276:955-960); quinazolininas, tales como PD 153035,4-(3-cloroanilino) quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d] pirimidinas; curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen grupos nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); 1-tert-butil-3-[6-(3,5-dimetoxi-fenil)-2-(4-dietilamino-butilamino)-pirido [2,3- d]pirimidin-7-il]-urea ("PD173074") (véase, por ejemplo, Moffa et al. (2004) Mol. Cancer Res. 2:643-652); 3-[3-(2-carboxietil)-4-metilpirrol-2-metilidenil]-2-indolinona ("SU5402," Calbiochem) (véase, por ejemplo, Bernard-Pierrot (2004) Oncogene 23: 9201-9211); moléculas antisentido (por ejemplo, las que se unen a ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (Patente de Estados Unidos No. 5,804,396); trifostinas (Patente de Estados Unidos No. 5,804,396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores pan-HER, tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de imatinib (GLEEVEC™); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Pfizer); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o tal como se describir en cualquiera de las siguientes publicaciones de patentes: Patente de Estados Unidos No. 5,804,396; WO 1999/09016 (American Cyanamid); WO 1998/43960 (American Cyanamid); WO 1997/38983 (Warner Lambert); WO 1999/06378 (Warner Lambert); WO 1999/06396 (Warner Lambert); WO 1996/30347 (Pfizer, Inc); WO 1996/33978 (Zeneca); WO 1996/3397 (Zeneca); y WO 1996/33980 (Zeneca).

[0038] El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza, parcial o completamente, una actividad biológica de un polipéptido, tal como PRO, o la transcripción o traducción del mismo. Entre las moléculas antagonistas adecuadas se incluyen, pero sin limitaciones, anticuerpos antagonistas, fragmentos polipeptídicos, oligopéptidos, moléculas orgánicas (incluyendo moléculas pequeñas), y ácidos nucleicos anti-sentido.

[0039] Los términos "anticuerpos" (Abs) e "inmunoglobulinas" (Igs) hacen referencia a glucoproteínas que tienen características estructurales similares. Mientras los anticuerpos muestran especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que generalmente carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos de esta última clase son producidos, por ejemplo, a niveles bajos por el sistema linfático y a niveles elevados por los mielomas.

[0040] Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpo (tal como se describe con más detalle a continuación). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado y/o madurado para afinidad.

[0041] El término "anticuerpo anti-PDGFR" o "un anticuerpo que se une a PDGFR" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a PDGFR con la afinidad suficiente como para que el anticuerpo sea útil como agente de

diagnóstico y/o terapéutico al reconocer PDGFRA. Preferiblemente, el grado de unión de un anticuerpo anti-PDGFRA a una proteína que no sea PDGFRA no relacionada es menor de aproximadamente el 10% de la unión del anticuerpo a PDGFRA determinada, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a PDGFRA tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-PDGFRA se une a un epítipo de PDGFRA que se conserva entre los PDGFRA de diferentes especies.

[0042] Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en este documento de forma indistinta para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo tal como se definen a continuación. En particular, los términos se refieren a un anticuerpo con cadenas pesadas que contiene la región Fc.

[0043] Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden sólo una parte de un anticuerpo intacto, en el que la parte retiene al menos una, y muchas de la mayoría o todas, las funciones normalmente asociadas con esta parte cuando se presenta en un anticuerpo intacto. En una realización, el fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión al antígeno del anticuerpo intacto y, por tanto, retiene la capacidad para unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, aquel que comprende la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando se presenta en un anticuerpo intacto, tal como su unión a FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función ADCC y unión al complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto.

[0044] Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión al antígeno unido a una secuencia Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

[0045] La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')_2 que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y sigue siendo capaz de provocar el entrecruzamiento con el antígeno.

[0046] "Fv" es un fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión al antígeno completo. En una realización, una especie Fv de dos cadenas consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y otro de la cadena ligera en estrecha asociación no covalente. En una especie Fv de cadena sencilla (scFV), un dominio variable de la cadena pesada y otro de la cadena ligera pueden estar unidos covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv de dos cadenas. Es en esta configuración en la que los tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, los seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad más baja que la del sitio de unión completo.

[0047] El fragmento Fab contiene los dominios variables de las cadenas pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de algunos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en este documento para el Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')_2 se obtuvieron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0048] Los fragmentos de anticuerpo "FV de cadena sencilla" o "scFV" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, donde estos dominios se presentan en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido scFv además comprende un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite al scFv formar la estructura deseada para unirse al antígeno. Para una revisión de los scFV, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

[0049] El término "diabodies" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un enlazador que sea demasiado corto como para permitir que los dos dominios de la misma cadena se apareen, se fuerza a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión al antígeno. Los diabodies pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diabodies se describen más exhaustivamente, por ejemplo en los documentos EP 404.097 y W093/1161 y en Hudson y col. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134 y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). También se describen triabodies y tetrabodies en Hudson y col. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

- 5 **[0050]** El término “anticuerpo monoclonal”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones naturales, que pueden presentarse en cantidades menores. Por tanto, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal incluye habitualmente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, donde la secuencia polipeptídica de unión a la diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a la diana a partir de diversas secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon a partir de diversos clones, como un grupo de clones de hibridomas, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Debería entenderse que una secuencia de unión a la diana seleccionada puede además alterarse, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada es también un anticuerpo monoclonal de esta invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que habitualmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige hacia un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que habitualmente no están contaminados por otras inmunoglobulinas.
- 10
- 15
- 20 **[0051]** El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que la producción del anticuerpo requiera ningún procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales usados según la presente invención pueden obtenerse mediante diversas técnicas incluyendo, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (por ejemplo, Kohler y col., *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición, 1988); Hammerling, y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 4.816.567, tecnologías de expresión de fagos (véase, por ejemplo, Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu y col., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee y col., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-12472 (2004) y Lee y col., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004) y las tecnologías para la producción de anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen partes o todos los loci de la inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO98/24893; WO96/34096; WO96/33735; WO91/10741; Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann y col., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); patentes de Estados Unidos Nº. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016; Marks y col., *Bio. Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).
- 25
- 30
- 35
- 40 **[0052]** Los anticuerpos monoclonales de este documento incluyen especialmente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica, u homóloga, a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico, u homólogo, a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de estos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos Nº. 4.816.567 y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).
- 45
- 50 **[0053]** Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en el que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tales como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden realizarse para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), que habitualmente es el de una inmunoglobulina humana. Para obtener detalles adicionales, véase Jones y col., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature* 332:323-329 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véase también los siguientes artículos y referencias citados en estos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).
- 55
- 60
- 65

[0054] Un "anticuerpo humano" es aquel que comprende una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la del anticuerpo producido por un humano y/o se ha construido usando cualquiera de las técnicas para obtener anticuerpos humanos tal como se describe en este documento. Estas técnicas incluyen el cribado de bibliotecas combinatoriales derivadas de humanos, tales como bibliotecas de expresión de fagos (véase, por ejemplo, Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) y Hoogenboom y col., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)); usando líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (véase por ejemplo, Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987) y Boerner y col., J. Immunol., 147: 86 (1991)) y generando anticuerpos monoclonales en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena (véase, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., Nature 362: 255 (1993); Bruggemann y col., Year in Immunol., 7: 33 (1993)). Esta definición de anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno de un animal no humano.

[0055] Un anticuerpo "madurado para afinidad" es aquel con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que da lugar a una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esa o esas alteraciones. En una realización, un anticuerpo madurado para afinidad tiene afinidades nanomolares o, incluso, picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados para afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks y col. Bio/Technology 10:779-783 (1992) describen la maduración para afinidad mediante mezcla aleatoria de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de residuos HVR y/o estructurales se describe en: Barbas y col. Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier y col. Gene 169:147-155 (1995); Yelton y col. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson y col., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995) y Hawkins y col, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

[0056] Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce una actividad biológica del antígeno al que se une. Determinados anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas inhiben parcial o completamente la actividad biológica del antígeno.

[0057] Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una secuencia de aminoácidos de la región Fc variante) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo se incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B) y activación de células B.

[0058] "Receptor Fc" o "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación a base de tirosinas inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición a base de tirosinas inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92; Capel y col., 1994, Immunomethods, 4:25-34 y de Haas y col, 1995, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41. Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están incluidos en el término "FcR" de este documento.

[0059] El término "receptor Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer y col., 1976, J. Immunol., 117:587 y Kim y col., 1994, J. Immunol., 24:249 (1994)) y la regulación de la homeostasis de inmunoglobulinas. Se conocen procedimientos para medir la unión a FcRn. La unión al FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de los polipéptidos de unión de alta afinidad de FcRn humana pueden analizarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o en líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se han administrado polipéptidos variantes de Fc.

[0060] En el documento WO00/42072 (Presta) se describen las variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a los FcR. Véase también Shields y col., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).

[0061] Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En ciertas realizaciones, las células expresan al menos FcγRIII y realizan una función o funciones efectoras ADCC. Entre los ejemplos de leucocitos humanos que median en la respuesta ADCC se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células citotóxicas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

- 5 **[0062]** "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la inmunoglobulina se une a receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células efectoras citotóxicas (por ejemplo, células citotóxicas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permitiendo que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora del antígeno y posteriormente maten la célula diana con citotoxinas. Las células principales que median en la ADCC, las células NK, expresan sólo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, como el que se describe en las patentes de Estados Unidos. Nº 5.500.362 o 5.821.337, o en la patente de Estados Unidos. de Presta Nº. 6.737.056. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citotóxicas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes y col. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).
- 15 **[0063]** "Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación del mecanismo clásico del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que está unido a su antígeno afin. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).
- 20 **[0064]** Las variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y una capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida se describen en la patente de Estados Unidos Nº 6.194.551B1 y en el documento WO99/51642. Véase también, Idusogie y col., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).
- 25 **[0065]** El término "polipéptido que comprende la región Fc" se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o inmunoadhesina, que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (residuo 447 según el sistema de numeración de la UE) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o mediante técnicas de modificación recombinante del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Por consiguiente, una composición que comprende un polipéptido que tiene una región Fc según la presente invención puede comprender polipéptidos con K447, con todos los K447 eliminados, o una mezcla de polipéptidos con y sin el resto K447.
- 30 **[0066]** Un "anticuerpo citotóxico" es un anticuerpo que es capaz de una función efectora y/o de inducir la muerte celular tras la unión a su antígeno diana.
- 35 **[0067]** Un "inmunoconjugado" se refiere a un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos.
- 40 **[0068]** Tal como se usa en este documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden la fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta al reconocimiento del antígeno y al sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga") y una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. La parte adhesina de una molécula de inmunoadhesina habitualmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tales como de los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4 (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.
- 45 **[0069]** Una "molécula pequeña" o "molécula orgánica pequeña" se define en este documento como una molécula orgánica que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 500 daltons.
- 50 **[0070]** Un "oligopéptido de unión a KDR" o un "oligopéptido que se une a KDR" es un oligopéptido que es capaz de unirse a KDR con la afinidad suficiente como para que el oligopéptido sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en el reconocimiento de KDR. En ciertas realizaciones, el grado de unión de un oligopéptido que se une a KDR a una proteína que no sea KDR no relacionada es menor de aproximadamente el 10% de la unión del oligonucleótido que se une a KDR a KDR tal como se determina, por ejemplo, mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial. En ciertas realizaciones, un oligopéptido que se une a KDR tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$.
- 55 **[0071]** Una "molécula orgánica de unión a KDR" o una "molécula orgánica que se une a KDR" es una molécula orgánica distinta a un oligopéptido o anticuerpo tal como se definen en este documento que es capaz de unirse a KDR con la afinidad suficiente como para que la molécula orgánica sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en el reconocimiento de KDR. En ciertas realizaciones el grado de unión de una molécula orgánica que se une a KDR a una proteína que no sea KDR no relacionada es menor de aproximadamente el 10% de la unión de la molécula orgánica que se une a KDR a KDR tal como se determina, por ejemplo, mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial. En ciertas realizaciones, una molécula orgánica que se une a KDR tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$.
- 60
- 65

[0072] La constante de disociación (K_d) de cualquier molécula que se une a un polipéptido diana puede medirse convenientemente usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial. Estos ensayos pueden emplear un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 con el polipéptido diana inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, los chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. El polipéptido diana se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8 a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un flujo de 5 µl/minuto hasta alcanzar aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del polipéptido diana, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para las medidas cinéticas, se inyectan diluciones en serie de factor 2 de la molécula de unión (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (POST) a 25°C a un flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (K_{on}) y las velocidades de disociación (K_{off}) se calculan usando un modelo de unión de Langmuir 1:1 simple (versión de software de evaluación BIAcore 3.2) mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como el cociente K_{off}/K_{on} . Véase, por ejemplo Chen, Y. y col. (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Si la constante de asociación de un anticuerpo supera $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces dicha constante de asociación puede determinarse usando una técnica de inhibición de la fluorescencia que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25°C de un anticuerpo a 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2 en presencia de concentraciones crecientes de antígeno según se determina en un espectrofotómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con parada de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

[0073] Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para la administración de un agente, por ejemplo, un fármaco, a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen normalmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

[0074] La palabra "marcador", cuando se usa en este documento, se refiere a un compuesto o composición detectable. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar una alteración química de un compuesto o composición sustrato que da lugar a un producto detectable. Entre los radionucleidos que pueden servir como marcadores detectables se incluyen, por ejemplo, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212 y Pd-109.

[0075] Una molécula biológica "aislada", tal como un ácido nucleico, polipéptido o anticuerpo, es aquella que ha sido identificada y separada y/o recuperada de al menos un componente de su entorno natural.

II. REALIZACIONES

[0076] Se proporcionan procedimientos para el diagnóstico y composiciones para el tratamiento de cánceres asociados con la amplificación génica, en particular para el diagnóstico y tratamiento de un cáncer de pulmón. Estos procedimientos y composiciones se basan, en parte, en el descubrimiento de que una región del cromosoma 4 que comprende el gen de PRO es amplificado en muestras de cánceres de pulmón particulares.

[0077] Cada polipéptido PRO descrito en la presente invención es un receptor tirosina quinasa. Se destacan las siguientes características adicionales de cada polipéptido PRO:

- PDGFRA es un receptor para miembros de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).
- KIT es un homólogo celular de un oncogén viral. Por consiguiente, KIT es un "protooncogén" que se puede convertir en una forma oncogénica. El ligando para KIT es un factor de células madre (SCF).
- KDR es un receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un mitógeno de células endoteliales. VEGF y KDR juegan un papel en la angiogénesis inducida por ciertos tumores.

[0078] Los receptores tirosina quinasa comprenden en general un dominio de unión a ligando extracelular; un dominio transmembrana; y un dominio intracelular que tiene actividad de tirosina quinasa.

A. Procedimientos de diagnóstico y detección

A. Procedimientos de diagnóstico y detección

[0079] En un aspecto, se proporcionan procedimientos de diagnóstico del cáncer de pulmón. Tal como se describe a continuación en los Ejemplos, se descubrieron tumores de pulmón en los que se amplificó una región del cromosoma 4. El gen de PRO se encuentra completamente dentro de la región de amplificación, tal como se muestra en las Figuras 1 y 2, y, por tanto, es una diana atractiva para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón.

[0080] Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar la presencia de un cáncer de pulmón en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la detección de si el gen de KDR está amplificado en una muestra de pulmón para análisis del mamífero en relación con una muestra control, donde la amplificación del gen de KDR indica la presencia de cáncer de pulmón en el mamífero. Tal como se usa en este documento, el término "detección" abarca la detección cuantitativa o cualitativa. Una "muestra de pulmón para análisis" es una muestra biológica derivada de tejido de pulmón que puede o no ser cancerosa, por ejemplo, una muestra de células de pulmón que se sospecha que son cancerosas o un extracto celular completo o un extracto fraccionado (como una preparación de membrana) derivado de células de pulmón. Una "muestra control" es una muestra biológica derivada de (a) tejido normal, por ejemplo, células de pulmón normales o un extracto celular completo o extracto celular fraccionado (como una preparación de membrana) derivado de dichas células o (b) tejido de cáncer de pulmón en el que se sabe que el gen de KDR no está amplificado o sobreexpresado, o un extracto celular completo o extracto celular fraccionado derivado del mismo. Se dice que el gen de KDR está "amplificado" si el número de copias del gen de KDR está aumentado en al menos 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 veces en la muestra de pulmón para análisis en relación con la muestra control.

[0081] En ciertas realizaciones, la detección de la amplificación del gen de KDR se consigue usando determinadas técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede usarse hibridación comparativa del genoma para producir un mapa del número de copias de las secuencias de ADN en función de la localización cromosómica. Véase, por ejemplo, Kallioniemi y col. (1992) *Science* 258:818-821. La amplificación del gen de KDR también puede detectarse, por ejemplo, mediante hibridación de tipo Southern usando una sonda específica para el gen de KDR o mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

[0082] En ciertas realizaciones, la detección de la amplificación del gen de PRO se consigue evaluando directamente el número de copias del gen de KDR, por ejemplo, usando una sonda que se hibrida al gen de KDR. En ciertas realizaciones, la detección de la amplificación del gen de KDR se consigue evaluando indirectamente el número de copias del gen de KDR, por ejemplo, evaluando el número de copias de una región cromosómica que está fuera del gen de KDR, pero que se amplifica conjuntamente con el gen de kdr. Las directrices para seleccionar dicha región se proporcionan, por ejemplo, en la figura 2.

[0083] Para cualquiera de los procedimientos anteriores, el objetivo establecido de "diagnóstico de la presencia de un cáncer de pulmón en un mamífero" no es limitante y abarca la clasificación del tipo de cáncer de pulmón presente en un mamífero mediante la detección de si el gen de KDR está amplificado y/o expresado a un nivel más alto en una muestra de prueba de cáncer de pulmón en relación con una muestra control. La clasificación de un cáncer de pulmón en base a si el gen de KDR está amplificado y/o expresado es útil, por ejemplo, para determinar si un individuo que tiene cáncer de pulmón responderá a un agente terapéutico que reconoce KDR o el gen de KDR y, por tanto, para la selección del régimen óptimo para el tratamiento del cáncer de pulmón, tal como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, se proporciona en el presente documento un procedimiento para determinar si un individuo que tiene un cáncer de pulmón responderá a un agente terapéutico que reconoce KDR o el gen de KDR, comprendiendo el procedimiento la determinación de si el gen de KDR está amplificado y/o expresado en el cáncer de pulmón (por ejemplo, usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente), en el que la amplificación y/o expresión del gen de KDR indica que el individuo responderá al agente terapéutico. Un "agente terapéutico que reconoce KDR o el gen de KDR" significa cualquier agente que afecta a la expresión y/o a una actividad de KDR o el gen de KDR incluyendo, pero sin limitaciones, cualquiera de los antagonistas de KDR, anticuerpos citotóxicos o inmunocombinados descritos a continuación, en la Parte B, incluyendo dichos agentes terapéuticos que ya son conocidos en la técnica, así como aquellos que se desarrollen posteriormente.

B. Composiciones y formulaciones farmacéuticas

[0084] Se proporcionan formulaciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer de pulmón. En ciertas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende al menos un antagonista de KDR, un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional. En ciertas realizaciones, un antagonista de KDR comprende un anticuerpo anti-KDR, un oligopéptido, una molécula orgánica, un receptor de KDR soluble, o un ácido nucleico antisentido. En ciertas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende al menos un anticuerpo anti-KDR citotóxico, un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional. En ciertas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende al menos un inmunocombinado, en el que el inmunocombinado comprende un anticuerpo que se une a KDR y un agente citotóxico; un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional.

1. Antagonistas de KDR

[0085] En un aspecto, un antagonista de KDR es un anticuerpo anti-KDR. En ciertas realizaciones, un anticuerpo antagonista anti-KDR es un "anticuerpo bloqueante", por ejemplo, un anticuerpo que bloquea parcial o completamente la interacción de KDR con su ligando. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-KDR se une al dominio extracelular de un KDR. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-KDR se une o de otro modo obstruye todo o parte del dominio de unión a ligando de un KDR.

[0086] Ciertos anticuerpos anti-PRO son conocidos en la técnica. Dichos anticuerpos se describen, por ejemplo, en Ludwig et al. (2003) *Oncogene* 22:9097-9106 (que describe IMC-1C11, un anticuerpo antagonista anti-KDR); MacDonald et al. (2001) *Nat. Genet.* 29:143-152 (que describe anticuerpos monoclonales antagonistas para KDR); y Hines et al. (1995) *Cell Growth Diff.* 6:769-779 (que describir anticuerpos antagonistas para KIT).

[0087] En diversas realizaciones de la invención, un anticuerpo anti-KDR (incluyendo anticuerpos antagonistas anti-KDR y anticuerpos citotóxicos anti-KDR, descritos a continuación en la Parte 2) es un anticuerpo monoclonal. En diversas realizaciones, un anticuerpo anti-KDR es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, un fragmento (Fab')₂ o un anticuerpo de dominio único (Domantis, Inc., Wathamn, MA; véase por ejemplo, la patente de Estados Unidos. N° 6.248.516 B1). En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-KDR es un anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, el documento WO94/04690 y Suresh y col. (1986) *Methods in Enzymology* 121:210). En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-KDR es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

[0088] En otro aspecto, un antagonista de KDR es un oligopéptido que se une a un KDR. En una realización, un oligopéptido se une al dominio extracelular de un KDR. En dicha realización, un oligopéptido se une o de otro modo obstruye una región del dominio de unión a ligando. En otra realización, un oligopéptido se une al dominio tirosina quinasa de un KDR y/o reduce la actividad del dominio de tirosina quinasa de un KDR.

[0089] Los oligopéptidos anteriores pueden sintetizarse químicamente usando metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o pueden prepararse y purificarse usando tecnología recombinante. Dichos oligopéptidos normalmente tienen una longitud de al menos 5 aminoácidos, alternativamente tienen una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 aminoácidos. Dichos oligonucleótidos pueden identificarse sin una gran experimentación usando técnicas bien conocidas. A este respecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de oligopéptidos para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en el sector (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos. N° 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143 y las publicaciones internacionales PCT N° WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:3998-4002 (1984); Geysen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:178-182 (1985); Geysen y col., en *Synthetic Peptides as Antigens*, 130-149 (1986); Geysen y col., *J. Immunol. Meth.*, 102:259-274 (1987); Schoofs y col., *J. Immunol.*, 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. y col. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378; Lowman, H.B. y col. (1991) *Biochemistry*, 30:10832; Clackson, T. y col. (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J. D. y col. (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581; Kang, A.S. y col. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8363 y Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2:668). En ciertas realizaciones, un oligopéptido puede estar conjugado a un agente citotóxico.

[0090] En otro aspecto, un antagonista de KDR es una molécula orgánica que se une a KDR, diferente de un oligopéptido o anticuerpo descrito aquí. Una molécula orgánica puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña. En una realización, una molécula orgánica se une al dominio extracelular de un KDR. En dicha realización, una molécula orgánica se une o de otro modo obstruye una región del dominio de unión a ligando. En otra realización, una molécula orgánica se une al dominio tirosina quinasa y/o reduce la actividad del dominio de tirosina quinasa de un KDR.

[0091] Una molécula orgánica que se une a KDR puede identificarse y sintetizarse químicamente usando metodología conocida (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO00/00823 y WO00/39585). Dichas moléculas orgánicas normalmente tienen un tamaño de menos de aproximadamente 2.000 daltons, alternativamente un tamaño de menos de aproximadamente 1.500, 750, 500, 250 o 200 daltons, donde dichas moléculas orgánicas que son capaces de unirse a KDR pueden identificarse sin una gran experimentación usando técnicas bien conocidas. A este respecto, cabe indicar que las técnicas para el cribado de bibliotecas de moléculas orgánicas para moléculas que son capaces de unirse a un polipéptido diana son bien conocidas en el sector (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO00/00823 y WO00/39585). En ciertas realizaciones, una molécula orgánica puede conjugarse con un agente citotóxico.

[0092] Ciertos antagonistas de molécula pequeña que se unen a PRO e inhiben la actividad de tirosina quinasa de PRO son conocidos en la técnica. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, 3-[2,4-dimetilpirrol-5-il] metiliden]-indolin-2-ona ("SU5416"), un inhibidor de KDR y KIT; y imatinib (Gleevec®), una 2-fenilaminopirimidina que inhibe KDR y KIT. En ciertas realizaciones, un antagonista de KDR es un inhibidor de tirosina quinasa, tal como se define en el presente documento.

[0093] En otro aspecto, un antagonista de KDR es una forma soluble de KDR, es decir, una forma de PEDGFRA que no está anclada a la membrana plasmática. Dichas formas solubles de PEDGFRA pueden competir con KDR unido a membrana por unirse a un ligando de KDR. En ciertas realizaciones, una forma soluble de PEDGFRA puede comprender todo o parte de un dominio extracelular de KDR de unión a ligando. En cualquiera de las realizaciones anteriores, una forma soluble de PEDGFRA puede comprender o no un dominio de tirosina quinasa.

[0094] Aún en otro aspecto, un antagonista de KDR es un ácido nucleico antisentido que disminuye la expresión del gen de KDR (es decir, que disminuye la transcripción del gen de KDR y/o la traducción del ARNm de KDR). En ciertas realizaciones, un ácido nucleico complementario se une a un ácido nucleico (ADN o ARN) que codifica KDR. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico antisentido se une a un ácido nucleico (ADN o ARN) que codifica KDR. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico antisentido es un oligonucleótido con una longitud de aproximadamente 10-30 nucleótidos (incluyendo todos los puntos entre esos extremos). En ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido comprende esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otras uniones de azúcares, incluyendo uniones fosforotioato y uniones como las descritas en el documento WO 91/06629), donde dichos esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificadas son resistentes a nucleasas endógenas. En una realización, un ácido nucleico es un oligodesoxirribonucleótido, lo cual da lugar a la degradación y/o transcripción o traducción reducida de ARNm de KDR.

[0095] En ciertas realizaciones, un ácido nucleico antisentido es un ARN que reduce la expresión de un ácido nucleico diana mediante "interferencia de ARN" ("ARNi"). Para la revisión del ARNi, véase, por ejemplo, Novina y col. (2004) *Nature* 430:161-164. Dichos ARN derivan, por ejemplo, de ARN de interferencia corto (ARNsi) y de microARN. Los ARNsi, por ejemplo, pueden sintetizarse como oligonucleótidos de cadena doble con una longitud de aproximadamente 18-26 nucleótidos. *Id.* Por tanto, los ácidos nucleicos antisentido que disminuyen la expresión de PRO son bien conocidos para los expertos.

2. Anticuerpos citotóxicos

[0096] En un aspecto, se proporcionan anticuerpos citotóxicos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo citotóxico es un anticuerpo anti-KDR, tales como los proporcionados anteriormente, que ejercen una función efectora y/o induce la muerte celular. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-KDR citotóxico se une al dominio extracelular de un KDR.

3. Inmunoconjugados

[0097] Los inmunoconjugados o "conjugados anticuerpo-fármaco" son útiles para la administración local de agentes citotóxicos en el tratamiento del cáncer. Véase, por ejemplo, Syrigos y col. (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y col. (1997) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26:151-172; Patente de Estados Unidos N° 4.975.278. Los inmunoconjugados permiten la administración dirigida de un grupo farmacológico a un tumor, mientras que la administración sistémica de agentes citotóxicos no conjugados puede dar lugar a niveles inaceptables de toxicidad en las células normales, así como sobre las células tumorales que se van a eliminar. Véase Baldwin y col. (Mar. 15, 1986) *Lancet* pág. 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications* (A. Pinchera y col., eds.) pág. 475-506.

[0098] En un aspecto, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo que se une a KDR (o un dominio extracelular del mismo), tal como los proporcionados anteriormente, y un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

[0099] Anteriormente se han descrito agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse se incluyen, la cadena A de la difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Están disponibles diversos radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

[0100] Pueden fabricarse conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico usando diversos agentes bifuncionales de acoplamiento de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditil)-propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobezoilo)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobezoilo)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina con ricina tal como se describe en Vitetta y col., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metil dietil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

Maitansina y maitansinoides

[0101] En una realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-KDR conjugado con una o más

moléculas de maitansinoides. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primer vez del arbusto de África del este *Maytenus serrata* (patente de Estados Unidos Nº 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol (patente de Estados Unidos. Nº 4.151.042).

5 Maitansinol sintético y derivados y análogos de los mismos se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nº 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663 y 4.371.533.

10 **[0102]** En un intento por mejorar su índice terapéutico, se han conjugado la maitansina y los maitansinoides con anticuerpos que se unen a antígenos de la superficie de células tumorales. Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos. Nº 5.208.020, 5.416.064 y en la patente europea EP 0 425 235 B1. Liu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describen inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer de pulmón humano. Se encontró que el conjugado era extremadamente citotóxico en células de cáncer de colon cultivadas y mostraba una actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se ha conjugado a través de un enlazador disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno de líneas celulares de cáncer de colon humano o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/*neu*. La citotoxicidad de conjugado TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de la superficie de HER-2 por célula. El conjugado del fármaco alcanzaba un grado de citotoxicidad similar al fármaco sin maitansinoide que podía aumentarse incrementando el número de moléculas maitansinoides por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostraba una citotoxicidad sistémica menor en ratones.

25 **[0103]** Se prepararon conjugados anticuerpo anti-KDR-maitansinoide mediante unión química de un anticuerpo anti-KDR a una molécula de maitansinoide sin que disminuyera significativamente la actividad biológica ni del anticuerpo ni de la molécula de maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en el aumento de la citotoxicidad de las células diana sin afectar de forma negativa a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque incluso cabría esperar que una molécula de toxina por anticuerpo aumentara la citotoxicidad sobre el uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y pueden sintetizarse usando técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se describen maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos. Nº 5.208.020 y en las otras publicaciones de patentes y no patentes referidas anteriormente en este documento. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

30 **[0104]** Existen muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para fabricar conjugados anticuerpo-maitansinoides incluyendo, por ejemplo los descritos en la patente de Estados Unidos Nº 5.208.020 y en la patente EP 0 425 235 B1, y en Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992). Entre los grupos de unión se incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles al ácido, grupos lábiles a la luz, grupos lábiles a la peptidasa o grupos lábiles a la estearasa, tal como se describen en las patentes identificadas anteriormente, siendo los preferidos los grupos disulfuro y tioéter.

45 **[0105]** Pueden fabricarse conjugados del anticuerpo y el maitansinoide usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotilano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamino), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Determinados agentes de acoplamiento, tales como el N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson y col., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y el N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP), proporcionan un enlace disulfuro.

55 **[0106]** El enlazador puede estar unido a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster mediante la reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede tener lugar en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, en la posición C-14 modificada con hidroximetilo, en la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y en la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o de un análogo de maitansinol.

Auristatinas y dolastatinas

65 **[0107]** En algunas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-KDR conjugado a una dolastatina o análogo o derivado peptídico de dolastatina, por ejemplo, una auristatina (Patentes de Estados Unidos Nº 5.635.483; 5.780.588). Se ha observado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de los

microtúbulos, la hidrólisis del GTP y la división nuclear y celular (Woyke y col. (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (patente de Estados Unidos N° 5.663.149) y actividad antifúngica (Pettit y col. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). El grupo farmacológico de dolastatina o auristatina puede estar unido al anticuerpo a través del extremo N (amino) terminal o del extremo C (carboxilo) terminal del grupo farmacológico peptídico (documento WO 02/088172).

[0108] Entre los ejemplos de realizaciones con auristatina se incluyen grupos farmacológicos DE y DF de monometilauristatina unidos al extremo N-terminal, descritos en la solicitud de publicación de patente de Estados Unidos N° 2005-0238649 A1 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands".

[0109] Habitualmente, pueden prepararse grupos farmacológicos a base de péptidos mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el procedimiento de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pág 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los grupos farmacológicos de auristatina/dolastatina pueden prepararse según los procedimientos de: documentos US 5.635.483 y US 5.780.588; Pettit y col. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit y col. (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., y col. *Synthesis*, 1996, 719-725 y Pettit y col. (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 15:859-863. Véase también Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784; publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2005-0238649 A1, (que describe, por ejemplo, enlazadores y procedimientos de preparación de compuestos monometilvalina, tales como MMAE y MMAF conjugados a enlazadores).

Caliqueamicina

[0110] Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo anti-KDR conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. Los antibióticos de la familia de la caliqueamicina son capaces de producir roturas del ADN de doble cadena a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina, ver las patentes de Estados Unidos N° 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de caliqueamicinas que pueden usarse se incluyen, pero sin limitaciones, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman y col., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode y col., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos de American Cyanamid mencionadas previamente). Otro fármaco antitumoral al que puede conjugarse el anticuerpo es el QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios de acción intracelulares y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por tanto, la captación celular de estos agentes a través de internalización mediada por anticuerpos aumenta ampliamente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

[0111] Entre otros agentes antitumorales que pueden conjugarse a un anticuerpo anti-KDR se incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las patentes de Estados Unidos N° 5.053.394 y 5.770.710 así como esperamicinas (patente de Estados Unidos N° 5.877.296).

[0112] Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse se incluyen la cadena A de la toxina diftérica, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantinas, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S) inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

[0113] En otro aspecto, un inmunoconjugado puede comprender un anticuerpo anti-KDR y un compuesto con actividad nucleotídica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desoxirribonucleasa; ADNasa).

[0114] Para la destrucción selectiva de un tumor, un inmunoconjugado puede comprender un anticuerpo anti-PRO y un átomo altamente radiactivo. Están disponibles un conjunto de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos anti-KDR radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para diagnóstico, puede comprender un átomo radiactivo para estudios de centelleo, por ejemplo tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de spin para la adquisición de imagen por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como adquisición de imagen por resonancia magnética, mri), tales como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[0115] Los radiomarcadores u otros marcadores pueden incorporarse en el inmunoconjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que incluyen, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores,

tales como ^{99m}Tc o ^{123}I , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} pueden unirse a través de un residuo de cisteína del péptido. El Itrio-90 puede unirse a través de un residuo de lisina. Puede usarse el procedimiento de IODOGEN (Fraker y col. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 para incorporar yodo-123. En "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal. CRC Press 1989) se describen otros procedimientos detallados.

[0116] También se contemplan aquí conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

4. Agentes terapéuticos adicionales

[0117] Opcionalmente, las formulaciones farmacéuticas pueden comprender al menos un agente terapéutico adicional (es decir, además de un antagonista de KDR, anticuerpo citotóxico o inmunoconjugado). Dichos agentes terapéuticos adicionales se describen con más detalle a continuación, en la Parte C.

5. Preparación de formulaciones farmacéuticas

[0118] Las formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los agentes anteriores se preparan para su almacenamiento mezclando el agente que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)) en forma de soluciones acuosas o liofilizadas u otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio); fenol, butilo o alcohol bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones farmacológicas a utilizar para su administración *in vivo* generalmente están estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0119] Un agente también puede estar incluido en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

[0120] Pueden prepararse preparaciones de liberación prolongada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el agente de interés, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, en películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación prolongada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(vinilalcohol), poliláctidos (patente de Estados Unidos Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los agentes encapsulados permanecen en el organismo durante un periodo de tiempo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que da lugar a una pérdida de actividad biológica y, en el caso de anticuerpos, a posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de un intercambio tiodisulfuro, puede conseguirse la estabilización modificando los residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

C. Procedimientos de tratamiento y métodos relacionados

[0121] Se describen aquí procedimientos terapéuticos que utilizan un antagonista de PRO, un anticuerpo citotóxico o un inmunoconjugado. Dichos procedimientos incluyen procedimientos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo*, a menos que se indique lo contrario.

[0122] En otro aspecto, se proporciona un antagonista de KDR o una formulación farmacéutica para utilizar en un procedimiento de tratamiento de un cáncer de pulmón, comprendiendo el procedimiento administrar a un individuo que tiene el cáncer de pulmón una cantidad eficaz de la formulación farmacéutica que comprende 1) un antagonista de PEDGFRA, 2) un anticuerpo anti-KDR citotóxico, o 3) un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-KDR y un agente citotóxico. En ciertas realizaciones, el cáncer de pulmón está asociado con la amplificación o sobreexpresión del gen de KDR. En ciertas realizaciones, el individuo es un modelo animal no humano para cáncer de pulmón. Los modelos de ratón de cáncer de pulmón se describen en detalle en Meuwissen et al. (2005) Genes Dev. 19:643-664. En ciertas realizaciones, el individuo es un humano. En ciertas realizaciones, una cantidad eficaz de la formulación farmacéutica da lugar a cualquiera de los siguientes efectos: reducción del número de células cancerosas o eliminación de las células cancerosas; reducción del tamaño del tumor; inhibición completa o parcial de la infiltración de las células cancerosas en órganos periféricos, incluyendo la expansión del cáncer a tejidos blandos y a los huesos; inhibición completa o parcial de las metástasis tumorales; inhibición completo o parcial del crecimiento tumoral y/o alivio completo o parcial de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer y reducción de la morbilidad y mortalidad

[0123] En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 1) un antagonista de KDR, 2) un anticuerpo anti-KDR citotóxico, o 3) un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-KDR y un agente citotóxico se administra en combinación con al menos un agente terapéutico adicional y/o adyuvante. En ciertas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, o un agente inhibidor del crecimiento. En una de dichas realizaciones, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes utilizados en el tratamiento del cáncer de pulmón. Dichos agentes incluyen, pero sin limitaciones, paclitaxel, carboplatino, cisplatino, y vinorelbina, ya sea individualmente o en cualquier combinación, por ejemplo, paclitaxel más carboplatino; paclitaxel más cisplatino; y vinorelbina más cisplatino.

[0124] Estas terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma formulación o en formulaciones independientes) y la administración independiente, en cuyo caso, la administración de un antagonista de KDR, anticuerpo citotóxico o inmunoconjugado, puede tener lugar antes, simultáneamente y/o tras la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. También puede usarse un antagonista de KDR, anticuerpo citotóxico o inmunoconjugado en combinación con radioterapia.

[0125] Se pueden administrar un antagonista de KDR, anticuerpo citotóxico o inmunoconjugado (y cualquier agente terapéutico adicional o adyuvante) mediante cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y si se desea, para el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, el antagonista de KDR, anticuerpo citotóxico o inmunoconjugado se suministra de forma adecuada mediante una infusión por pulsos, particularmente con dosis descendentes del antagonista de KDR, anticuerpo citotóxico o inmunoconjugado. La dosificación puede ser mediante cualquier ruta adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o crónica.

[0126] Cuando el antagonista de KDR es un ácido nucleico antisentido, las directrices para la dosificación y la administración *in vivo* de ácidos nucleicos antisentido se pueden encontrar en Khan et al. (2004) J. Drug Targeting 12:393-404.

[0127] Cuando el agente terapéutico es un anticuerpo anti-KDR o un inmunoconjugado del mismo, la dosis apropiada del anticuerpo o inmunoconjugado (cuando se utilizan solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes quimioterapéuticos) dependerá del anticuerpo o inmunoconjugado particular, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo o inmunoconjugado se administran para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, historial clínico del paciente y respuesta al anticuerpo o inmunoconjugado, y el criterio del médico asistencial. El anticuerpo o inmunoconjugado se administra de forma adecuada al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg -10 mg/kg) de anticuerpo o inmunoconjugado puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria habitual podría variar desde aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantendría en general hasta que tenga lugar la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de dosificación de anticuerpo o inmunoconjugado estaría en el intervalo desde aproximadamente 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg. De este modo, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de manera intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de manera que el paciente reciba desde aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo o inmunoconjugado). Se puede administrar una dosis de carga inicial más elevada, seguida de una o más dosis inferiores. Un régimen de dosificación de ejemplo comprende

la administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo o inmunocombinado. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación.

5 III. EJEMPLOS

[0128] Se analizaron noventa y dos muestras de tumores de pulmón congelados, cada uno de un paciente humano distinto. Cada muestra de tumor presentaba un contenido de células neoplásicas superior al 75%, estimado por un patólogo. A partir de cada muestra de tumor, se extrajo ADN y se purificó mediante métodos estándar.

10

A. Análisis del número de copias de ADN

[0129] Se usó el juego de matrices para mapeo humano 500 K GeneChip® (Affymetrix, Santa Clara, CA) para medir los cambios en el número de copias de ADN en las muestras de tumores de pulmón. El juego de matrices para mapeo humano 500K Gene Chip® consta de dos matrices (la matriz "Sty I" de 250 K y la matriz "Nsp I" de 250 K), conteniendo cada una sondas específicas para aproximadamente 250.000 SNPs, para un total de aproximadamente 500.000 SNP. Los SNP se distribuyen a lo largo del genoma permitiendo, de este modo, un análisis genómico amplio del número de copias de ADN. Cada matriz del juego de matrices incluye más de 6,5 millones de características, consistiendo cada característica de más de un 1 millón de copias de un oligonucleótido de 25 pb de secuencia definida

15

20

[0130] Para cada muestra tumoral, el ADN se amplificó, marcó y digirió con Sty I o Nsp I según los protocolos convencionales de Affymetrix y la preparación resultante se dejó hibridar con ambas matrices del juego de matrices para mapeo humano 500K Gene Chip®.

25

[0131] La hibridación a las micromatrices se detectó según los protocolos convencionales de Affymetrix y se generaron valores de intensidad para cada característica. Los valores de intensidad se normalizaron con respecto a un juego de referencia de ADN genómico normal. A continuación, las características se mapearon en las regiones codificantes correspondientes (marcos de lectura abiertos) en el genoma humano. De este modo, cada uno de los valores de intensidad normalizados reflejaba el número de copias de ADN para una región codificante particular.

30

B. Resultados

[0132] De las 92 muestras de tumor de pulmón analizadas, cinco carcinomas de pulmón microcítico mostraron amplificación de una región particular del cromosoma 4. Las figuras 1 y 2 muestran los resultados del análisis del número de copias del cromosoma 4, centrándose la figura 2 en la región de cromosoma 4 desde aproximadamente el nucleótido 50.000.000 a 60.000.000. Las muestras de tumores se indican por designación numérica (por ejemplo, "HF-11763"), indicadas en la izquierda de los gráficos en las figuras 1 y 2, y por el tipo de tumor (por ejemplo, "escamoso"), indicado en la derecha del gráfico en la figura 2. Los gráficos en cada figura muestran los valores de intensidad normalizados del análisis del número de copias de ADN para cada tumor, estando cada característica representada como una línea vertical. Para cada tumor, las líneas verticales se representan a lo largo de un eje horizontal, que representa la región del cromosoma 4 indicada en la escala por encima de cada gráfico. La altura de cada línea vertical refleja el valor de intensidad normalizado, que es una medición del número de copias de ADN en este punto en el cromosoma. Se observó un máximo de intensidad de señal desde aproximadamente 54.500.000 a aproximadamente 57.000.000 nucleótidos para cada tumor. El valor de intensidad normalizado en esa región se incrementó en por lo menos aproximadamente 2-10 veces.

35

40

45

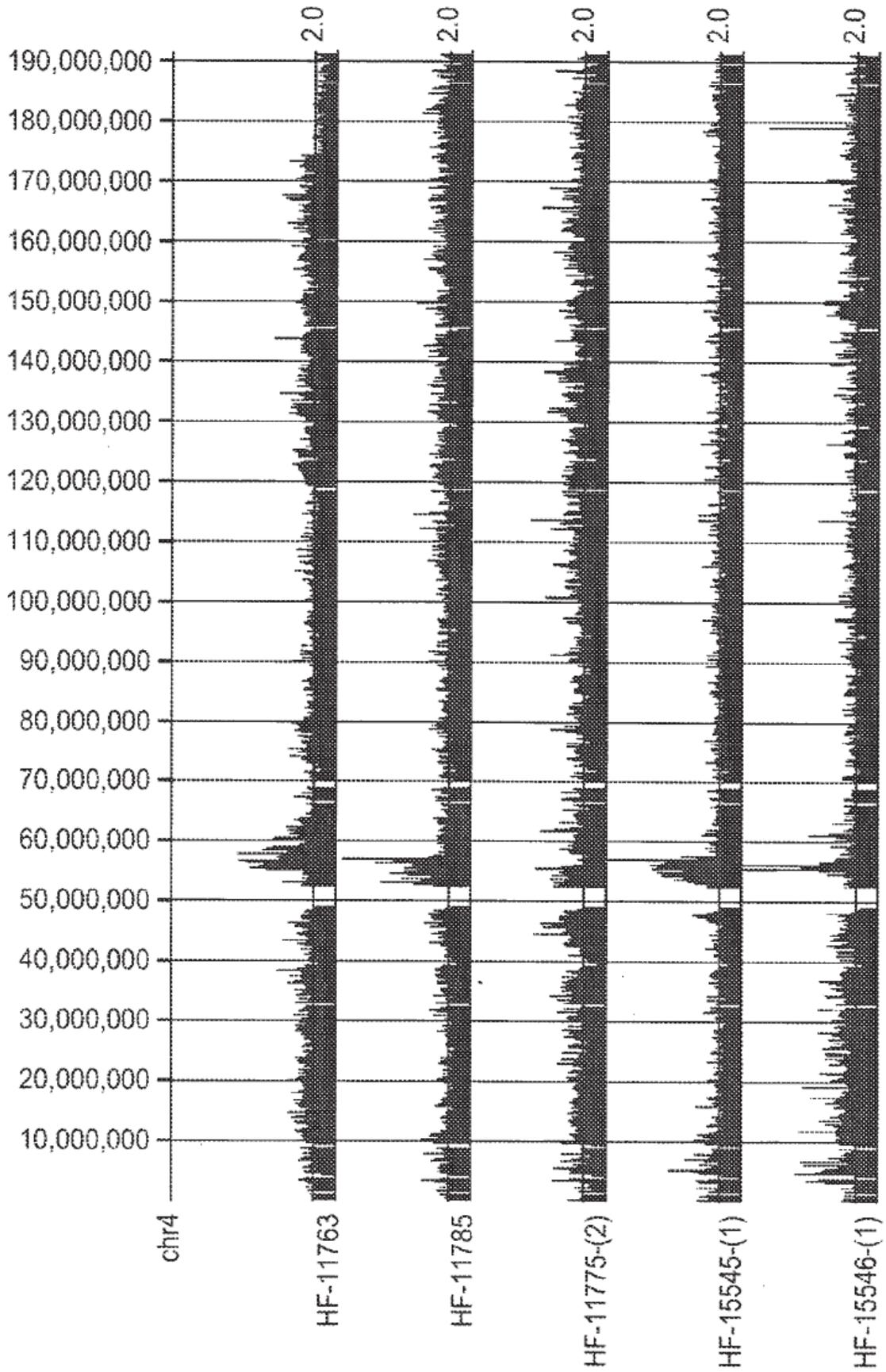
[0133] Tal como se muestra en el panel inferior de la figura 2, los genes que codifican PDGFRA, KIT, y KDR se encuentran en la región de número de copias incrementado. La amplificación estos genes sugiere que los receptores tirosina quinasas codificados se sobreexpresan, induciendo así el crecimiento y la proliferación de células tumorales de pulmón.

50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para diagnosticar la presencia de un cáncer de pulmón en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la detección de si el gen de KDR está amplificado en una muestra de pulmón para análisis del mamífero en relación con una muestra control, en el que la amplificación del gen de KDR indica la presencia de cáncer pulmón en el mamífero.
- 10 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la detección de si el gen de KDR está amplificado comprende detectar si el número de copias del gen de KDR está aumentado en al menos 5 veces.
- 15 3. Antagonista de KDR para utilizar en un procedimiento de tratamiento de un cáncer de pulmón asociado con la amplificación del gen de KDR, comprendiendo el procedimiento administrar a un individuo que tiene el cáncer de pulmón una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende el antagonista de KDR, en el que el antagonista de KDR es un anticuerpo anti-KDR, es un fragmento de anticuerpo anti-KDR, es un oligopéptido que se une a KDR, es una forma soluble de KDR o es un ácido nucleico antisentido de 10-30 nucleótidos de longitud que se une a y reduce la expresión de un ácido nucleico que codifica KDR.
- 20 4. Antagonista de KDR para utilizar según la reivindicación 3, en el que el antagonista de KDR es un anticuerpo anti-KDR que se une al dominio extracelular de KDR.
- 25 5. Antagonista de KDR para utilizar según la reivindicación 3, en el que el antagonista de KDR es un fragmento de anticuerpo anti-KDR.
- 30 6. Antagonista de KDR para utilizar según la reivindicación 3, en el que el antagonista de KDR es un anticuerpo anti-KDR quimérico o humanizado.
- 35 7. Antagonista de KDR para utilizar según la reivindicación 3, en el que el antagonista de KDR es un anticuerpo anti-KDR humano.
- 40 8. Antagonista de KDR para utilizar según la reivindicación 3, en el que el antagonista de KDR es un oligopéptido que se une a KDR.
- 45 9. Antagonista de KDR para utilizar según la reivindicación 3, en el que el antagonista de KDR es una forma soluble de KDR.
- 50 10. Antagonista de KDR para utilizar según la reivindicación 3, en el que el antagonista de KDR es un ácido nucleico antisentido de 10-30 nucleótidos de longitud que se une a, y reduce la expresión de un ácido nucleico que codifica KDR.
- 55 11. Formulación farmacéutica que comprende (a) un anticuerpo anti-KDR citotóxico o (b) un inmunocombinado que comprende un anticuerpo anti-KDR y un agente citotóxico para utilizar en un procedimiento de tratamiento de un cáncer de pulmón asociado con la amplificación del gen de KDR, comprendiendo el procedimiento administrar a un individuo que tiene el cáncer de pulmón una cantidad eficaz de la formulación farmacéutica.
- 60 12. Formulación farmacéutica para utilizar según la reivindicación 11, comprendiendo el procedimiento administrar a un individuo que tiene el cáncer de pulmón una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-KDR citotóxico.
- 65 13. Formulación farmacéutica para utilizar según la reivindicación 11, comprendiendo el procedimiento administrar a un individuo que tiene el cáncer de pulmón una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un inmunocombinado que comprende un anticuerpo anti-KDR y un agente citotóxico.
14. Formulación farmacéutica para utilizar según la reivindicación 13, en la que el agente citotóxico es un maitansinoide o una auristatina.
15. Procedimiento para determinar si un individuo que tiene un cáncer de pulmón responderá a un agente terapéutico que reconoce KDR o el gen de KDR, comprendiendo el procedimiento determinar si el gen de KDR está amplificado en el cáncer de pulmón, en el que la amplificación del gen de KDR indica que el individuo responderá al agente terapéutico.
16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que el agente terapéutico se selecciona entre (a) un antagonista de KDR, en el que el antagonista de KDR es un anticuerpo anti-KDR, es un fragmento de anticuerpo anti-KDR, es un oligopéptido que se une a KDR, es una forma soluble de KDR o es un ácido nucleico antisentido de 10-30 nucleótidos de longitud que se une a y reduce la expresión de un ácido nucleico que codifica KDR, (b) un anticuerpo anti-KDR citotóxico, o (c) un inmunocombinado que comprende un anticuerpo anti-KDR y un agente citotóxico.

Figura 1



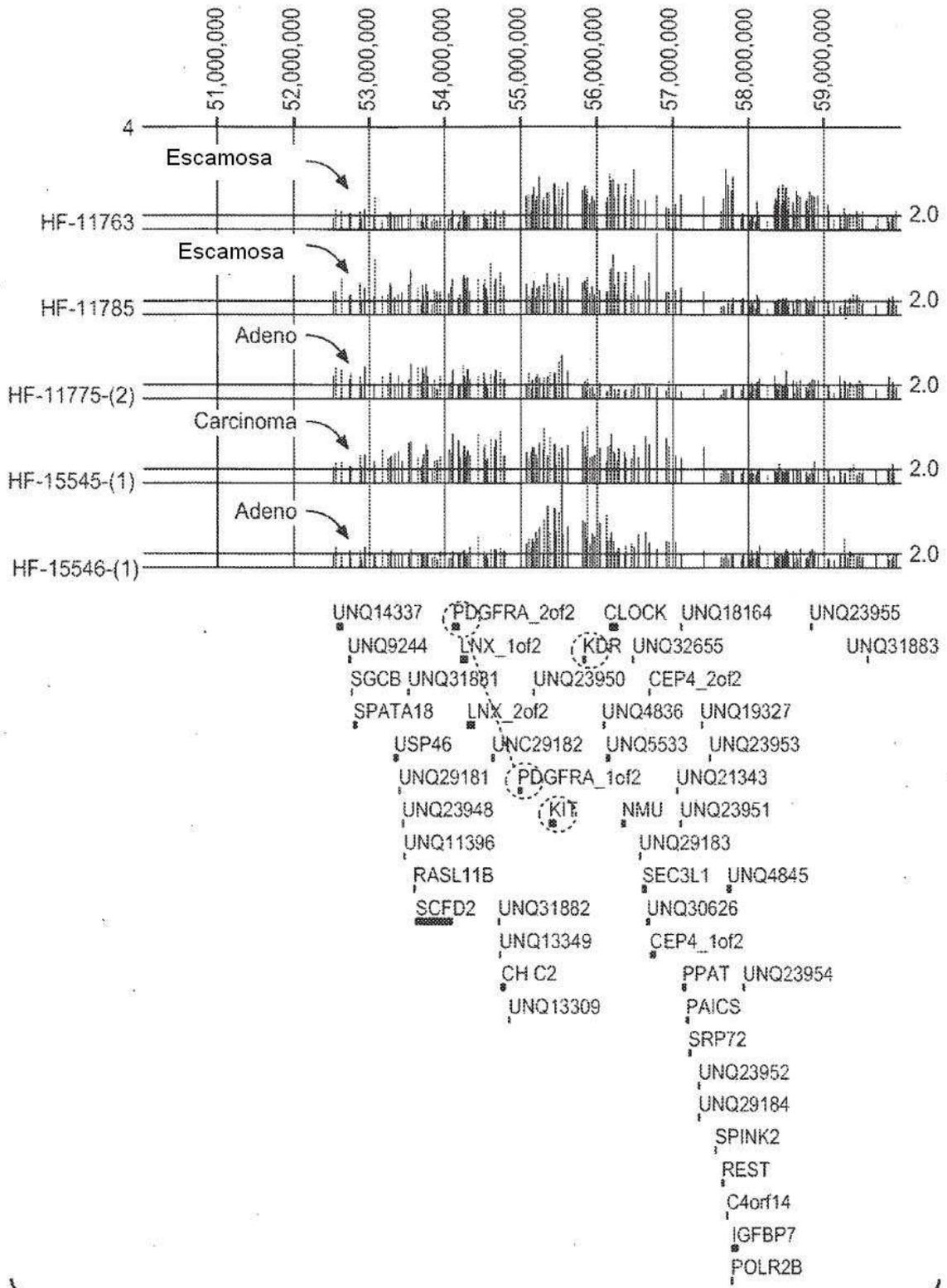


Figura 2