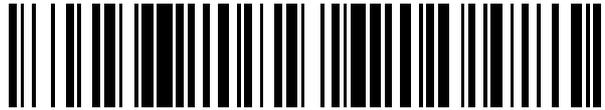


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 682**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2009 E 09719560 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2260111**

54 Título: **Variaciones genéticas asociadas con la resistencia a fármacos**

30 Prioridad:

14.03.2008 US 36874

16.05.2008 US 54064

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.09.2015

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

LACKNER, MARK;

AMLER, LUKAS C.;

CAVET, GUY;

O'BRIEN, CAROL y

PANDITA, AJAY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 544 682 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

Variaciones genéticas asociadas con la resistencia a fármacos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a variaciones genéticas que son predictivas de la resistencia a fármacos.

10 **Antecedentes de la invención**

Un diana clave de la oncología moderna es la identificación de la genética subyacente y de las variaciones genómicas que caracterizan un tumor dado, de modo que el paciente puede recibir terapia dirigida con agentes quimioterapéuticos que puedan proporcionar el mayor beneficio. El cáncer de mama es la forma más común de cáncer entre las mujeres en el mundo occidental, con una estimación de 1 millón de nuevos diagnósticos y 400.000 muertes por año en el mundo (1). La llegada de terapias dirigidas tales como el tamoxifeno para el cáncer positivo para el receptor de estrógenos (2) y herceptina para tumores que contienen la amplificación del oncogén HER2 (3) ha tenido un impacto significativo en la supervivencia de los pacientes, sin embargo, varios regímenes de quimioterapia siguen constituyendo un componente importante del tratamiento del cáncer de mama (4). El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea con distintos subtipos moleculares caracterizados por la respuesta diferencial a agentes dirigidos y quimioterapéuticos. Mientras que la quimioterapia es un régimen de tratamiento satisfactorio en muchos casos, se estima que el 50 % de las pacientes no se benefician debido a la multirresistencia intrínseca o adquirida (1). La resistencia multifármaco (MDR, por sus siglas en inglés) se refiere a la resistencia de las células cancerosas a múltiples clases de fármacos quimioterapéuticos que pueden estar estructural y mecánicamente no relacionados, y se relaciona con la expresión en exceso de varias proteínas que actúan como bombas de salida dependientes de ATP (5). La comprensión de las alteraciones moleculares que contribuyen a la MDR en el cáncer de mama es un primer paso crucial para permitir el desarrollo de pruebas diagnósticas que puedan predecir la resistencia a una terapia dada y racionalizar la selección de agentes terapéuticos más eficaces.

La expresión en exceso se ha implicado en la resistencia multifármaco adquirida en líneas celulares de cáncer en estudios anteriores. Por ejemplo, Liu et al informan de una la expresión en exceso de ABCC3 de 459 veces con respecto a la línea celular precursora, MCF-7/ advp3000, que fue derivada mediante selección para crecimiento en presencia de doxorrubicina (36). Además, se ha demostrado recientemente que el tratamiento de las líneas celulares de carcinoma con vincristina da como resultado un aumento significativo en la regulación de los transcritos de ABCC2 y ABCC3 en estas células (37). Se ha demostrado que la bombas ABCC2 (MRP2) y abcc10 (MRP7) relacionadas confieren resistencia al paclitaxel cuando se expresan en exceso (38) (39), y se ha demostrado que ABCC2 es un determinante importante de la farmacocinética del paclitaxel *in vivo* en modelos de ratón (40). No se ha demostrado previamente que el paclitaxel sea un sustrato para ABCC3 y, de hecho, los estudios de expresión ectópica en exceso de ABCC3 en células MDCK o NIH-3T3 no han podido demostrar mayor resistencia al paclitaxel (41, 42). En particular, también se ha descubierto (41) que ABCC3 no puede transmitir resistencia a la doxorrubicina en ensayos a largo plazo a pesar de otros informes publicados de estudios funcionales que sugieren un papel para ABCC3 en el transporte de este agente (36).

Estas diversas observaciones ilustran el hecho de que el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que puede eludir la quimioterapia a través de múltiples mecanismos y ponen de relieve la necesidad de paneles de biomarcadores que puedan ser utilizados para predecir la respuesta terapéutica en los pacientes con cáncer.

Sumario de la invención

50 Un aspecto de la presente invención proporciona un método de acuerdo con la reivindicación 1.

La amplificación del gen ABCC3 se detecta, por ejemplo, determinando el número de copias de del gen ABCC3. En algunas realizaciones, un número de copias de al menos 3 indica la amplificación del gen ABCC3, en otras realizaciones, un número de copias de al menos 5 indica la amplificación del gen ABCC3.

55 El número de copias del gen ABCC3 Gene se determina, por ejemplo, por fluorescencia de hibridación *in situ* (FISH), transferencia Blot, inmunohistoquímica (IHC), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa (qPCR), PCR cuantitativa en tiempo real (QRT - PCR), hibridación genómica comparativa, hibridación genómica comparativa basada en micromatrices, o reacción en cadena de la ligasa (LCR).

60 En una realización, la expresión en exceso del gen ABCC3 se detecta al determinar el nivel de la transcripción del ARNm del gen ABCC3. En algunas realizaciones, la expresión en exceso del gen ABCC3 está indicada por un aumento de al menos 5 veces en el nivel de transcripción del ARNm del gen ABCC3 en la muestra de cáncer de ensayo con respecto a una muestra de control. En otras realizaciones, la expresión en exceso del gen ABCC3 está indicada por un aumento de al menos 25 veces en la transcripción del ARNm del gen ABCC3 en la muestra de cáncer de ensayo con respecto a una muestra de control.

En otra realización, la expresión en exceso del gen ABCC3 se detecta al determinar el nivel de expresión del polipéptido ABCC3. En algunas realizaciones, el nivel de expresión del polipéptido ABCC3 comprende poner en contacto la muestra de ensayo de cáncer con anticuerpos anti-ABCC3 y detectar la unión de los anticuerpos anti-ABCC3 con los polipéptidos ABCC3. En algunas realizaciones, la expresión en exceso del gen ABCC3 se indica por un aumento de por lo menos 2 veces en el nivel de expresión del polipéptido ABCC3 en muestra de cáncer de ensayo relativa a una muestra de control. En otras realizaciones, la expresión en exceso del gen ABCC3 está indicada por un aumento de al menos 10 veces en el nivel de expresión del polipéptido ABCC3 en la muestra de cáncer de ensayo relativa a una muestra de control.

En algunas realizaciones, el agente anti-mitótico se selecciona del grupo que consiste en taxanos (incluyendo, por ejemplo paclitaxel y docetaxel), maitansinoides (incluyendo, por ejemplo, DM1 y DM4), y auristatinas (incluyendo, por ejemplo, monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F (MMAF)), y análogos y derivados de los mismos.

En una realización, el conjugado de agente antimitótico-anticuerpo es un conjugado de maitansinoide-anticuerpo conjugado anti-her2, tal como trastuzumab-dm1.

En algunas realizaciones, el tumor canceroso de mama es un tumor canceroso de mama positivo para Her-2.

La invención también proporciona un conjugado de agente antimitótico-anticuerpo que comprende un agente antimitótico seleccionado entre una auristatina y un maitansinoide unido covalentemente a un anticuerpo, para su uso en un método para tratar una paciente con cáncer de mama que es resistente al conjugado de agente antimitótico-anticuerpo, comprendiendo el método administrar a la paciente un antagonista de ABCC3 y el conjugado de agente antimitótico-anticuerpo, en el que el cáncer de mama de la paciente se ha determinado como resistente al conjugado de agente antimitótico-anticuerpo por detección que el gen ABCC3 se ha amplificado o expresado en exceso en una muestra de cáncer de mama de la paciente.

La invención también proporciona un antagonista de ABCC3 para su uso en un método para tratar una paciente con cáncer de mama que es resistente al conjugado de agente antimitótico-anticuerpo, que comprende un agente antimitótico seleccionado entre una auristatina y un maitansinoide unido covalentemente a un anticuerpo, comprendiendo el método administrar a la paciente el antagonista de ABCC3 y el conjugado de agente antimitótico-anticuerpo, en el que el cáncer de mama de la paciente se ha determinado como resistente al conjugado de agente antimitótico-anticuerpo por detección que el gen ABCC3 se ha amplificado o expresado en exceso en una muestra de cáncer de mama de la paciente.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1a ilustra una respuesta in vitro de líneas celulares de cáncer de mama a MMAE. La Fig. 1b ilustra una respuesta in vitro de líneas celulares de cáncer de mama a paclitaxel. En el eje X, las líneas celulares se clasificaron en los principales subtipos moleculares de cáncer de mama. El eje Y indica el valor de CI50 in vitro, o concentración de fármaco que se tradujo en un 50 % de inhibición de la viabilidad celular. Las líneas horizontales indican la sensibilidad promedio a cada agente de las líneas celulares de un determinado subtipo.

La Fig. 2a muestra que la resistencia in vitro a paclitaxel está asociada con la amplificación de la región del cromosoma 17q21. La Fig. 2b muestra que la resistencia in vitro a MMAE está asociada con la amplificación de la región del cromosoma 17q21. Las líneas celulares se muestran en orden de sensibilidad creciente al agente de izquierda a derecha. Las clasificaciones (sensible, intermedio, resistente) utilizados para el análisis supervisado de la matriz de datos SNP y la identificación de biomarcadores de resistencia se indican en la parte superior de la figura. Las líneas celulares con amplificación del número de copias del ADN genómico se indica con un rombo.

La Fig. 3 muestra que ABCC3 está expresado en exceso en líneas celulares con amplificación del 17q21. 30. Treinta y un líneas celulares se clasificaron en clases amplificadas y no amplificadas según el número de copias con un corte de 4 en la región. Los diagramas de caja y bigotes muestran expresión de ABCC3 en cada grupo. 208161_s_at fue seleccionada como el conjunto de sonda de expresión Affymetrix más variable que representa la expresión de ABCC3. Otros conjuntos de sonda dieron resultados similares. La caja central representa el rango intercuartil, la línea dentro de la caja indica la mediana, y la línea vertical discontinua se extiende a los puntos de datos más alejados de la media pero dentro de 1,5 veces el intervalo intercuartil. Los puntos de datos fuera de las líneas verticales discontinuas se representan por círculos individuales.

Las Figuras 4a-4d muestran gráficos que representan el índice mitótico en respuesta a paclitaxel para el tratamiento de cuatro líneas celulares diferentes después del tratamiento con ABCC3 o ARNip control. Las células Efm-192a (a) y zr-75-30 (b) tienen amplificación y expresión en exceso de ABCC3 y muestran una mayor sensibilidad (aumento del índice mitótico) tras desactivación genética mientras que HCC-1428 (c) y MDA-MB-453 (d) tienen un bajo número de copia y de expresión y no muestran aumento de la sensibilidad.

La figura 5 muestra que la expresión en exceso estable de ABCC3 da como resultado resistencia in vitro a paclitaxel y MMAE. Líneas celulares estables derivadas de clones de una sola célula que expresan en exceso ABCC3 desde el promotor de CMV o una línea de control con vector vacío fueron analizadas para los efectos

inhibitorios sobre el crecimiento paclitaxel (Fig. 5A) o MMAE (Figura 5b).

La Fig. 6 muestra la inhibición del crecimiento de líneas celulares de cáncer de mama tratadas con MMAE (a) o paclitaxel (b). Los puntos representan la media de cuatro pocillos replicados de una placa de 384 pocillos con curvas de dosis – respuesta de ajuste no lineal. El eje y indica el porcentaje de la viabilidad celular relativa los pocillos tratados con vehículo de control. Las barras de error indican desviaciones estándar.

La Fig. 7 muestra tres clones con expresión en exceso de ABCC3 y una línea de células de control analizada para la sensibilidad a DM1 libre en un ensayo normalizado de la viabilidad celular.

La Fig. 8 muestra un gráfico que representa el índice mitótico de células EFM-192a transfectadas con ARNip control (NTC) o ABCC3 cuando se tratan con trastuzumab-mc-vc-PAB-MMAF.

La Fig. 9a muestra la respuesta mitótica de las células EFM-192a transfectadas con ARNip control (NTC) o ABCC3 cuando tratan con DM1 libre. La Fig. 9B muestra la respuesta mitótica de las células EFM-192a transfectadas con ARNip control (NTC) o ABCC3 cuando se tratan con T - DM1.

La Fig. 10 muestra el resultado de un análisis FISH realizado en muestras obtenidas de un ensayo en fase II con T-DM1

La Fig. 11 es una Tabla con información sobre el subtipo molecular de líneas celulares y su sensibilidad a los fármacos antimitóticos.

Descripción detallada de las realizaciones

I. DEFINICIONES

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

El término "ABCC3", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier ABCC3 nativo (también conocido como MRP-3) de cualquier fuente de vertebrados, incluyendo mamíferos tales como los primates (por ejemplo, los seres humanos y los monos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término abarca ABCC3 sin transformar "de longitud completa", así como cualquier forma de ABCC3 que dé como resultado la transformación de la célula. El término abarca también las variantes de ABCC3 natural, por ejemplo, variantes de corte y empalme, variantes alélicas y otras isoformas. El término abarca también los fragmentos o variantes de un ABCC3 nativo que mantienen al menos una actividad biológica de ABCC3. Los ejemplos de ABCC3s incluyen los identificados con números de acceso NM-003786 GenBank (humanos) y XM-358306 (ratón). Véase también, Kiuchi, et al. FEBS Lett. 433:149-152 (1998); y Borst, et. Al., JNCI 92 (16): 1295-1302 (2000).

El término "variación genética" incluye variaciones en la amplificación de un gen o polipéptido así como variaciones en la secuencia de aminoácidos o secuencia polinucleotídica.

La expresión "trastorno de proliferación celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a los trastornos que se asocian con un cierto grado de proliferación anormal de células. En una realización, el trastorno de proliferación celular es cáncer.

"Tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento celular y la proliferación neoplásica ya sea maligna o benigna, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno de proliferación celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes tal como se indica en el presente documento.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por el crecimiento/proliferación celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma (por ejemplo, Hodgkin y no Hodgkin), blastoma, sarcoma, leucemia. Más ejemplos concretos de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioma, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal, o carcinoma endometrial uterino, el carcinoma de la glándula salival, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, carcinoma hepático, cáncer de tiroides, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Un paciente de cáncer que "responde al tratamiento" o es "sensible al tratamiento" con antimitóticos es uno que muestra beneficio clínico o terapéutico como resultado del tratamiento con el agente antimitótico. Este beneficio incluye respuestas celulares o biológicas, una respuesta completa, una respuesta parcial, una enfermedad estable (sin progresión o recaída), o una respuesta del paciente del o como resultado del tratamiento con el agente con una recaída.

Un cáncer, célula cancerosa o tumor canceroso que es "resistente al tratamiento" con un agente antimitótico es uno

que no muestra respuesta celular o biológica estadísticamente significativo al agente. Por el contrario, el cáncer, las células cancerosas o tumores cancerosos que no son resistentes al tratamiento con el agente muestran respuestas celulares o biológicas estadísticamente significativas al agente, tales como, por ejemplo, un aumento en la tasa de muerte celular, apoptosis, o disminución de la proliferación o el crecimiento en comparación a las células de cáncer o tumores que no han sido tratado con el agente. En realizaciones concretas, un cáncer, célula cancerosa, o tumor canceroso es resistente al tratamiento con MMAE si la CI50 es mayor que 30 nM o superior a 50 nM, o mayor de 100 nM de MMAE. En otras realizaciones, un cáncer, célula cancerosa, o tumor canceroso es resistente al tratamiento con paclitaxel si la CI50 es mayor de 50 nM, o mayor de 100 nM o superior a 500 nM o superior a 1000 nM de paclitaxel.

"Un agente antimitótico" es un compuesto que inhibe, impide o interrumpe la mitosis. Ejemplos específicos de agentes antimitóticos incluyen, pero no se limitan a, taxanos, como el paclitaxel y docetaxel; maitasinoideos, tales como DM1 y DM4; dolastatina 10; dolastatina 15; auristatins, tales como el auristatina E (MMAE) y el auristatina F (MMAF); alcaloides de la vinca, tales como vinblastina y vincristina; y derivados y análogos de los mismos. El agente antimitótico está opcionalmente conjugado con un anticuerpo.

Los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto a tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas profilácticas o preventivas, caracterizado en el que el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio fisiológico o trastorno no deseado, tales como el desarrollo o la propagación del cáncer. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, la disminución de la extensión de la enfermedad, estabilización (es decir, no empeoramiento) de la patología, retrasar o ralentizar la progresión de la enfermedad, la mejora o la paliación de la patología, y remisión (parcial o total), si ya sea perceptible o imperceptible. "Tratamiento" puede significar también prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Las personas necesitadas de tratamiento incluyen las que ya tienen la dolencia o trastorno así como aquellos propensos a tener la dolencia o trastorno o aquellos en los que la dolencia o trastorno debe evitarse.

Un "individuo" o un "paciente" es un vertebrado. En algunas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales de granja (como vacas), animales para práctica deportiva, mascotas (como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas. En algunas realizaciones, un paciente es un ser humano.

Una cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y por periodos de tiempo necesario, para conseguir el deseado resultado terapéutico o profiláctico.

"Una cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención puede variar en función de factores tales como la patología, edad, sexo y peso de la persona, y la capacidad de la sustancia/molécula para provocar 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 terapéutica está contrarrestado por los efectos beneficiosos. "Cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y por periodos de tiempo necesaria para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, como se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa temprana de la enfermedad, una cantidad profilácticamente eficaz sería inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

El término "agente citotóxico" como se utiliza en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o impide una función celular y/o causa la muerte o destrucción celular. Se pretende que el término incluya los isótopos radiactivos (por ejemplo, ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P, ²¹²Pb e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina c, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos como nucleolítica enzimas, antibióticos, y toxinas como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos descritos a continuación. Otros agentes citotóxicos se describen a continuación. Un agente "tumorocida" provoca la destrucción de las células tumorales.

Una "toxina" es cualquier sustancia que puede tener un efecto perjudicial en el crecimiento o proliferación de una célula.

"Un agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer.

El término "antagonista" se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que parcial o totalmente bloquea, inhibe o neutraliza una actividad biológica de un polipéptido, tal como ABCC3, o la transcripción o traducción del mismo. Moléculas antagonistas adecuadas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos antagonistas, fragmentos de polipéptidos, oligopéptidos, moléculas orgánicas (incluyendo moléculas pequeñas), y ácidos nucleicos sin sentido, incluyendo ARnp.

"Anticuerpos" (Ab) e "inmunoglobulinas (Ig) se refieren a las glicoproteínas de características estructurales similares.

Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas, incluyen tanto los anticuerpos y otras moléculas de tipo anticuerpo que en general carecen de especificidad antigénica. Los polipéptidos del último tipo por ejemplo, se producen en niveles bajos por el sistema linfático y a mayores niveles en los mielomas.

5 Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan indistintamente en el sentido más amplio e incluir los 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 tengan la actividad biológica deseada) y también puede incluir ciertos fragmentos de anticuerpos (como se describe en mayor detalle en el presente documento). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

15 El término "anticuerpo anti-ABCC3" o "un anticuerpo que se une a ABCC3" se refiere a un anticuerpo que puede unirse a ABCC3 con suficiente afinidad tal que el anticuerpo es útil como agente diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse a ABCC3. Preferiblemente, la medida de la unión de un anticuerpo anti-ABCC3 a otra proteína no ABCC3 es menor del 10 % de la unión del anticuerpo a ABCC3 medidos, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En algunas realizaciones, un anticuerpo que se une a ABCC3 tiene una constante de disociación (K_d) $< 1 \mu\text{M}$, $< 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-ABCC3 se une a un epítipo de ABCC3 que se conserva entre ABCC3 de diferentes especies.

20 Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo que se encuentra en su forma prácticamente intacta, no es un fragmento de anticuerpo como se define a continuación. Las expresiones se refieren especialmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que incluyen la región Fc.

25 "Fragmentos de anticuerpo" comprenden solamente una parte de un anticuerpo intacto, en el que la porción retiene al menos una, y como máximo la mayoría o todas, las funciones normalmente asociadas con dicha parte cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y por tanto retiene la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, uno que comprende la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función ADCC y unión complementaria. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a la de un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede incluir un brazo de unión a antígeno unido a una secuencia Fc que puede transmitir estabilidad *in vivo* al fragmento.

35 La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno de ellos con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar rápidamente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y puede reticular el antígeno.

45 "Fv" es un fragmento de anticuerpo mínimo que incluye un sitio de unión a antígeno completo. En una realización, una especie Fv bicatenaria consiste en un dímero de un dominio variable de cadena ligera y de cadena pesada en asociación no covalente estrecha. En las especies de Fv (scFv) monocatenarias, un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada pueden estar covalentemente unidos mediante un enlazador peptídico flexible tal que las cadenas ligera y pesada se pueden asociar con una estructura "dímera" análoga a la de las especies Fv bicatenarias. Es en esta configuración que los tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, los seis CDR transmiten especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicos de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con menor afinidad que el sitio de unión completo.

50 El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena ligera y pesada y también contiene el primer dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación del presente documento para la Fab' en la que el resto o restos cisteína de los dominios constantes tengan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(AB')_2$ fragmentos se producen originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

60 Los fragmentos de anticuerpo Fv de cadena única" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En general, el polipéptido scFv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios VH y VL que permite al scFv formar la estructura deseada para unión al antígeno. Para una revisión del scFv véase Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer - Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a los pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre ambos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más detalladamente en, por ejemplo, los documentos EP 404097; WO93/1161; Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134.

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades menores. Así, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que no es una mezcla de anticuerpos discretos. En algunas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal incluye normalmente un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido que se une a una diana, en el que la secuencia de polipéptido de unión a la diana se mediante un proceso que incluye la selección de una sola secuencia de polipéptido de unión a la diana entre una pluralidad de secuencias de polipéptido. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon de una pluralidad de clones, tales como un combinación de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que una secuencia de unión a la diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, humanizar la secuencia de unión a la diana, mejorar su producción en cultivo celular, reducir su inmunogenicidad *in vivo*, 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 la presente invención. En contraste con las preparaciones de anticuerpo policlonal que suelen incluir diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único factor determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas porque normalmente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica el carácter de los anticuerpos como obtenidos a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por algún cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por varias técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling et al., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con N° 4816567), tecnologías de expresión en fagos (véase, por ejemplo, Clackson et al., Nature, 352: 624 a 628 (1991); Marcos et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338 (2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340 (5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., J. Immunol. Methods 284 (1 - 2): 119-132 (2004), y tecnologías para la producción de anticuerpos humano o de tipo humano en animales que tienen parte o la totalidad de los loci de los genes de la inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de la inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO98/24893; WO96/34096; WO96/33735; WO91/10741; Jakobovits et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993); Bruggeman et al. Year in Immunol. 7: 33 (1993); las patentes de los Estados Unidos con números 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5661016; Marks et al., Bio. Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immuno. 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen concretamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homologa a las correspondientes secuencias de anticuerpos derivados de una especie en particular o pertenecientes a una determinada clase o subclase de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homologo a las correspondientes secuencias de anticuerpos derivados de otra especie o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de anticuerpos, mientras exhiben la actividad biológica deseada (patente de los Estados Unidos con N° 4816567; y Morrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los restos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, conejo, o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad, y/o capacidad deseada. En algunos casos, los restos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes restos. Además, los anticuerpos humanizados pueden incluir restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. . Estas modificaciones pueden realizarse para perfeccionar el

comportamiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado constará sustancialmente todos de por lo menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a una inmunoglobulina no humana, y todos o casi todos los del FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado, opcionalmente, también comprenden al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y las referencias citadas en los mismos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlé y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

Un "anticuerpo humano" es uno que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha realizado utilizando cualquiera de las técnicas para fabricar anticuerpos humanos como se indica en el presente documento. Estas técnicas incluyen cribar bibliotecas combinatorias derivadas de ser humano, tales como bibliotecas de expresión en fagos (véase, por ejemplo, Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) y Hoogenboom et al. *Nucl. Acids res.*, 19: 4133-4137 (1991)); el uso de líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano en la producción de anticuerpos monoclonales humanos (véase, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51 a 63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)); y la generación de anticuerpos monoclonales en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden producir un completo repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena (véase, por ejemplo, Jakobovits et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggemann et al. *Year en Immunol.*, 7: 33 (1993)). Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno de un animal no humano.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con uno o más alteraciones en uno o varios de sus CDR que resultan en una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, comparado con anticuerpo progenitor que no tiene dichas. En una realización, un anticuerpo madurado por afinidad tiene afinidades nenomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante cambio de dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de HVR y/o restos marco se ha descrito por: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce una actividad biológica del antígeno al que se une. Ciertos anticuerpos de bloqueo o antagonistas inhiben parcial o totalmente la actividad biológica del antígeno.

"Funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una secuencia nativa de la región FC o una secuencia de aminoácidos variante de la región FC) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de las funciones efectoras del anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); la fagocitosis; regulación por defecto de los receptores de la superficie celular (*por ejemplo*, receptor de linfocitos B); y la activación de linfocitos B.

"Receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR nativo. En algunas realizaciones, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye los receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y de corte y empalme alternativo de dichos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen similares secuencias de aminoácidos que se diferencian principalmente en los dominios citoplásmicos. El receptor de activación FcγRIIA incluye un motivo de activación del inmunoreceptor basados en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. La inhibición de FcγRIIB incluye un motivo de inhibición del inmunoreceptor basados en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR son objeto de revisión en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas et al. *J. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están englobados por el término "CIC" en el presente documento.

El término "receptor fc" o "CIC" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)) y la regulación de la homeostasis de las inmunoglobulinas. Se conocen los métodos de medición de la unión a FcRn. La unión a los FcRn humanos *in vivo* y la semivida en suero de los polipéptidos de unión con alta afinidad a los FcRn se pueden someter a ensayo, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano o primates re reciben polipéptidos con FC variantes.

El documento WO00/42072 (presta) describe variantes de anticuerpos con mayor o menor unión los FcR. El contenido de esa publicación de patente se incorpora específicamente incorporado al presente documento por referencia. Véase, también, Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9 (2): 6591-6604 (2001).

5 Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En algunas realizaciones, las células expresan al menos FcγRIII y realizan funciones efectoras ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), los linfocitos citolíticos (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos. Las células efectoras pueden estar aisladas de una fuente natural, por ejemplo, de sangre.

10 La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de la citotoxicidad en la que la inmunoglobulina se une a receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células efectoras citotóxicas (por ejemplo, los linfocitos citolíticos (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten que las células efectoras citotóxicas que se unen específicamente una célula diana que tiene el antígeno y, posteriormente, destruir la célula diana con citotoxinas. Las células primarias para la mediación de ADCC, linfocitos NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas se resume 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, se puede usar un ensayo in vitro de ADCC, como el descrito en la patente de los Estados Unidos con N° 5500362 o 5821337 o en la patente de los Estados Unidos con N° 6737056 de Presta. Las células efectoras útiles en dichos son las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y los linfocitos citolíticos (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo, en un modelo animal como la que se describe en Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

25 La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de la célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se iniciada por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo CDC, por ejemplo, como el descrito en Gazzano Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

30 Las variantes de polipéptido con alteración de las secuencias de aminoácidos de la región Fc y aumento o disminución de la capacidad de la Unión de C1q se describen en la patente de los Estados Unidos con N° 6194551b1 y en el documento WO99/51642. El contenido de las publicaciones de patentes está específicamente incorporado al presente documento por referencia. Véase, también, Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

35 La expresión "polipéptido que comprende la región FC" se refiere a un polipéptido, como un anticuerpo o immunoadhesina, que comprende una región FC. El extremo C de la lisina (resto 447 según el sistema de numeración de la UE) de la región Fc puede ser eliminado, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o recombinando mediante ingeniería genética el ácido nucleico que codifica el polipéptido. En consecuencia, una composición que comprende un polipéptido con una región Fc de acuerdo con la presente invención puede componerse de polipéptidos con K447, con todos K447 eliminados, o una mezcla de polipéptidos con y sin el resto K447.

45 Un "anticuerpo citotóxico" es un anticuerpo que es capaz de una función efectora y/o inducir la muerte celular en la unión a su antígeno diana.

Un "inmunoconjugado" o "anticuerpo conjugado" se refiere a un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos.

50 Una "molécula pequeña" o "molécula pequeña orgánica" se define en el presente documento como una molécula orgánica con un peso molecular inferior a 500 daltons.

Un "Oligopéptido de unión a ABCC3" o un "oligopéptido que se une a ABCC3" o un "oligopéptido que se une al polipéptido ABCC3" es uno capaz de unirse a los oligopéptidos de ABCC3 con suficiente afinidad tal que el oligopéptido es útil como agente diagnóstico y/o terapéutico contra ABCC3. En algunas realizaciones, la medida de la unión de un oligopéptido de unión a ABCC3 a otra proteína no ABCC3 es menos de aproximadamente el 10 % de la unión del oligopéptido de unión a ABCC3 medidos, por ejemplo, por un ensayo de resonancia de plasmón superficial. En algunas realizaciones, un oligopéptido de unión a ABCC3 tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 1 mM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, o $\leq 0,1$ nM.

60 Una "Molécula orgánica de unión a ABCC3" o "una molécula orgánica que se une a ABCC3" o "Molécula orgánica de unión al polipéptido ABCC3" es una molécula orgánica diferente a un oligopéptido o anticuerpo tal como se define en el presente documento que puede unirse a ABCC3 con suficiente afinidad tal que la molécula orgánica es útil como un agente diagnóstico y/o terapéutico contra ABCC3. En algunas realizaciones, la medida de la unión de una molécula orgánica de unión a FGFR2 con una proteína no ABCC3 no relacionada es menos del 10 % de la unión de la Molécula orgánica de unión a ABCC3 medidas, por ejemplo, con un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

En algunas realizaciones, una molécula orgánica de unión a ABCC3 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 $\leq 0,1 \text{ nM}$.

La constante de disociación (Kd) de cualquier molécula que se une a un polipéptido diana puede medirse convenientemente mediante un análisis de resonancia de plasmón superficial. Estos ensayos pueden emplear un BIACORE™ - 2000 o un BIACORE™ - 3000 (BIACORE, Inc., Piscataway, N. J.) a 25 °C con el polipéptido diana inmovilizado en chips CM5 a ~ 10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y n-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El polipéptido diana se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 8, a 5 µg/ml (~ 0,2 µm) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para alcanzar aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del polipéptido diana, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los os sin reaccionar. Para las mediciones de la cinética, diluciones dobles en serie de la molécula de unión (0,78 nM a 500 nM) se inyectan en PBS con 0,05 % de Tween 20 (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (K_{on}) y disociación (K_{off}) se calculan utilizando un modelo simple de Langmuir monario (Programa informático de evaluación BIACORE versión 3. 2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de equilibrio de disociación (Kd) se calcula como el cociente K_{off}/K_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al. (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Si la tasa de un anticuerpo supera $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ según el ensayo de resonancia de plasmón superficial anteriormente, entonces la tasa de asociación se puede determinar mediante el uso de una técnica de apagado de la fluorescencia que mide el aumento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nM; emisión = 340 nM, 16 Nm de paso de banda) a 25 °C de un anticuerpo (FAB) 20 nM en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medido en un espectrómetro, tales como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instrumento) o un espectrofotómetro 8000 Series SLM Aminco (Thermospectronic) con cubeta de agitación.

La palabra "etiqueta" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable. La etiqueta puede ser detectable por sí misma (*por ejemplo*, etiquetas de radioisótopo o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, pueden catalizar la alteración química de un compuesto o composiciones sustrato que da como resultado un producto detectable. Los radionucleidos que pueden servir como etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, el ^{131}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{188}Re , ^{186}Re , ^{211}At , ^{67}Cu , ^{212}Bi y ^{109}Pd .

Una molécula biológica "aislada", tales como el ácido nucleico, polipéptidos, o anticuerpo, es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de al menos uno de los componentes de su entorno natural.

35 II. DESCRIPCIÓN DE ALGUNAS REALIZACIONES

Los tumores de mama primarios puede clasificarse en al menos tres subtipos principales de perfiles de expresión génica y los subtipos tienen diferentes resultados pronósticos en términos de supervivencia de los pacientes (9). Los cánceres de mama luminales suelen ser positivos al receptor de estrógeno se caracterizan por la expresión coordinada de numerosos genes epiteliales específicos, un pronóstico relativamente bueno, y buenas tasas de respuesta a las terapias hormonales. Los cánceres de mama positivos para HER2 se caracterizan por su alto nivel de amplificación del oncogén HER2, relativamente mal pronóstico sin tratamiento, y beneficio clínico significativo en la actualidad del anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptina, Genentech) dirigido contra HER2 (3). Los cánceres de mama de tipo basal suelen carecer de expresión del receptor de progesterona, ER y HER2, y por lo tanto se refieren a veces como tumores "triple negativo" (10, 11). Los cánceres de mama de tipo basal tienen un pronóstico relativamente malo y actualmente no han demostrado responder a ninguna terapia dirigida (12). Estos subtipos muestran respuesta diferencial a los regímenes de quimioterapia preoperatoria (13) pero para la mayor parte de los mecanismos subyacentes a estas diferencias en la resistencia a fármacos aún no se han determinado.

Estudios recientes han revelado que las grandes colecciones de líneas celulares de cáncer de mama reflejan muchos de los cambios genéticos y genómicos característicos de los tumores de mama y por lo tanto pueden servir como sistema modelo para una población molecularmente heterogénea de cánceres de mama (14). Por ejemplo, las células pueden clasificarse en subtipos basales y luminales según perfiles de firmas de expresión génica, y conservan la mayor parte de la serie de amplificaciones y supresiones de alto nivel que se asocian con malos resultados en tumores primarios (14).

La clasificación molecular del cáncer de mama en subtipos con características comunes y similares resultados pronósticos proporciona un marco para iniciar esfuerzos para individualizar la terapia del cáncer. La presente invención demuestra que los subtipos de cáncer de mama muestran claras diferencias en la respuesta a los agentes antimetabólicos, siendo el subtipo basal el más sensible. Un mecanismo de esta respuesta diferencial es la amplificación de la bomba de salida del fármaco ABCC3 que se observó en un subconjunto de líneas celulares luminales y amplificadas mediante HER2 pero no en líneas celulares de tipo basal.

Como se describe en los ejemplos, la presente invención utiliza un panel de líneas celulares de cáncer de mama molecularmente caracterizado como un modelo para análisis farmacogenómico para identificar los mecanismos de resistencia y diferencias de subtipo en respuesta a tratamientos basados en antimetabólicos, monometil-auristatina-E

- (MMAE) y paclitaxel. MMAE está estructuralmente relacionado con dolastatina 10, un pentapéptido, producto natural que ha sido objeto de varios ensayos clínicos en seres humanos para el tratamiento del cáncer, y exhibe potentes actividades antitumorales mediante la inhibición de la polimerización de tubulina y así desestabilizar los microtúbulos celulares (15). Los conjugados de auristatina conjugados con anticuerpos monoclonales se han desarrollado con la justificación de que la entrega selectiva de fármaco a través del reconocimiento del antígeno específico por el anticuerpo conducirá a una mayor eficacia quimioterapéutica, evitando toxicidad a los tejidos que no expresan la diana. (15). Paclitaxel y el compuesto relacionado docetaxel son fármacos citotóxicos contra el cáncer que estabilizan los microtúbulos y son ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer de mama (16).
- 10 Sobre la base de estos estudios establecidos en los ejemplos, se ha descubierto que la amplificación de una región del cromosoma 17 (17q21) estaba fuertemente asociada con la resistencia *in vitro* a taxanos y auristatinas. La región de amplificación contiene al menos 100 genes. Con el fin de identificar el gen, se usó un enfoque imparcial que consistía en un análisis de ARN de interferencia y de alto contenido para mostrar que la expresión en exceso de la amplificación y concomitante del gen ABCC3 tiene mayor probabilidad de ser el responsable de conferir resistencia a paclitaxel y MMAE. También se ha demostrado que este amplicón está presente en los tumores de mama primarios y que es común en los tumores luminales amplificados con HER2, pero no en las células de tipo basal (Figuras 6 y 9).
- 20 En consecuencia, un aspecto de la invención proporciona métodos para determinar si un cáncer será resistente a tratamiento con un conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo que comprende un agente antimetabólico seleccionado entre una auristatina y un maitasinoide unidos covalentemente a un anticuerpo, comprendiendo dicho método detectar si el gen ABCC3 está amplificado o expresado en exceso en una muestra de ensayo de cáncer de mama procedente de la paciente, en la que la amplificación o la expresión en exceso del gen ABCC3 indica que el cáncer de mama es resistente al tratamiento con el conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo.
- 25 El número de copia génica se puede determinar por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, por fluorescencia de hibridación *in situ* (FISH), transferencia Southern, inmunquímica (IHC), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa (qPCR), PCR cuantitativa en tiempo real (QRT - PCR), hibridación genómica comparativa, hibridación genómica comparada basada en micromatrices, o reacción en cadena de la ligasa (LCR). Véase, por ejemplo, Avison, M., *Measuring Gene Expression*, Nueva York: Taylor & Francis Group, 2007, Allison, D. B., et al, Ed. *DNA Microarrays and Related Genomics Techniques: Design, Analysis, and Interpretation of Experiment* (Biostatistics), Boca Raton: Chapman & Hill/CRC, 2006; Hayat M. A., ed., *Handbook of Immunohistochemistry and *In Situ* Hybridization of Human Carcinomas*, Burlington: Elsevier Academic Press, 2004.
- 30 La expresión en exceso del gen ABCC3 indica que el cáncer es resistente al agente antimetabólico. La detección de expresión en exceso de ABCC3 puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica. En una realización, se detecta la expresión en exceso del gen ABCC3 para determinar el nivel de la transcripción del ARNm del gen ABCC3. Los niveles de transcripción del ARNm se pueden determinar, ya sea cuantitativa o cualitativamente, por diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los niveles de transcripción del ARNm también pueden determinarse directamente o indirectamente mediante la detección de niveles de ADNc generados por el ARNm. Los métodos ilustrativos para determinar los niveles de transcripción del ARNm incluyen, pero sin limitación, PCR, RT - PCR cuantitativa en tiempo real y ensayos basados en hibridación, incluyendo ensayos basados en micromatrices y ensayos en filtros tales como transferencias Northern. En algunas realizaciones, el gen ABCC3 está expresado en exceso si el nivel de la transcripción del ARNm es al menos un 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 veces mayor en la transcripción del ARNm frente a una muestra de control adecuada.
- 35 En otras realizaciones, la expresión del gen ABCC3 se detecta para determinar el nivel de expresión del polipéptido ABCC3. Los niveles del polipéptido ABCC3 pueden determinarse, ya sea cuantitativa o cualitativamente, por ciertos métodos conocidos para los expertos en la materia, incluidos los métodos de detección basados en anticuerpos. En una realización, la detección de la expresión del gen ABCC3 en una muestra de cáncer de ensayo consiste en poner en contacto la muestra de cáncer de ensayo con un anticuerpo anti-ABCC3 y determinar el nivel de expresión (cuantitativa o cualitativa) de ABCC3 en la prueba de detección de cáncer muestra por la unión de la anticuerpo anti-ABCC3 contra el polipéptido ABCC3. En algunas realizaciones, la Unión de un anticuerpo anti-ABCC3 al polipéptido ABCC3 puede detectarse por diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, inmunohistoquímica, clasificación celular activada por fluorescencia, transferencia Western, radioinmunoensayo, ELISA, y similares. En algunas realizaciones, la expresión en exceso de ABCC3 significa al menos un 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 veces mayor en los niveles de polipéptido ABCC3 en comparación con una muestra de control adecuada.
- 40 Una muestra de las células de cáncer, o muestra de cáncer de ensayo, comprende células tomadas directamente del tumor canceroso, pero la muestra de cáncer de ensayo también puede comprender células cancerosas metastásicas, células tumorales circulantes, o cualquier muestra de células adecuada que identifique la amplificación o expresión de la condición del gen ABCC3.
- 45 Los controles adecuados para determinar la expresión en exceso de ABCC3 en el cáncer pueden generarse, por ejemplo, determinando el nivel de expresión de ABCC3 en muestras de tejidos o células control que expresan un

nivel normal de ABCC3 y comparar el nivel de expresión de ABCC3 en el cáncer con el nivel de expresión de ABCC3 en la muestra de control. Como alternativa, puede generarse un control mediante la determinación de la expresión de un gen constitutivo (tales como un miembro de la familia de la actina) en la misma muestra de cáncer de ensayo utilizada para determinar la expresión en exceso de ABCC3, o en una muestra del mismo cáncer que se va a someter a ensayo para determinar la expresión en exceso de ABCC3. El gen constitutivo actúa como un control comparativo para el que determinar la expresión en exceso del gen ABCC3.

La detección de la amplificación y/o expresión en exceso de ABCC3 permite en consecuencia seleccionar para los pacientes que padecen cáncer un método de tratamiento adecuado con más probabilidades de tratar con éxito su cáncer.

En una realización adicional, la paciente es una paciente con cáncer de mama positivo para HER2. La expresión o amplificación de HER2 en el cáncer de mama (el cáncer de mama positivo para HER2) se asocia con mayor beneficio clínico de la adición del agente antimetabólico paclitaxel tras tratamiento adyuvante con doxorubicina en comparación con pacientes con cáncer de mama negativo para HER2, positivo para el receptor de estrógeno, con afectación ganglionar (52). Sin embargo, una fracción significativa de las mujeres con tumores HER2 positivos no consigue mostrar un beneficio en la supervivencia de este tratamiento (52), sugiriendo que están presentes mecanismos de resistencia a paclitaxel en una proporción de tumores de mama positivos para HER2. Esta resistencia a los agentes antimetabólicos es motivo de especial preocupación para los regímenes terapéuticos que utilizan anticuerpos anti-HER2 conjugados con agentes antimetabólicos, tales como, por ejemplo, conjugados de anticuerpos trastuzumab-dm1. Como se ilustra en los ejemplos, la expresión en exceso de ABCC3 está asociada con la resistencia al tratamiento con conjugados de trastuzumab-agente antimetabólico. Por el contrario, la inactivación genética del gen ABCC3 con ARNip aumenta la sensibilidad de las células al tratamiento con conjugados de trastuzumab-agente antimetabólico. En consecuencia, la invención proporciona métodos para seleccionar una paciente con cáncer de mama positivo para HER2 para el tratamiento con conjugado de anticuerpos anti-HER2-agente antimetabólico.

También se describen en el presente documento métodos para tratar pacientes de cáncer basados en el estado de amplificación de ABCC3 de su cáncer- Dicho método puede comprender detectar si el gen ABCC3 se amplifica en una muestra de cáncer de ensayo de la paciente, administrando a la paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una quimioterapia basada en el fármaco antimetabólico si no se detecta la amplificación del gen ABCC3 en la muestra de cáncer de ensayo.

Otro de dichos métodos comprende detectar si el gen ABCC3 está expresado en exceso en una muestra de cáncer de ensayo de la paciente y administrar a la paciente una cantidad terapéuticamente de una quimioterapia basada en el fármaco antimetabólico si la expresión en exceso del gen ABCC3 no se detecta en la muestra de cáncer de ensayo. Posiblemente, la paciente tiene cáncer de mama positivo para HER2 y se administra un conjugado de anticuerpo anti-HER2-agente antimetabólico si no se detecta la expresión en exceso del gen ABCC3 en la muestra de cáncer de ensayo. En algunas hipótesis, el conjugado anticuerpo anti-Her2- agente antimetabólico es un conjugado de trastuzumab-DM I o trastuzumab MMAE.

Posiblemente, una paciente se selecciona para quimioterapia basada en fármaco antimetabólico en función de la ausencia de amplificación o expresión en exceso de ABCC3 en su cáncer y se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de quimioterapia basada en fármaco antimetabólico. Posiblemente, la paciente seleccionada tiene cáncer de mama positivo para HER2 y se administra un conjugado de anticuerpo anti-HER2-agente antimetabólico. En algunas hipótesis, el conjugado anticuerpo anti-Her2- agente antimetabólico es un conjugado de trastuzumab-DM I o trastuzumab MMAE.

También se describe en el presente documento un método para identificar las variaciones que están asociadas con la alteración de la sensibilidad a los fármacos. La mayoría de los esfuerzos de perfilado dirigidos a la comprensión de resistencia a los fármacos se ha centrado, hasta la fecha, en los análisis de expresión génica. La presente invención describe la identificación de las alteraciones de número de copias de ADN que se asocian con una alteración de la sensibilidad a los fármacos mediante análisis de perfiles de matrices SNP de alta densidad (Affymetrix). Estudios recientes han demostrado que la alta densidad de las matrices de polimorfismo de nucleótido único (SNP) además de su aplicación en el genotipado, puede usarse utilizado para detectar cambios en el número de copias de ADN del genoma y la pérdida de heterocigosidad en los cánceres humanos (17). Se ha demostrado que estas matrices pueden tener aplicaciones en la identificación de supresores tumorales y loci de oncogenes activando y desactivando de forma recurrente regiones cromosómicas suprimidas o amplificadas (18).

Los datos presentados en el presente documento muestran que las matrices pueden utilizarse para identificar regiones amplificadas que contienen los genes que pueden modular la actividad de fármacos terapéuticas. Una ventaja clave de este enfoque es que los eventos de amplificación génica son relativamente estables y en última instancia pueden someterse a ensayo en muestras de archivo procedentes de ensayos clínicos. Uno ensayo particularmente apropiado para detectar eventos de amplificación génica en muestras de archivo es la hibridación fluorescente in situ (FISH). Los ensayos son FISH ya parte de la rutina de la práctica clínica en el diagnóstico de MBC positivo para HER2 (50) y actualmente está siendo evaluada como prueba diagnóstica para detectar la

amplificación de EGFR como un posible marcador de respuesta a Tarceva o Erbitux (51).

5 La divulgación proporciona además métodos para determinar los niveles adecuados de la administración de un agente antimitótico para aquellas pacientes cuyos cánceres comprenden amplificación y/o expresión en exceso de ABCC3. En una realización, el método comprende determinar si ABCC3 está amplificado y/o expresado en exceso en una muestra de cáncer de ensayo de una paciente y administrar a la paciente una mayor dosis de agente antimitótico si ABCC3 está amplificado o expresado en exceso. La dosis agente antimitótico aumenta hasta una cantidad en la que el cáncer muestra una respuesta al tratamiento con un agente antimitótico. Opcionalmente, la dosis del agente antimitótico administrado al paciente es de al menos 1,2 veces, o, Como alternativa, al menos 1,3 veces, o al menos 1,5 veces, o, Como alternativa, al menos 2 veces, o, Como alternativa, al menos 2,5 veces o, Como alternativa, al menos 3 veces, o, Como alternativa, al menos 5 veces, o Como alternativa al menos 10 veces, la cantidad administrada a una paciente cuyo cáncer no comprenden amplificación y/o expresión en exceso de ABCC3.

15 La divulgación proporciona también métodos para reducir la resistencia de una célula cancerosa a un agente antimitótico que comprende poner en contacto la célula cancerosa con un antagonista de ABCC3. Posiblemente, el antagonista de ABCC3 sirve para prevenir la amplificación y/o expresión en exceso de ABCC3 y disminuye la resistencia a los fármacos conferida por la amplificación y/o expresión en exceso. Posiblemente, los antagonistas de ABCC3 sirven para inhibir la actividad ABCC3. Los antagonistas que son útiles en métodos incluyen anticuerpos anti-ABCC3, antagonistas de ABCC3 basados en ARN de interferencia (ARNi), especialmente ARN de sentido contrario, ARNm, ARNip, y ARNip, oligopéptidos de unión al polipéptido ABCC3, y moléculas orgánicas de unión al polipéptido ABCC3.

25 La divulgación proporciona también una terapia de combinación para el tratamiento de una paciente con un cáncer que es resistente a los agentes antimitóticos que comprende administrar a la paciente un antagonista de ABCC3 y un agente antimitótico. Opcionalmente el antagonista se seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo ABCC3 y un ARNip que se une a ABCC3. Opcionalmente, el agente antimitótico se selecciona del grupo que consiste en taxanos, maitasinoídes, y auristatinas, y análogos y derivatizados de los mismos.

30 Opcionalmente, el agente antimitótico está conjugado con un anticuerpo tal como un anticuerpo conjugado maitasinoide-anti-her2, por ejemplo, trastuzumab-DM1. En una realización, la terapia combinada comprende el tratamiento con un ARNip que se une a ABCC3 y a trastuzumab-dm1.

35 Dichas terapias combinadas mencionadas abarcan la administración combinada (cuando dos o más agentes terapéuticos están incluidos en la misma formulación o en formulaciones separadas), y la administración separada, en cuyo caso, la administración de un antagonista del ABCC3 puede ocurrir antes, simultáneamente, y/o tras la administración del agente antimitótico.

40 Opcionalmente, cuando dicho antagonista de ABCC3 es un anticuerpo contra el polipéptido ABCC. Los anticuerpos ilustrativos incluyen anticuerpos monoclonales, policlonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

45 Los anticuerpos policlonales preferentemente se activan en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (SC) o intraperitoneales (IP) del correspondiente antígeno y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno correspondiente (especialmente cuando se usan péptidos sintéticos) a una proteína que sea inmunogénico en la especie a inmunizar. Por ejemplo, el antígeno puede conjugarse con hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de la tripsina de la soja, utilizando un agente de derivación o bifuncional, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida éster (conjugación mediante restos de cisteína), n-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en la que R y R^1 son diferentes grupos alquilo. Los animales utilizados para crear los anticuerpos pueden ser animales transgénicos. Los animales pueden ser diseñados de tal manera que exhiban una completa ausencia de polinucleótido que codifica ABCC3, de forma que no tengan expresión de ABCC3 (referido como animales "desactivados genéticamente" animales). Los métodos para generar estos animales son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Snouwaert et al., Science 257:1083, 1992; Lowell et al., Nature 366:740-42, 1993; Capecchi, M. R., Science 244: 1288-1292, 1989. Suscitar anticuerpos contra un péptido o proteína animal particular en un animal genéticamente desactivado para dicho péptido o proteína puede ser ventajoso ya que no se producen reacciones autólogas en el animal que pueden reducir la producción y/o rendimiento de los anticuerpos como es bien conocido en la técnica.

50 Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunógenos, o derivados, combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y e inyectando la solución por vía intradérmica, en varios sitios. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con $\frac{1}{5}$ a $\frac{1}{10}$ de la cantidad original de péptido conjugado en adyuvante completo de Freund o mediante inyección subcutánea en varios sitios. De siete a 14 días más tarde, se extrae sangre de los animales y el suero se estudia para determinar el título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta la meseta del título. También se pueden preparar conjugados mediante cultivos de células recombinantes como proteínas de fusión. . Asimismo, la agregación de agentes tales como alúmina se utiliza adecuadamente para aumentar la respuesta

inmune.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o puede hacerse por métodos de ADN recombinante (patente de los Estados Unidos con N° 4816567).

Los anticuerpos anti-ABCC3 empleados también pueden incluir anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (como FV, FAB, Fab', F (AB')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígenos que contienen la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los restos de la región determinante complementaria (CDR) del receptor se sustituyen por los restos de un CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo que tenga la especificidad, la afinidad y la capacidad deseada. En algunos casos, los restos FV marco de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes restos. Los anticuerpos humanizados también pueden incluir restos que no aparecen ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado constará de sustancialmente todos de por lo menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante (FC) de inmunoglobulina, normalmente de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en el mismo de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo como restos de "importación", que son normalmente de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], sustituyendo la secuencias CDR o CDR de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de los Estados Unidos con N° 4816567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en que algunos restos CDR y posiblemente algunos restos FR son sustituidos por restos de sitios análogos de anticuerpos de roedores.

La elección de los dominios variables humanos, ligero y pesado, para su uso en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y respuesta HAMA (anticuerpo antimurino humano) cuando el anticuerpo se destina para uso terapéutico en seres humanos. De acuerdo al método denominado del "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la totalidad de la biblioteca de secuencias de dominio variable humano conocidas. Se identifica la secuencia del dominio V humano más cercano a la de los roedores y la región marco humana (FR) incluida en ella se acepta para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987)). Otro método utiliza una región marco particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesada. El mismo marco puede ser utilizado para diferentes anticuerpos humanizados (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993)).

Es más importante que los anticuerpos se humanicen con retención de anticuerpos de alta afinidad de unión para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este diana, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan por un proceso de análisis de las secuencias progenitoras y diversos productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias progenitoras y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y los expertos en la técnica están familiarizados con ellos. Están disponibles programas informáticos que ilustran y visualizan estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias candidatas de inmunoglobulina seleccionadas. La exploración de estas pantallas permite el análisis de la posible función de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos FR pueden seleccionarse y combinarse para el receptor e importar secuencias de modo que se obtenga el anticuerpo deseado característico, tales como una mayor afinidad por el antígeno diana. En general, los restos de la región hipervariable están directamente implicados y participan sustancialmente con su influencia sobre la unión al antígeno.

Se contemplan varias formas de anticuerpos humanizados contra el polipéptido ABCC3. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tales como FAB, que está opcionalmente conjugado con uno o más agentes citotóxicos para generar un inmunoconjugado. Como alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, como un anticuerpo IgG1 intacto.

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un completo repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión (J_H) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal da como resultado la completa inhibición de la producción de anticuerpos. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina humana de la línea germinal a dichos ratos mutantes de línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos contra los antígenos. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggeman et al. Year in Immuno. 7:33 (1993); patentes de los Estados Unidos con números 5545806, 5569825, 5591669 (todos de GenPharm); 5545807; y documento WO 97/16271.

Como alternativa, se puede usar la tecnología de expresión en fago (McCafferty et al., Nature 348:552-553 [1990]) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios génicos de dominios variables (V) de inmunoglobulina procedente de donantes no vacunados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en un gen mayor o menor de la proteína de revestimiento de un fago filamentoso, como M13 o fd, y se expresan como fragmentos funcionales de anticuerpos en la superficie de la partícula de fago. Como las partículas filamentosas contienen una copia del ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales de los anticuerpos también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo exhibiendo esas propiedades. Así, el fago imita algunas de las propiedades de los linfocitos B. La expresión en fago puede realizarse en varios formatos, revisados en, por ejemplo, Johnson, Kevin s y Chiswell, David J., Current opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos del gen V para la expresión en fagos. Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) aisló una gama diversa de anticuerpos contra la oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados del bazo de ratones inmunizados. Se puede construir una gama de genes V de los donantes sin vacunar y se pueden aislar anticuerpos para una amplia variedad de antígenos (autoantígenos) fundamentalmente siguiendo las técnicas descritas por Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), o Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). Véanse, también, las patentes de los Estados Unidos con números 5565332 y 5573905.

Como se mencionó anteriormente, los anticuerpos humanos también pueden generarse *in vitro* mediante linfocitos B activados (véanse las patentes de los Estados Unidos con números 5567610 y 5229275).

En determinadas circunstancias, hay ventajas de utilizar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite aclaramiento rápido y puede conducir a un acceso mejorado a los tumores sólidos.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtienen mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical methods 24:107-117 (1992); y Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse directamente por células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo FAB, Fv y scFv pueden expresarse y secretarse en *E. Coli*, permitiendo la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las bibliotecas de anticuerpos expresados en fagos citadas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. Coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos $F(AB')_2$ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos $F(AB')_2$ pueden aislarse directamente de la célula hospedadora recombinante cultivada. El fragmento Fab y $F(AB')_2$ con mayor semivida *in vivo* que comprende un epítipo de unión al receptor de salvamento se describen en la patente de los Estados Unidos con N° 5869046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el profesional especializado. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la patente de los Estados Unidos con N° 5571894; y la patente de los Estados Unidos con N° 5587458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; por lo tanto, son adecuados para la unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión sFv para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o el extremo carboxi de un sFv. Véase Antibody Engineering, Ed. Borrebaeck, supra. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos con N° 5641870 por ejemplo. Estos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o bispecíficos.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, a fin de aumentar la citotoxicidad dependiente de antígeno mediada por células (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, los resto(s) cisteína se puede(n) introducir en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener capacidad de internalización mejorada y/o aumentada mediada por el complemento para destruir matar células y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Véase Caron et al., J. Exp. Med 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral también se pueden preparar utilizando reticuladores heterobifuncionales tal como se describe en Wolff et al., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa,

un que tiene regiones Fc duales anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética y de ese modo puede tener capacidades de lisis potenciadas por el complemento y ADCC mejoradas. Véase Stevenson et al., *AntiCancer Drug Design* 3: 219-230 (1989). Para aumentar la vida media en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor silvestre en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la

5 patente de los Estados Unidos con N° 5.739.277, por ejemplo. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "epítipo de unión al receptor silvestre" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG 1, IgG 2, IgG 3, o IgG 4) que es responsable del aumento de la semivida *in vivo* en suero de la molécula de IgG.

10 Otro antagonista potencial de ABCC3 es un ARN o construcción de ADN de sentido contrario preparado utilizando la tecnología de sentido contrario, en la que, por ejemplo, un ARN o molécula de ADN de sentido contrario actúa para bloquear directamente la traducción de ARNm mediante la hibridación del ARNm diana y evitando la traducción de proteínas. La tecnología de sentido contrario se puede utilizar para controlar la expresión génica a través de formación de triple hélice o ADN o ARN de sentido contrario, métodos ambos basados en la unión de

15 polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, la parte codificante 5' de la secuencia de polinucleótidos, que codifica el polipéptido maduro ABCC3 en el presente documento, se puede utilizar para diseñar un oligonucleótido de ARN de sentido contrario de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Un oligonucleótido de ADN se diseña para ser complementario de una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice - véase Lee et al., *Nucl Acids Res.*, 6: 3073 (1979); Cooney et al., *Science*, 241: 456 (1988); Dervan et al., *Science*, 251: 1360 (1991)), evitando así la transcripción y la producción del polipéptido ABCC3. El oligonucleótido de ARN de sentido contrario hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm al polipéptido ABCC3 (de sentido contrario - Okano, *Neurochem.*, 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, Fla., 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también pueden suministrarse a las células de forma el ARN o ADN de sentido contrario se pueden expresar *in vivo* para inhibir la producción del

20 polipéptido ABCC3. Cuando se utiliza ADN de sentido contrario, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de iniciación de traducción, por ejemplo, entre aproximadamente -10 y +10 posiciones de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

Los ARN interferente pequeños (siRNA) son moléculas de ARN bicatenarias en general con menos de 30 nucleótidos de longitud que reducen la expresión de un gen diana. Los siRNA han mostrado ser útiles como herramienta en estudios de modulación de la expresión génica en los que han fracasado antagonistas tradicionales, tales como moléculas pequeñas o anticuerpos. (Shi Y., *Trends in Genetics* 19 (1): 9-12 (2003)). Sintetizados *in vitro*, los ARN bicatenarios que tienen de 21 a 23 nucleótidos de longitud pueden actuar como ARN de interferencia (ARNi) y pueden inhibir específicamente la expresión génica (Fire A., *Trends in Genetics* 391, 806-810 (1999)).

30 Estos ARNi actúan mediano en la degradación de sus ARN diana. Puesto que tienen menos de 30 nucleótidos de longitud, no desencadenan un mecanismo de defensa antiviral celular. En algunas realizaciones de la invención, el ARNi tiene al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia del ácido nucleico con una porción de la secuencia codificadora del polinucleótido que codifica ABCC3 o su complemento.

40 Los oligopéptidos de unión a los polipéptidos ABCC3 de la invención son oligopéptidos que se unen, preferiblemente específicamente, a un polipéptido ABCC3 como se describe en el presente documento. Los oligopéptidos de unión a polipéptidos ABCC3 se pueden sintetizar químicamente usando metodologías de síntesis de oligopéptidos conocidas o pueden prepararse y purificarse usando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión de polipéptidos ABCC3 tienen habitualmente al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, Como alternativa por lo menos aproximadamente 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 de longitud o más, en el que dichos oligopéptidos pueden unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido ABCC3 como se describe en el presente documento. Los oligopéptidos de unión a polipéptidos ABCC3 pueden identificarse sin experimentación innecesaria usando técnicas bien conocidas. En este sentido, se observa que las técnicas para cribar bibliotecas de oligopéptidos para obtener oligopéptidos que puedan unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos con números 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; Publicación PCT N° WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 81: 3998 a 4002 (1984); Geysen et al., *Proc. Natl Acad Sci EE.UU.*, 82: 178-182 (1985); Geysen et al., en *Synthetic Peptides as Antigens*, 130-149 (1986); Geysen et al., *J. Immunol Meth.*, 102: 259-274 (1987); Schoofs et al., *J. Immunol.*, 140: 611-616 (1988), Cwirla, SE et al (1990). *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 87: 6378; Lowman, HB et al (1991). *Biochemistry*, 30: 10832; Clackson, T. et al (1991). *Nature*, 352: 624; Marks, JD et al (1991)., *J. Mol Biol.*, 222: 581; Kang, AS et al (1991). *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 88: 8363, y Smith, GP (1991) *Current Opin Biotechnol.*, 2: 668).

En este sentido, la expresión en bacteriófago (fago) es una técnica bien conocida que permite cribar grandes bibliotecas de oligopéptidos para identificar miembro(s) de aquellas bibliotecas que pueden unirse específicamente a un polipéptido diana. La expresión en fagos es una técnica mediante la cual se expresan polipéptidos variantes como proteínas de fusión a la proteína de la cubierta en la superficie de partículas de bacteriófagos (Scott, JK y

Smith, GP (1990) Science, 249: 386). La utilidad de la presentación en fagos radica en el hecho de que grandes bibliotecas de variantes de proteínas selectivamente aleatorizadas (o ADNc clonado al azar) se pueden clasificar rápida y eficientemente para aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con alta afinidad. La expresión de bibliotecas de péptidos (Cwirla, SE et al (1990). Proc Natl Acad Sci EE.UU., 87: 6378) o proteínas (Lowman, HB et al (1991); Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al., (1991) Nature, 352: 624; Marks, JD et al (1991)., J. Mol Biol., 222: 581; Kang, AS et al (1991). Proc Natl Acad Sci USA, 88: 8363) en fagos se ha utilizado para el cribado de millones de polipéptidos u oligopéptidos para determinar lo que tienen propiedades de unión específicas (Smith, GP (1991) Current Opin Biotechnol., 2: 668). La clasificación de bibliotecas de fagos de mutantes aleatorios requiere una estrategia para construir y propagar un gran número de variantes, un procedimiento para la purificación por afinidad utilizando el receptor diana, y un medio de evaluación de los resultados de enriquecimientos de unión. Patentes de Estados Unidos números 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, y 5.663.143.

Los métodos para generar bibliotecas de péptidos y el cribado de estas bibliotecas también se describen en las patentes de los Estados Unidos con números 5.723.286, 5.432.018, 5.580.717, 5.427.908, 5.498.530, 5.770.434, 5.734.018, 5.698.426, 5.763.192, y 5.723.323.

Las moléculas pequeñas de unión al polipéptido ABCC3 son preferiblemente moléculas orgánicas distintas de oligopéptidos o anticuerpos tal como se define en el presente documento que se unen, preferiblemente específicamente, a un polipéptido ABCC3 como se describe en el presente documento. Las moléculas orgánicas pequeñas de unión al polipéptido ABCC3 se pueden identificar y sintetizar químicamente utilizando metodología conocida (véase, por ejemplo, Publicación PCT números WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas pequeñas de unión al polipéptido ABCC3 tienen por lo general menos de aproximadamente 2000 daltons de tamaño, Como alternativa menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 o 200 daltons de tamaño, en los que dichas moléculas orgánicas pequeñas pueden unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido ABCC3 como se describe en este documento pueden identificarse sin experimentación excesiva usando técnicas bien conocidas. En este sentido, cabe señalar que las técnicas para cribar bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas para determinar moléculas que pueden unirse a un polipéptido diana son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Publicación PCT números WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas pequeñas de unión al polipéptido ABCC3 pueden ser, por ejemplo, aldehídos, cetonas, oximas, hidrazonas, semicarbazonas, carbazidas, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, hidrazinas N-sustituidas, hidrazidas, alcoholes, éteres, tioles, tioéteres, disulfuros, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, ureas, carbamatos, carbonatos, cetales, tiocetales, acetales, tioacetales, haluros de arilo, sulfonatos de arilo, haluros de alquilo, sulfonatos de alquilo, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, anilinas, alquenos, alquinos, dioles, amino alcoholes, oxazolidinas, oxazolininas, tiazolidinas, tiazolininas, enaminas, sulfonamidas, epóxidos, aziridinas, isocianatos, cloruros de sulfonilo, compuestos diazo, cloruros de ácido, o similares.

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

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

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente de interés, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato), o poli (alcohol vinílico)), polilactidas (patente de los Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-L-

glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli-D (-)-ácido 3-hidroxitúterico. Mientras que los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogel liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los agentes encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37° C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y, para los anticuerpos, posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden establecer estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación implicado es la formación de un enlace intermolecular S-S a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los restos sulfhidrilo, liofilizando las soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y el desarrollo de composiciones específicas para la matriz polimérica.

Agentes antimetabólicos

Un agente antimetabólico es cualquier compuesto que inhibe, evita, o de otro modo interrumpe la mitosis. Los ejemplos específicos de agentes antimetabólicos incluyen, pero no se limitan a, taxanos, tales como paclitaxel y docetaxel; maitansinoides, incluyendo 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 y DM1 y DM4; dolastatina 10, dolastatina 15 y auristatinas, como auristatina monometil E (MMAE) y auristatina monometil F (MMAF); alcaloides de la vinca, tales como vinblastina y vincristina; y análogos y derivados de los mismos.

Los taxanos son fármacos anticancerígenos derivados del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos mediante la prevención de la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.

Los maitansinoides son agentes de unión a tubulina que son antimetabólicos potentes, haciendo que las células se detengan en la fase G2/M del ciclo celular y en última instancia, conducen a la muerte celular. Los maitansinoides son derivados del maitansina, un compuesto aislado por primera vez del arbusto de África oriental Maytenus serrata (patente de los Estados Unidos N° 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol (patente de los Estados Unidos N° 4.151.042). Se han notificado tanto maitansinol sintético como análogos de maitansinol. Véanse las patentes de los Estados Unidos con números 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, y Kawai et al (1984) Chem. Pharm. Bull. 3441 a 3451).

Las auristatinas son análogos de dolastatina 10 (un producto pentapéptido natural), incluyendo auristatina monometil E (MMAE) y auristatina monometil F (MMAF). Las moléculas de esta familia inhiben la polimerización de tubulina. En general, las actividades son 100-1.000 veces más potente que la doxorubicina. (Pettit, GR, The dolastatins. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 70, 1-79, 1997).

El agente antimetabólico está opcionalmente conjugado a un anticuerpo.

Hay muchos grupos enlazadores conocidos en la técnica para fabricar conjugados anticuerpo-agente. Los conjugados anticuerpo-maitansinoide han sido ampliamente descritos en la bibliografía. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N° 5.208.020 o el documento EP 0 425 235 B1, y Chari et al, Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos enlazadores útiles para preparar conjugados anticuerpo-agente incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles de peptidasa o grupos lábiles de esterasa, como se describe en las patentes citadas anteriormente, siendo preferidos disulfuro y grupos tioéter.

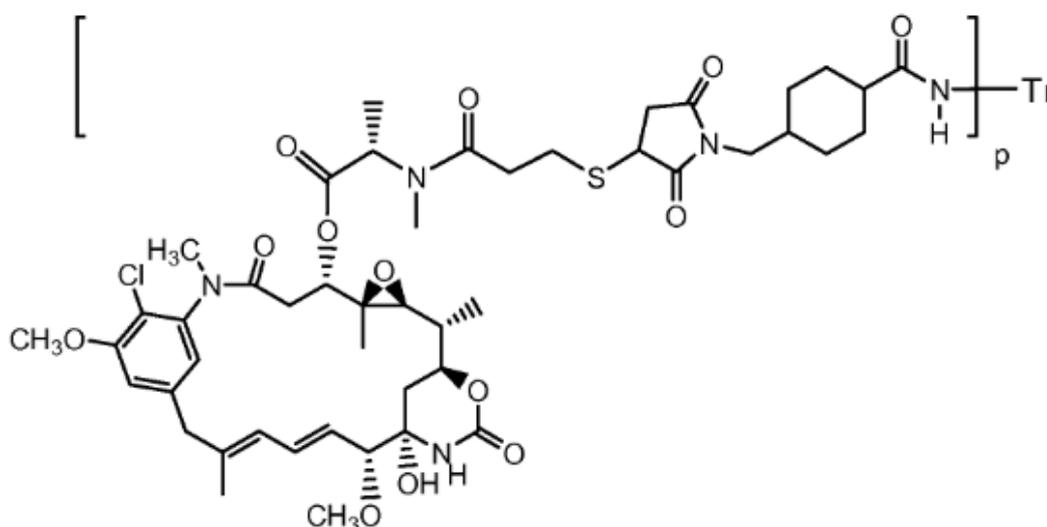
Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide, u otro agente antimetabólico, se pueden fabricar utilizando varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como clorhidrato de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil) etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP) (Carlsson et al, Biochem J. 173: 723-737 [1978]) y pentanoato de N-succinimidil-4-(2-piridilditio) (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El enlazador puede estar unido a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace éster puede formarse por reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20

tiene un grupo hidroxilo. En una realización, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

Los ejemplos de conjugados antimetabólico-anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, trastuzumab-DM1 (Genentech/ImmunoGen, que se describe en la patente de los Estados Unidos con N° 7.097.840, incorporada por referencia en su totalidad en el presente documento), Trastuzumab-auristatina (Genentech/Seattle Genetics), Cantuzumab mertansina (huC242-DM1, SB-408075) (ImmunoGen), BB-10901 (huN901-DM1) (ImmunoGen), MLN2704 (DM1) (Millennium Pharmaceuticals), Bivatuzumab mertansina (DM1) (Boehringer Ingelheim), huMy9-6-DM4 (AVE9633) (Sanofi-aventisc), huC242-DM4 (ImmunoGen), SGN-35 (Monometil auristatina) (Seattle Genetics), SGN-75 (Monometil auristatina) (Seattle Genetics) y CR011-vcMMAE (CuraGen/Seattle Genetics). Lambert, JM, et al, Current Opinion in Pharmacology, 5: 543-549 (2005). Véanse también los documentos US20050276812, WO2004110498, Wul, AM, y Senter, PD, Nature Biotech 23: 1137-1146 (2005).

Trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1) (N° Reg CAS 139504-50-0) tiene la estructura:



en la que Tr es trastuzumab, unido a través de resto enlazador MCC, al resto de fármaco maitansinoide, DM1 (Patente de los Estados Unidos N° 5.208.020; Patente de Estados Unidos N° 6.441.163). La relación de fármaco a anticuerpo o la carga de fármaco están representada por p en la estructura anterior de trastuzumab-MCC-DM1, y está comprendida en un intervalo de valores enteros de 1 a aproximadamente 8. El valor de la carga de fármaco p es de 1 a 8. Trastuzumab-MCC-DM1 incluye todas las mezclas de conjugados de anticuerpo-fármaco de diferentes cargas y uniones en los que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 restos de fármaco se unen covalentemente al anticuerpo trastuzumab (patente de los Estados Unidos N° 7.097.840; documento US 2005/0276812; documento US 2005/0166993). Trastuzumab es un anticuerpo que tiene restos de unión a antígeno, o deriva de, el anticuerpo 4D5 murino (ATCC CRL 10463, depositado en American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852 bajo el Tratado de Budapest, 24 de mayo de 1990). Los anticuerpos 4D5 humanizados ilustrativos incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) como en el documento US 5.821.337.

Trastuzumab-DM1 (o T-DM1) ha demostrado ser eficaz en modelos sensibles a trastuzumab e insensibles a trastuzumab de cáncer con expresión en exceso de HER2. Están en curso estudios clínicos para evaluar la seguridad y eficacia de T-DM1 en pacientes con cáncer de mama con expresión en exceso de HER2.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Técnicas y ensayos

Líneas celulares y experimentos de viabilidad

Líneas celulares de cáncer de mama AU565, BT-474, BT-549, CAMA-1, DU4475, HCC1143, HCC1419, HCC1428, HCC2218, HCC70, Hs578T, KPL-1, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435S, MDA-MB-436, MDA-MB-453, MDA-MB-468, T-47D, UACC-812, ZR-75-1 y ZR-75-30 se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Va.). Las líneas celulares CAL-120, CAL-148, CAL-148, CAL-51, CAL-85-1, EFM-19, EFM-192A, EVSA-T, y MT-3 se obtuvieron de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Todas las líneas celulares se mantuvieron en RPMI 1640 o DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino

(Sigma, St. Louis, Mo.), aminoácidos no esenciales y 2 mmol/l de L-glutamina. Aunque indicado como línea de mama, MDA-MB-4355 puede ser en realidad de origen melanómico y MT-3 de origen colorrectal según criterios moleculares y genéticos (19, 20). Estos hallazgos no afectan las conclusiones de este estudio.

5 Para la determinación de la CI50 de MMAE y paclitaxel, las células se sembraron por cuadruplicado a una densidad de 3000 células por pocillo en placas de 384 pocillos en medio de crecimiento normal y se dejaron adherir durante la noche. Se añadieron paclitaxel (Sigma) o MMAE (Seattle Genetics, Seattle, Wash.) en concentraciones de 10 basado en una serie de diluciones de tres veces (1 $\mu\text{mol/l}$ de paclitaxel máxima o 0,1 $\mu\text{mol/l}$ máxima para MMAE).

10 La viabilidad celular se midió 72 horas más tarde usando el ensayo de viabilidad celular Celltiter-Glo luminiscente (Promega, Madison, Wis.). La concentración de fármaco que da como resultado la inhibición del 50 % de la viabilidad celular (CI50) se calculó a partir de un análisis de la curva de cuatro parámetros (programa informático XLfit, IDBS) y se determinó a partir de un mínimo de tres experimentos. Se consideró que las líneas celulares que no mostraron una reducción del 50 % en la viabilidad celular en respuesta al tratamiento farmacológico en la mayoría de los experimentos realizados no llegaron a un CI50 por definición y se indican con una CI50 > 100 nm (MMAE) o > 1000 nM (paclitaxel). La Fig. 6 proporciona ejemplos de experimentos de viabilidad celular representativos de seis líneas celulares. Las líneas celulares EFM192A, NDAMB361 y BT474 se clasificaron como resistentes a todos los agentes en el análisis bioinformático. AU565, EFM19 y MDAMB468 se clasificaron como sensibles. Los valores de CI50 de las curvas ajustadas se muestran en las tablas a la derecha de cada gráfica.

20 Para los clones de la línea celular EVSA-T que expresan en exceso ABCC3 que no lograron la CI50, se calculó la concentración media máxima efectiva o CE50, en el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc). La línea celular de control en la figura 5 es, de hecho, un clon de EVSA-T derivado después de la transfección con un vector vacío y en el experimento particular mostrado logró una CI50.

25

Muestras de tumor de mama

30 Tumores de mama primarios de 145 pacientes con cáncer de mama independientes se utilizaron para preparar el ADN genómico para el análisis CGH con la matriz Agilent (21). Todos los tumores se congelaron mientras estaban frescos y se encontró que tenían más de 70 % de contenido de tumor, y todos se clasificaron como carcinoma ductal infiltrante. Se realizaron estudios FISH para ABCC3 en 61 muestras de tumores de mama primarios independientes adicionales del banco de tumores Genentech.

Estudios de la expresión génica en micromatriz

35

40 La expresión de genes de líneas celulares de cáncer de mama se llevó a cabo en ARN extraído de cultivos de células sub-confluentes usando kits Qiagen RNeasy. La calidad del ARN se verificó mediante análisis de las muestras en un Agilent Bioanalyzer 2100 y las muestras de suficiente calidad se perfilaron con chips Affymetrix HGU133Plus_2.0 (Santa Clara, California). La preparación del ARN complementario, hibridaciones de matriz, la exploración y el posterior análisis de datos de la matriz imagen se realizaron usando el protocolo especificado por el fabricante.

45 Para el análisis de agrupamiento jerárquico global no supervisado de las líneas celulares de cáncer de mama, se filtraron los datos de la expresión génica para eliminar los conjuntos de sonda que mostraron poca variación entre las líneas celulares. En resumen, las sondas que no mostraron al menos una variación de cinco veces a través de las muestras ($\text{max/min} > 10$) y una diferencia de intensidad absoluta de por lo menos 250 ($\text{max-min} > 250$) se excluyeron del análisis de agrupamiento jerárquico. El pre-procesamiento de datos implicó transformaciones logarítmicas y el centrado de los valores de la mediana de la expresión génica, después de lo cual se realizó la agrupación promedio de unión usando el media vinculación agrupación utilizando programa informático Cluster y TreeView (22).

50

Estudios de número de copias con Matriz SNP y Agilent aCGH

55 El análisis del número de copias de las líneas celulares se llevó a cabo sobre el ADN genómico extraído de cultivos celulares sub-confluentes usando kits Qiagen DNAeasy. Para cada línea celular se hibridaron 500 ng de ADN genómico en matrices cartográficas GeneChip 100K (Affymetrix, Inc., Santa Clara, California) según las instrucciones del fabricante. Estas matrices contienen conjuntos de sonda en más de 116.000 loci SNP derivados de todos los cromosomas humanos (excepto el cromosoma Y), con una distancia media al marcador de 26 kb (23). La activación de SNP y la cuantificación de la señal se obtuvieron el sistema operativo Gene Chip. Las micromatrices Agilent Genoma Humano 244A CGH y el programa informático de extracción de características Agilent se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el análisis del número de copias de ADN con alisado genético (GSA_CN) se calculó basándose en la intensidad de hibridación (la suma de las intensidades de ambos alelos) para cada sonda de SNP con la herramienta de análisis del número de copias Affymetrix Chromosome I 3.0 (CNAT 3.0). Los datos de número de copias fueron segmentados con el algoritmo de segmentación Glad (24).

65

Las asociaciones entre el número de copias GSA_CN y la sensibilidad del fármaco se identificaron con el programa

informático Matlab (The MathWorks, Inc. Natick, Mass., EE.UU.) utilizando una versión del procedimiento maxT (26). Para cada fármaco, se calculó una estadística de prueba para cada SNP que refleja la diferencia entre el número de copias después de la transformación logarítmica en líneas celulares sensibles y resistentes. La estadística se calculó como el valor absoluto de un valor estadístico t estándar (dos muestras, varianza desigual), excepto que se puso a
 5 cero para los SNP con diferencia inferior a 1,75 veces la media del número de copias entre las clases sensibles y resistentes. A continuación se estimó que la distribución nula de la máxima estadística de ensayo para todos los SNP era 10.000 permutaciones aleatorias de las etiquetas de sensibilidad. Se calculó el valor p para cada SNP como la fracción de permutaciones para el que el valor estadístico de la prueba máxima fuera mayor o igual a la estadística observada para el SNP. Los valores p valores resultantes controlan la tasa de error por familiarización y
 10 tiene en cuenta el número de SNP analizados.

Determinación del número de copias HER2 mediante RT PCR cuantitativa

Se realizó la PCR cuantitativa utilizando el sistema de detección de secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) En el ADN genómico preparado como se describe anteriormente. Se realizó la QRT-PCR usando cebadores CACTGTCTGCACCTTGCTTTG (SEC ID N°: 1) y GCTCTGCAGCTATTGAAAGAACAA (SEC ID N°: 2) para Her 2 y AAAGCCGCTCAACTACATGG (SEC ID N°: 3) y TGCTTTGAATGCGTCCCAGAG (SEC ID N°: 4) para los elementos repetitivos Line-1. Line-1 es un elemento repetitivo con números de copias similares por genoma haploide entre las células normales y neoplásicas humanas (27). La cuantificación se basó en las curvas de calibración a partir de una dilución en serie de ADN genómico humano normal. El nivel relativo del número de copias diana también se normalizó según el ADN genómico humano normal como calibrador. El cambio en el número de copias de genes diana en relación con Line-1 y el calibrador se determinaron utilizando la fórmula $E^{-[(C_{Ptarget} - C_{pref})_{control} - (C_{Ptarget} - C_{pref})_{test}]}$ como se describe en Kindich et al (28). Las condiciones para la reacción de PCR cuantitativa fueron las descritas en folleto del Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG w/ROX (número de catálogo 11744-500).
 15
 20
 25

Análisis por hibridación fluorescente in situ (FISH)

Sondas

Un cromosoma bacteriano artificial (BAC) contiguo que comprende de 2 clones superpuestos, CTD-2605A1 y CTD-3006C13, que cubren todo el loci ABCC3 y zonas adyacentes (basado en el conjunto USCS Genome Browser March 2006) se utilizaron como sonda para los experimentos FISH. También se utilizaron en los experimentos FISH sondas comercialmente disponibles para HER2/CEP17 (PathVysion, Vysis/Abbott Laboratories, Des Plaines, Illinois.) y CEP17 (Vysis/Abbott Laboratories, Des Plaines, Illinois).
 30
 35

Análisis FISH

Se prepararon líneas celulares para el análisis citogenético mediante incubación con 0,1 µg/ml de Colcemid (Invitrogen) durante 2-3 h, seguido de hinchazón osmótica en KCl (0,075 M) y fijación en metanol: ácido acético (3:1), como se ha descrito previamente (29). El ADN de los clones BAC se extrajo por métodos convencionales.
 40

El ADN de BAC extraído fue etiquetado directamente con Spectrum Orange, Spectrum Verde, (Vysis/Abbott Laboratories, Des Plaines, Illinois) o dietilaminocumarina (DEAC) (Invitrogen) según la traducción de nick utilizando el Kit Vysis Nick Translation (Vysis/Abbott Laboratories) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El FISH para metafases humanas normales (Abbott Laboratories, Des Plaines, Ill) confirmó la localización genómica de los clones BAC. Aproximadamente 300 ng de sondas marcadas se precipitaron en un exceso de ADN humano Cot-1 (Invitrogen) y ADN de esperma de salmón sonicado (Sigma) y se resuspendió en formamida al 50 %, sulfato de dextrano al 10 %, y tampón de hibridación 2'SSC (Vysis/Abbott Laboratories, Des Plaines, Illinois) para los experimentos FISH. Se llevó a cabo el ensayo FISH en preparaciones citogenéticas y tejido incluido en formalina fijada con parafina (FFPE) como se ha descrito previamente (Pandita et al., 2004), con algunas modificaciones. Después de una incubación durante la noche a 56° -60° C, los portaobjetos se desparafinaron mediante 3 lavados con 5 min de CitroSolv para cada uno, seguido de dos lavados en alcohol. Después de secado al aire, los portaobjetos se incubaron en una solución NaSCN 1 M durante 30 min a 80° C y luego se trataron con pepsina antes de lavados adicionalmente en agua y una serie de etanol. Tras secado al aire, los portas se desnaturalizaron (76° C durante 6 min) simultáneamente con son la sonda y se hibridó durante la noche a 37° C (ThermoBrite; Vysis, Downers Grove, Illinois). Los lavados post-hibridación y la contratinación se realizaron de una manera similar a lo descrito anteriormente. Los portaobjetos se exploraron utilizando un microscopio Olympus BX61 y analizados mediante el programa informático FISHView (Applied Imaging espectral, Vista Calif.). El análisis del número de copias y la proporción de HER2/ABCC3 a CEP17 se calculó según las instrucciones del fabricante.
 45
 50
 55
 60

Experimentos de validación funcional

Los ensayos de selección de alto contenido se llevaron a cabo en una VTI ArrayScan (Cellomics Inc, Pittsburgh, Pa.). Las células fueron transfectadas en formato de 96 pocillos usando oligonucleótidos siRNA "SmartPool" comprados a Dharmacon Inc y el reactivo de transfección oligofectamina. Para priorizar los genes en los estudios
 65

funcionales, se realizó una prueba de la suma de rangos bilateral Wilcoxon utilizando el lenguaje de programación R (<http://www.r-project.org>) para identificar genes con una diferencia significativa en la expresión génica en líneas celulares con más de 4 copias en comparación con los que tienen menos de 4 copias del amplicón 17q21.3. Un ejemplo de la expresión diferencial de genes que surgió de este análisis, ABCC3 ($p = 0,0053$) se muestra en la figura 3. Este análisis, combinado con la disponibilidad de reactivos para experimentos con ARNi, condujo a la selección de los 24 genes siguientes para estudios funcionales en la línea celular EFM-192A: ABCC3, COL1A1, CROP, EAP, EPN3, FLJ13855, FLJ20920, HOXB7, LOC201191, ITGB3, KIAA0924, KPNB1, LOC400604, LOC81558, MGC11242, MGC15396, NDP52, PDK2, PHB, PP1R9B, SLC35B1, SPOP, TOB1, Wnt3. Se llevaron a cabo estudios de seguimiento con ARNi de ABCC3 en las líneas celulares adicionales ZR75-30, MDAMB-453 y HCC-1428. Un ARNi control no dirigido (NTC) que no muestra homología significativa con ninguna secuencia del genoma humano se utilizó como control negativo en todos los experimentos de ARNi (como se describe en las notas técnicas de www.dharmacon.com). Después de 48 horas o 72 horas de incubación a 37° C, las células se fijaron en formaldehído al 3,7 % y se permeabilizaron en Triton X-100 al 0,1 %, seguido por etiquetado con una dilución 1: 500 de anti-fosfohistona H3 (pH 3, Upstate) y posterior 1: 250 dilución de Alexa-Fluor 488 (Molecular Probes) de anticuerpo secundario de cabra dirigido contra IgG de conejo. Las células se contratiñeron con Hoechst-33258 para permitir la identificación de los núcleos y determinar el porcentaje de células positivas para inmunofluorescencia nuclear pH 3, también conocida como índice mitótico (30), a continuación, se cuantificaron por lo menos 1000 células por pocillo usando el programa informático Cellomics Activación Target. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces. Se realizó la QRT-PCR (cebador 5' GATTCCAGCCGCTTCAGTT (SEC ID N°: 5), 3' CCTGGCTGTGCTCTACACCT (SEC ID N°: 6) en un equipo ABI 7900 para confirmar que el ARNi combinado daba como resultado un 90 % de inactivación en ABCC3 respecto a un ARNi control.

Para los experimentos de expresión en exceso de ABCC3, un ADNc de longitud completa de ABCC3 se clonó en el promotor CMV que contiene el vector pCMV5 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.). Se verificó por secuenciación de la secuencia codificante completa. La construcción se transfirió en células EVSA-T y los clones estables se seleccionaron por crecimiento en 1 mg/ml de geneticina (Invitrogen Carlsbad, Calif.). La expresión en exceso de ABCC3 en clones estables fue confirmada por QRT-PCR en ADNc derivado de líneas que contienen pCMV5-ABCC3, vector pCMV5 solo, o en la cepa progenitora EVSA-T. Todas las líneas celulares estables que se describen en este informe se determinaron en experimentos QRT-PCR para expresar al menos 25-35X más transcripción de ABCC3 que las líneas de vectores control o la línea celular progenitora.

Ejemplo 2 - Caracterización molecular de líneas celulares

Se realizaron los perfiles de expresión génica Affymetrix en ADNc preparado a partir de ARNm total de 100K y la matriz de perfiles Affymetrix SNP se realizó en ADN de 44 líneas celulares de cáncer de mama. Se utilizó el análisis no supervisado con los 11.000 genes expresados más diferencialmente a través del panel de líneas celulares para clasificar las líneas celulares en luminales y basales como subtipos en función de expresión génica (Fig. 11). Las líneas celulares clasificadas como luminales expresan altos niveles del receptor de estrógeno alfa (ER) y muchos de los genes diana regulados por ER, incluyendo GATA3, HNF3A, IGF1R y XBP1. Las líneas celulares clasificadas como de tipo basal expresaron altos niveles de todo o parte de los bien descritos marcadores basales vimentina, caveolina, MFGE8 y citoqueratinas basales como KRT5 (31). Debido a que la amplificación del oncogén HER2 define claramente un subtipo de la enfermedad diferenciado que no se deduce de la clasificación general de la expresión génica en líneas celulares (14), el número de copias de HER2 se determinó mediante QRT-PCR para el ADN genómico y la normalización para los elementos repetitivos Line-1 en todas las líneas celulares (Fig. 11). Las líneas celulares que muestran en estos análisis un número de copias aparente mayor de cuatro se indican como amplificadas por HER2 en la tabla mostrada en la figura 11. El subtipo molecular compuesto de la Fig. 11 es una clasificación derivada tanto de los resultados globales de expresión génica como del análisis de número de copias de HER2. Estos resultados concuerdan con los informes anteriores (14) y sugieren que esta colección de líneas celulares de cáncer de mama refleja hasta cierto punto las principales distinciones de la transcripción que definen los subtipos de cáncer de mama y en cierta medida son representativos de subtipos modelos de tumores luminales, de tipo basal, y amplificado por HER2. Los amplios patrones del aumento y disminución del número de copias en el genoma del panel de líneas celulares muestran que las líneas celulares de cáncer de mama albergan la mayor parte de las principales alteraciones número de copias (por ejemplo, MYC, CCND1, HER2 ganancia y p16, pérdida de PTEN) que se han descrito en los tumores. Se han descrito diferencias específicas del subtipo (32). Un hallazgo relevante de este estudio es que la amplificación en 17q21.3 es común en las líneas celulares amplificadas por HER2 y líneas celulares luminales, pero no en líneas celulares de tipo basal.

Ejemplo 3 - Sensibilidad in vitro a fármacos antimitóticos

31 líneas celulares de cáncer de mama fueron seleccionadas para determinar la sensibilidad in vitro a paclitaxel y MMAE. La Fig. 11 muestra el valor de CI50 para cada compuesto, que se define como la concentración requerida para inhibir el 50 % de la viabilidad celular en un ensayo de viabilidad estándar con luciferina para todas las líneas celulares. Cabe destacar que no hubo correlación significativa entre la sensibilidad relativa a cada agente a través del panel de líneas celulares (coeficiente de orden de rango de correlación de Spearman, $r_s = 0,55$). Además, la Fig. 1 muestra que las líneas celulares con la firma de la expresión génica de tipo basal tenían valores de CI50 promedio más bajos y eran más sensibles a los agentes que las líneas celulares luminales o amplificadas mediante HER2

amplificado según lo determinado según la prueba de la suma del rango de Kruskal-Wallis (valor P = 0,002 para MMAE, valor P = 0,005 para paclitaxel).

Ejemplo 4 - Identificación de las alteraciones genómicas que se correlacionan con la sensibilidad in vitro

5 Las regiones de ganancia o pérdida cromosómica que se correlacionaron con la sensibilidad al paclitaxel o MMAE se identificaron a través del análisis supervisado de los datos de número de copia con la matriz SNP. En primer lugar, las líneas celulares se clasificaron en cualquiera de los grupos sensibles (CI50 <10 nM) o resistentes (MMAE CI50 > 100 nM, paclitaxel CI50 > 1.000 nM) en función de los datos de sensibilidad. A continuación se utilizó el algoritmo maxT (26) para analizar los datos de aproximadamente 115.000 SNP y se identificaron SNP individuales en los que el número medio de copia difería entre las clases sensibles y resistentes con la significación de todo el genoma. En el caso de paclitaxel, un grupo de SNP del cromosoma 17 que se inicia en la posición cromosómica 44303217 y termina en la posición 44724301 (17q21.21 a 17q21.23) mostró diferencias en el número de copia estadísticamente significativas entre las clases sensibles y resistentes (valor P = 0,04 para rs2411377). El mismo grupo de marcadores también mostró una asociación significativa entre el número de copias y la sensibilidad MMAE (valor P para rs2411377 = 0.05). La Fig. 2 muestra la relación entre la sensibilidad al paclitaxel y el número de copias de ADN genómico en esta parte del cromosoma 17. Un número significativo de líneas celulares (8 de 14) que mostraron resistencia a paclitaxel experimentaron un aumento de la amplificación de genes dentro de la región (como se indica por un diamante). El mapa de calor generado por el análisis mostró un número de copias de ADN genómico de menos de cuatro en esta región. Ninguna de las líneas celulares que muestran sensibilidad a paclitaxel tuvo un incremento significativo en el número de copias de ADN genómico en esta región. La Fig. 2b muestra datos similares para la sensibilidad MMAE.

Ejemplo 5 - Identificación de genes candidatos en el intervalo

25 La región cromosómica de 17q21.31 a 17q21.33 codifica aproximadamente 100 transcripciones expresadas de acuerdo con el buscador genómico la UC Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu>). Basado en el principio de que los genes funcionalmente relevantes en las regiones de amplificación deben mostrar un aumento concomitante de la expresión del ARNm, esta lista se filtró para un máximo de 24 genes que mostraron expresión en exceso significativo sobre la amplificación: ABCC3, COL1A1, CROP, EAP, EPN3, FLJ13855, FLJ20920, HOXB7, LOC201191, ITGB3, KIAA0924, KPNB1, LOC400604, LOC81558, MGC11242, MGC15396, NDP52, PDK2, PHB, PP1R9B, SLC35B1, SPOP, TOB1, Wnt3. Un ejemplo de la expresión significativamente más alta del gen ABCC3 candidato (usando la sonda de expresión Affymetrix establecida 208161_s_) en líneas celulares amplificadas en comparación con líneas celulares no amplificadas se muestra en la figura. 3. Los 24 genes fueron sometidos a análisis funcional para identificar el locus responsable de conferir resistencia a taxanos y auristatinas.

Ejemplo 6 - Validación funcional de ABCC3 con ARN de interferencia

40 Se utilizó una estrategia de interferencia de ARN para identificar el gen responsable de la mediación de la resistencia a taxanos y auristatinas en líneas celulares amplificadas. El ensayo se basó en el hecho de que el tratamiento de las células con paclitaxel o MMAE da como resultado un bloqueo en la progresión del ciclo celular en la fase M que puede someterse a ensayo para determinar la presencia del marcador mitótico histona H3 fosforilada (33). La fosforilación en Ser10 de la histona H3 está estrechamente correlacionada con la condensación de los cromosomas durante la fase M, y el porcentaje de células que son positivas para la tinción de pH3, o índice mitótico, se puede determinar a través de un ensayo de inmunofluorescencia. La inactivación genética celular del gen que media la resistencia debe aumentar la sensibilidad de las líneas celulares que albergan la amplificación a paclitaxel y MMAE y por lo tanto dar como resultado una acumulación de células detenidas y un índice mitótico alto en relación con las células control tratadas a una concentración de fármaco dada. Un índice mitótico superior se correlaciona con la reducción de la viabilidad y la proliferación determinada por otros ensayos (COB y LMR, observaciones no publicadas), pero es una lectura más específica de los efectos antimitóticos de estos fármacos. ARNi de 23 de los 24 genes candidatos produjeron resultados reproducibles en la acumulación de células detenidas y el aumento del índice mitótico en las células EFM-192A, pero el ARNi de ABCC3 dio como resultado un índice mitótico relativo de dos a tres veces mayor al tratamiento de control con un ARNi de control no dirigido en las líneas celulares EFM-192A y ZR75-30 (Figura 4a-b). En contraste, el ARNi de no alteró apreciablemente el índice mitótico en las líneas no amplificadas de células HCC-1428 y MDA-MB-453 (Figura 4c - d). Se obtuvieron resultados similares con MMAE.

Ejemplo 7 - Expresión en exceso de ABCC3 causa resistencia in vitro a múltiples fármacos

60 Se seleccionaron células EVSA-T como modelo para generar líneas que expresan ABCC3 en exceso, ya que no muestran la amplificación ABCC3 y expresan bajos niveles de transcripciones ABCC3. Se confirmó la expresión en exceso de ABCC3 en tres líneas derivadas de forma independiente y se rastrearon para la sensibilidad in vitro a paclitaxel y MMAE utilizando un ensayo de luminiscencia basada en ATP. En este experimento, el tratamiento de clones que expresan ABCC3 en exceso no dio como resultado una reducción del 50 % de la viabilidad celular en un ensayo de tres días por lo que el factor de cambio en la sensibilidad se evaluó mediante el cálculo de la concentración que dio lugar a mitad de la máxima respuesta, o EC50. El EC50 para los vectores control tratados con paclitaxel fue 0,2 nM, mientras que los valores de EC50 para las líneas que expresan ABCC3 eran 5 nM, 10 nM, y

80 nM, respectivamente. El EC50 para el vector de control tratado con MMAE fue de 0,05 nM, mientras que los valores de EC50 para las líneas que expresan ABCC3 fueron 1,5 nM, 12 nM, y 90 nM, respectivamente.

Las tres líneas celulares que expresan en exceso eran al menos 20 veces menos sensibles a paclitaxel y MMAE basado en valores de EC50 y también mostraron notablemente menos inhibición del crecimiento celular en comparación con una línea celular estable y solamente vector de control en un ensayo de luminiscencia basada en ATP (Fig. 5).

Ejemplo 8 - La amplificación de ABCC3 se produce en tumores de mama

El análisis de la región del cromosoma 17 que abarca HER2 y ABCC3 en los datos de matriz de la línea celular de 100K SNP sugirió que el amplicón ABCC3 se asocia más comúnmente con los subtipos HER2 amplificado y no se observó en las líneas celulares clasificadas como luminal o de tipo basal.

Para asegurar que la amplificación ABCC3 no era un fenómeno específico de la línea celular, se caracterizaron los datos de número de copias en el locus ABCC3 utilizando la matriz Agilent CGH (aCGH) en ADN de 145 tumores de mama primarios. Estas muestras tumorales también se clasificaron en luminal, de tipo basal, y subtipos HER2 usando un predictor basado en niveles de expresión de ER, PR y HER2 como se describe en (32). El aumento en el número de copias de ABCC3 (> 3,5 copias) están presentes en el 25 % de los tumores amplificados por HER2 amplificado y el 11 % de los tumores luminales pero no estaban presentes en los tumores de tipo basal.

Ejemplo 9 - Ensayo FISH

Para confirmar la base citogenética de los aumentos aparentes en el número de copias observadas en las matrices SNP y aCGH, se desarrolló un ensayo de hibridación fluorescente in situ (FISH) utilizando un clon BAC (véase el Ejemplo 1) que abarca el locus ABCC3 y el análisis FISH se realizó en líneas celulares seleccionadas y en 61 tumores primarios que habían sido clasificados como que expresan en exceso HER2 basado en la HerceptTest (ensayo de IHC, revisado en (35)). Los resultados FISH de las líneas celulares corroboraron los datos obtenidos con la matriz SNP y el análisis qPCR. La línea celular de cáncer de mama EFM-192A con un número de copias ABCC3 elevado según predicción a partir de las matrices SNP mostraron efectivamente una amplificación de alto nivel de ABCC3 que se manifiesta como regiones de tinción homogénea (HSR) con la integración simple o múltiple en varios cromosomas, pero manteniendo copias individuales de HER2 y ABCC3 en el cromosoma 17. Las líneas celulares indicadas como diploides para ABCC3 basándose en el análisis conjunto SNP se confirmaron como diploides en el análisis FISH con CEP17 y ABCC3. El análisis FISH de los 61 tumores primarios positivos para HER2 que fueron seleccionados para la amplificación de ABCC3 confirmó que el número de copias elevado en ABCC3 es común en los tumores de mama positivos para HER2. Un alto nivel de amplificación de genes (proporción de ABCC3/CEP17 > 2,2) se observó en el 25 % de los tumores, mientras que un 11 % adicional de los tumores mostró aumentos moderados de ABCC3 (3-7 copias de ABCC3). Curiosamente, una serie de tumores muestran evidencia de heterogeneidad y muestran células tanto con amplificación de nivel muy alto de ABCC3 junto con células con el número de copias diploide de ABCC3.

Ejemplo 10 - La expresión en exceso de ABCC3 causa resistencia a la DM1

Linfocitos T EVSA células-T fueron transfectados establemente con un plásmido que contiene ABCC3 en el que ABCC3 se expresa en altos niveles a partir de un promotor de citomegalovirus (CMV). La expresión en exceso de ABCC3 fue confirmada por QRT-PCR. A continuación, se analizaron tres clones que expresan en exceso y una línea celular de control para sensibilidad a la DM1 libre en un ensayo de viabilidad celular convencional, y se encontró que los clones que sobreexpresan eran más resistentes a DM1 que la línea celular de control, de conformidad con la expresión en exceso ABCC3 lo que conduce a la resistencia a este agente (Fig. 7).

Ejemplo 11 - El ARNi de ABCC3 mejora la respuesta al anticuerpo conjugado con MMAF

Las células EFM192A se transfectaron con ARNi de ABCC3 y se sometieron a tratamiento con trastuzumab (Herceptin) conjugado a través del fármaco reactivo enlazador maleimidocaproil-valina-citrulina-PAB a MMAF (trastuzumab-mc-vc-PAB-MMAF). Las células EFM-192A transfectadas con ARNi de ABCC3 son más sensibles a trastuzumab-MC-vc-PAB-MMAF que las células transfectadas con un ARNi de control lo que indica que los niveles de expresión de ABCC3 pueden afectar la sensibilidad a este agente (Fig. 8).

Ejemplo 12 - El ARNi de ABCC3 mejora la respuesta a DM1 libre y al conjugado Trastuzumab-SMCC-DM1 Conjugado

Células EFM-192A transfectadas con ARNi ABCC3 son más sensibles ya sea a DM1 libre o al conjugado Trastuzumab-SMCC-DM1 que las células transfectadas con un ARNi de control (NTC), lo que indica que los niveles de expresión ABCC3 pueden afectar la sensibilidad a estos agentes (Figs. 9a y 9b).

Ejemplo 13 - El estado de amplificación de ABCC3 se correlaciona con la actividad T-DM1

- El análisis FISH de ABCC3 se realizó en muestras obtenidas del ensayo T-DM1 en Fase II (TDM4258G) para explorar el efecto de amplificación de ABCC3 en la actividad de T-DM1 en tumores de mama amplificados con HER2 amplificado. El ensayo clínico TDM4258G es un estudio en Fase II abierto multicéntrico de un solo brazo de T-DM1 administrado por infusión intravenosa a pacientes con cáncer de mama metastásico positivo para HER2. Las pacientes del ensayo habían demostrado progresión antes de la terapia dirigida con HER2. Se obtuvieron muestras de tejido tumoral incluidas en parafina fijadas con formol (FFPE) del archivo del ensayo clínico guardadas en los centros de investigación clínica con la aprobación del IRB adecuado y el consentimiento de la paciente.
- El ensayo FISH se realizó en las muestras de ensayos clínicos como se describe en el Ejemplo 1. La Fig. 10 muestra los datos del análisis del ensayo FISH clasificado según la relación ABCC3/CEP17. Se considera que esas muestras con relaciones ABCC3/CEP17 de 1,8 y superiores tienen una amplificación de ABCC3. El 80 % (12/15) de las pacientes cuyas muestras no mostraron amplificación de ABCC3 respondieron al tratamiento con T-DM1 mientras que el 40 % (2/5) de las pacientes cuyas muestras mostraron amplificación de ABCC3 respondió al tratamiento con T-DM1. Este análisis indica que el estado de amplificación ABCC3 es útil en la determinación de la respuesta probable de un paciente al tratamiento con T-DM1.

Referencias

1. O'Driscoll L, Clynes M. Biomarkers and multiple drug resistance in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2006;6(5):365-84.
2. Cigler T, Goss PE. Breast cancer adjuvant endocrine therapy. *Cancer journal* (Sudbury, Mass 2007;13(3):148-55.
3. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344(11):783-92.
4. Guarneri V, Conte PF. The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31 Suppl 1:5149-61.
5. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews* 2006;5(3):219-34.
6. Katsnelson A. Cautious welcome for FDA pharmacogenomics guidance. *Nat Biotechnol* 2005;23(5):510.
7. Lee JK, Havaleshko DM, Cho H, et al. A strategy for predicting the chemosensitivity of human cancers and its application to drug discovery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(32):13086-91.
8. Szakacs G, Annereau JP, Lababidi S, et al. Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell* 2004;6(2):129-37.
9. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(14):8418-23.
10. Finnegan TJ, Carey LA. Gene-expression analysis and the basal-like breast cancer subtype. *Future Oncol* 2007;3(1):55-63.
11. Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006;7:96.
12. Kurt M, Harputluoglu H, Dede DS, Gullu IH, Altundag K. Potential molecular targeted therapies in the management of the basal-like subtype of breast cancer. *Breast* 2007;16(2):111-2.
13. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11(16):5678-85.
14. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 2006; 10(6):515-27.
15. Doronina SO, Toki BE, Torgov MY, et al. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 2003;21(7):778-84.
16. Crown J, O'Leary M. The taxanes: an update. *Lancet* 2000;355(9210):1176-8.
17. Zhao X, Li C, Paez JG, et al. An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res* 2004;64(9):3060-71.
18. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 2005;436(7047):117-22.
19. Gorringer KL, Chin SF, Pharoah P, et al. Evidence that both genetic instability and selection contribute to the accumulation of chromosome alterations in cancer. *Carcinogenesis* 2005;26(5):923-30.
20. Rae JM, Ramus SJ, Waltham M, et al. Common origins of MDA-MB-435 cells from various sources with those shown to have melanoma properties. *Clin Exp Metastasis* 2004;21(6):543-52.
21. Barrett MT, Scheffer A, Ben-Dor A, et al. Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(51):17765-70.
22. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(25):14863-8.
23. Matsuzaki H, Dong S, Loi H, et al. Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays. *Nat Methods* 2004;1(2):109-11.
24. Hupe P, Stransky N, Thiery JP, Radvanyi F, Barillot E. Analysis of array CGH data: from signal ratio to gain and loss of DNA regions. *Bioinformatics* 2004;20(18):3413-22.
25. Beroukhir R, Getz G, Nghiemphu L, et al. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer:

Methodology and application to glioma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(50):20007-12.

26. Westphal P, Young S. Resampling-based multiple testing: Examples and methods for p-value adjustment. : John Wiley & Sons 1993.

27. Fanning TG, Singer MF. LINE-1: a mammalian transposable element. *Biochimica et biophysica acta* 1987;910(3):203-12.

28. Kindich R, Florl AR, Jung V, et al. Application of a modified real-time PCR technique for relative gene copy number quantification to the determination of the relationship between NKX3.1 loss and MYC gain in prostate cancer. *Clin Chem* 2005;51(3):649-52.

29. Bayani J, Zielenska M, Marrano P, et al. Molecular cytogenetic analysis of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors by using conventional banding, comparative genomic hybridization, and spectral karyotyping. *J Neurosurg* 2000;93(3):437-48.

30. Grove LE, Ghosh RN. Quantitative characterization of mitosis-blocked tetraploid cells using high content analysis. *Assay and drug development technologies* 2006;4(4):421-42.

31. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006;19(2):264-71.

32. Hu X SH, O'Brien C, Honchell, Wu T, Chant J, Lackner M, Cavet G. Genetic alterations and oncogenic pathways associated with breast cancer subtypes. *Molecular Cancer Research*, in press (April, 2009).

33. Gasparri F, Cappella P, Galvani A. Multiparametric cell cycle analysis by automated microscopy. *J Biomol Screen* 2006;11(6):586-98.

34. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(16):1295-302.

35. Carlsson J, Nordgren H, Sjostrom J, et al. HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review. *Br J Cancer* 2004;90(12):2344-8.

36. Liu Y, Peng H, Zhang JT. Expression profiling of ABC transporters in a drug-resistant breast cancer cell line using AmpArray. *Mol Pharmacol* 2005;68(2):430-8.

37. Huang R, Murry DJ, Kolwankar D, Hall SD, Foster DR. Vincristine transcriptional regulation of efflux drug transporters in carcinoma cell lines. *Biochem Pharmacol* 2006;71(12):1695-704.

38. Huisman MT, Chhatta AA, van Tellingen O, Beijnen JH, Schinkel AH. MRP2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid. *Int J Cancer* 2005;116(5):824-9.

39. Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchavezleva I, Belinsky MG, Kruh GD. Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer Res* 2004;64(14):4927-30.

40. Lagas JS, Vlaming ML, van Tellingen O, et al. Multidrug resistance protein 2 is an important determinant of paclitaxel pharmacokinetics. *Clin Cancer Res* 2006; 12(20 Pt 1):6125-32.

41. Kool M, van der Linden M, de Haas M, et al. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(12):6914-9.

42. Zeng H, Bain LJ, Belinsky MG, Kruh GD. Expression of multidrug resistance protein-3 (multispecific organic anion transporter-D) in human embryonic kidney 293 cells confers resistance to anticancer agents. *Cancer Res* 1999;59(23):5964-7.

43. Mahjoubi F, Hill RJ, Peters GB. Chromosome microdissection identifies genomic amplifications associated with drug resistance in a leukemia cell line: an approach to understanding drug resistance in cancer. *Chromosome Res* 2006;14(3):263-76.

44. Schmidt M, Bremer E, Hasenclever D, et al. Role of the progesterone receptor for paclitaxel resistance in primary breast cancer. *Br J Cancer* 2007;96(2):241-7.

45. Shajahan AN, Wang A, Decker M, Minshall RD, Liu MC, Clarke R. Caveolin-1 tyrosine phosphorylation enhances paclitaxel-mediated cytotoxicity. *J Biol Chem* 2006.

46. Pinilla SM, Honrado E, Hardisson D, Benitez J, Palacios J. Cavcolin-1 expression is associated with a basal-like phenotype in sporadic and hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006;99(1):85-90.

47. Savage K, Lambros MB, Robertson D, et al. Caveolin 1 is overexpressed and amplified in a subset of basal-like and metaplastic breast carcinomas: a morphologic, ultrastructurat, immunohistochemical, and in situ hybridization analysis. *Clin Cancer Res* 2007;13(1):90-101.

48. Rouzier R, Rajan R, Wagner P, et al. Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(23):8315-20.

49. Wagner P, Wang B, Clark E, Lee H, Rouzier R, Pusztai L. Microtubule Associated Protein (MAP)-Tau: a novel mediator of Paclitaxel sensitivity in vitro and in vivo. *Cell Cycle* 2005;4(9):1149-52.

50. Lambros MB, Natrajan R, Reis-Filho JS. Chromogenic and fluorescent in situ hybridization in breast cancer. *Hum Pathol* 2007;38(8):1105-22.

51. Hann CL, Brahmer JR. "Who shouted receive epidermal growth factor receptor inhibitors for non-small cell lung cancer and when?" *Curr Treat Options Oncol* 2007;8(1):28-37.

52. Hayes DF, Thor AD, Dressler LG, et al. HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2007;357(15):1496-506.

Aunque la invención se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Las descripciones de todas las bibliografías de patentes y científicas citadas en el presente documento se incorporan expresamente en su totalidad por referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un cáncer de mama en un paciente es resistente al tratamiento con un conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo que comprende un agente antimetabólico seleccionado entre una auristatina y un maitansinoide unidos covalentemente a un anticuerpo, comprendiendo dicho método detectar si el gen ABCC3 está amplificado o expresado en exceso en una muestra de ensayo de cáncer de mama procedente de la paciente, en el que la amplificación o la expresión en exceso del gen ABCC3 indica que el cáncer de mama es resistente al tratamiento con el conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo.
2. El método de la reivindicación 1 que comprende detectar si el gen ABCC3 está amplificado, en el que detectar la amplificación del gen ABCC3 comprende determinar el número de copias del gen ABCC3, en donde un número de copias de al menos 3 indica la amplificación del gen ABCC3.
3. El método de la reivindicación 2, en el que un número de copias de al menos 5 indica la amplificación del gen ABCC3.
4. El método de la reivindicación 1 que comprende detectar si el gen ABCC3 está expresado en exceso, en el que la detección de la expresión del gen ABCC3 comprende determinar el nivel de transcripción del ARNm del gen ABCC3.
5. El método de la reivindicación 4 en el que la expresión en exceso del gen ABCC3 está indicada por un aumento de al menos 5 veces en el nivel de transcripción del ARNm del gen ABCC3 en la muestra de ensayo de cáncer de mama comparado con una muestra de control.
6. El método de la reivindicación 5 en el que la expresión en exceso del gen ABCC3 está indicada por un aumento de al menos 25 veces en el nivel de transcripción del ARNm del gen ABCC3 en la muestra de ensayo de cáncer de mama comparado con una muestra de control.
7. El método de la reivindicación 1 que comprende detectar si el gen ABCC3 está expresado en exceso, en el que la detección de la expresión en exceso del gen ABCC3 comprende determinar el nivel de expresión del polipéptido ABCC3.
8. El método de la reivindicación 7 en el que la determinación del nivel de expresión del polipéptido ABCC3 comprende poner en contacto la muestra de ensayo de cáncer de mama con un anticuerpo anti-ABCC3 y detectar la unión del anticuerpo anti-ABCC3 al polipéptido ABCC3.
9. El método de la reivindicación 7 en el que la expresión en exceso del gen ABCC3 está indicada por un aumento de al menos 2 veces en el nivel de expresión del polipéptido ABCC3 en la muestra de ensayo de cáncer de mama comparado con una muestra de control.
10. El método de la reivindicación 7 en el que la expresión en exceso del gen ABCC3 está indicada por un aumento de al menos 10 veces en el nivel de expresión del polipéptido ABCC3 en la muestra de ensayo de cáncer de mama comparado con una muestra de control.
11. El método de las reivindicaciones 2 o 3, en el que el número de copias del gen ABCC3 se determina por hibridación de fluorescencia in situ (FISH), transferencia de Southern, inmunohistoquímica (IHC), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa (qPCR), PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), hibridación genómica comparativa, hibridación genómica comparativa basada en micromatrices, o reacción en cadena de la ligasa (LCR).
12. El método de la reivindicación 1, en el que el cáncer de mama es cáncer de mama positivo para Her2.
13. El método de la reivindicación 1, en el que el agente antimetabólico es:
 - (a) una auristatina seleccionada del grupo que consiste en monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F (MMAF); o
 - (b) un maitansinoide seleccionado del grupo que consiste en DM1 y DM4.
14. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 13, en el que el conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo es un conjugado de maitansinoide-anticuerpo anti-Her2.
15. El método de la reivindicación 14, en el que el conjugado de maitansinoide-anticuerpo anti-Her2 es trastuzumab-DM1.
16. Un conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo que comprende un agente antimetabólico seleccionado entre una auristatina y un maitansinoide unidos covalentemente a un anticuerpo, para su uso en un método para tratar a un paciente con cáncer de mama que es resistente al conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo, comprendiendo el

método administrar a la paciente un antagonista de ABCC3 y el conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo, en donde se ha determinado que el cáncer de mama de la paciente es resistente al conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo mediante la detección de si el gen ABCC3 está amplificado o expresado en exceso en una muestra de ensayo de cáncer de mama de la paciente.

5 17. Un antagonista de ABCC3 para su uso en un método de tratamiento de una paciente con cáncer de mama que es resistente a un conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo que comprende un agente antimetabólico seleccionado entre una auristatina y un maitansinoide unidos covalentemente a un anticuerpo, comprendiendo el método
10 administrar a la paciente un antagonista de ABCC3 y el conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo, en donde se ha determinado que el cáncer de mama de la paciente es resistente al conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo mediante la detección de si el gen ABCC3 está amplificado o expresado en exceso en una muestra de ensayo de cáncer de mama de la paciente.

15 18. El conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 16 o el antagonista de ABCC3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el antagonista se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-ABCC3 y un ARNip que se une a ABCC3.

20 19. El conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 16 o el antagonista de ABCC3 para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el cáncer de mama es un cáncer de mama positivo para Her2.

25 20. Un conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo que comprende un agente antimetabólico seleccionado entre una auristatina y un maitansinoide unidos covalentemente a un anticuerpo para su uso en un método para tratar el cáncer de mama, comprendiendo el método

a) seleccionar una paciente en función de la ausencia de amplificación o expresión en exceso de ABCC3 en el
cáncer de la paciente, y
b) administrar a la paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado de agente antimetabólico-
anticuerpo.

30 21. El conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la paciente seleccionada tiene cáncer de mama positivo para Her2.

35 22. El conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 20 o la reivindicación 21, en donde el agente antimetabólico es un conjugado de anticuerpo anti-Her2-agente antimetabólico.

23. El conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el conjugado de anticuerpo anti-Her2-agente antimetabólico es trastuzumab-DM1 o trastuzumab-MMAE.

40 24. El método de la reivindicación 1 para determinar si el cáncer de mama de una paciente es resistente al tratamiento con un conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo, comprendiendo dicho conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo un agente antimetabólico seleccionado entre una auristatina y un maitansinoide unidos covalentemente a trastuzumab.

45 25. El conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende un agente antimetabólico seleccionado entre una auristatina y un maitansinoide unidos covalentemente a trastuzumab.

50 26. El antagonista de ABCC3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 17, comprendiendo dicho conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo un agente antimetabólico seleccionado entre una auristatina y un maitansinoide unidos covalentemente a trastuzumab.

55 27. El conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, comprendiendo dicho conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo un agente antimetabólico seleccionado entre una auristatina y un maitansinoide unidos covalentemente a trastuzumab.

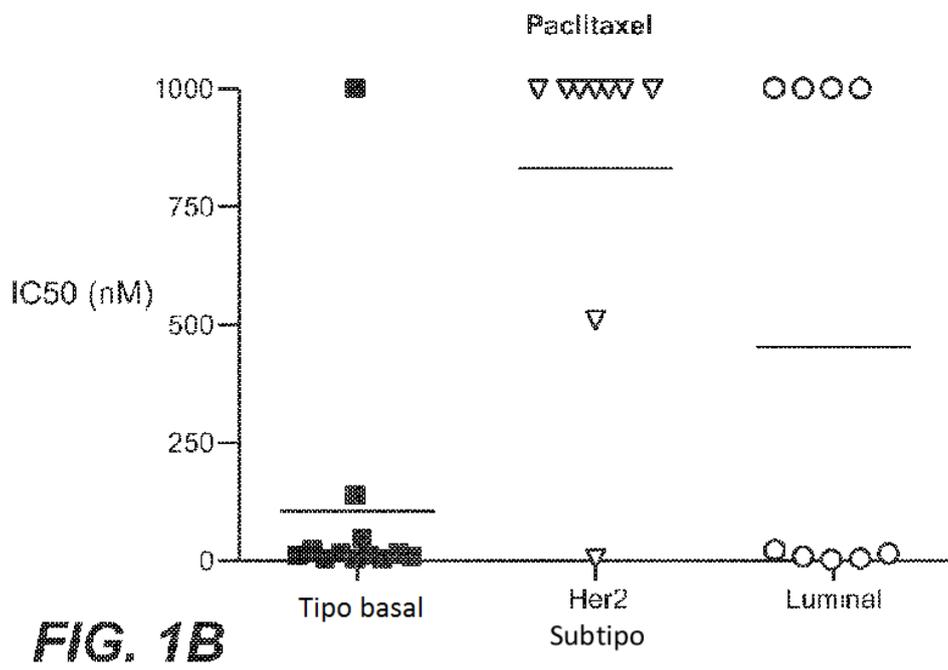
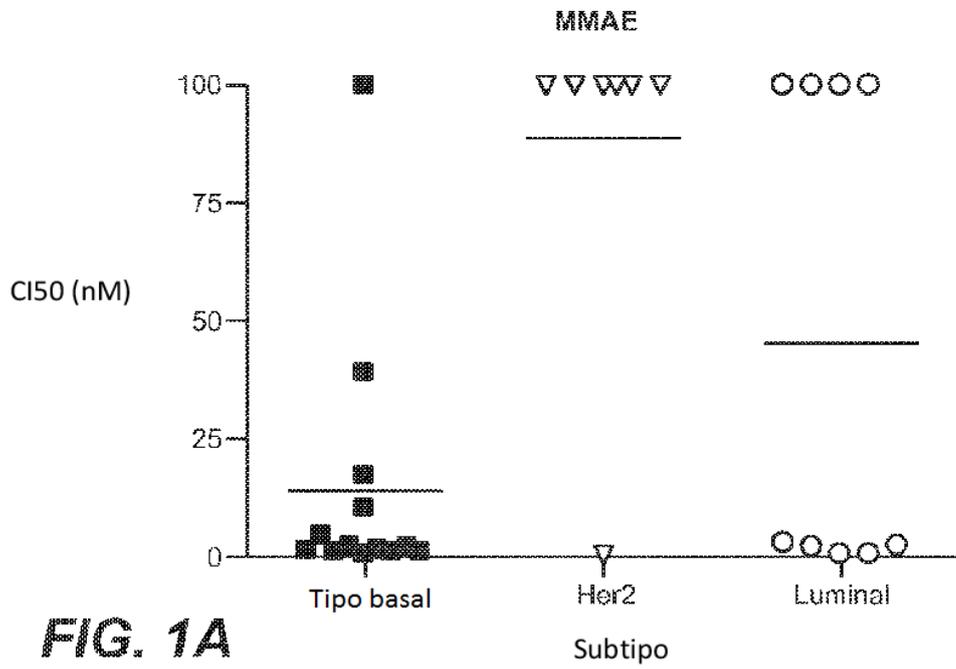
60 28. El método de la reivindicación 1 para determinar si el cáncer de mama de una paciente es resistente al tratamiento con un conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo, comprendiendo dicho conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo un agente antimetabólico seleccionado entre monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF), DM1 y DM4.

65 29. El conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende un agente antimetabólico seleccionado entre monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF), DM1 y DM4.

30. El antagonista de ABCC3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 17, comprendiendo dicho conjugado de agente antimetabólico-anticuerpo un agente antimetabólico seleccionado entre monometil auristatina E (MMAE),

monometil auristatina F (MMAF), DM1 y DM4.

31. El conjugado de agente antimitótico-anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, comprendiendo dicho conjugado de agente antimitótico-anticuerpo un agente antimitótico seleccionado entre monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF), DM1 y DM4.
- 5



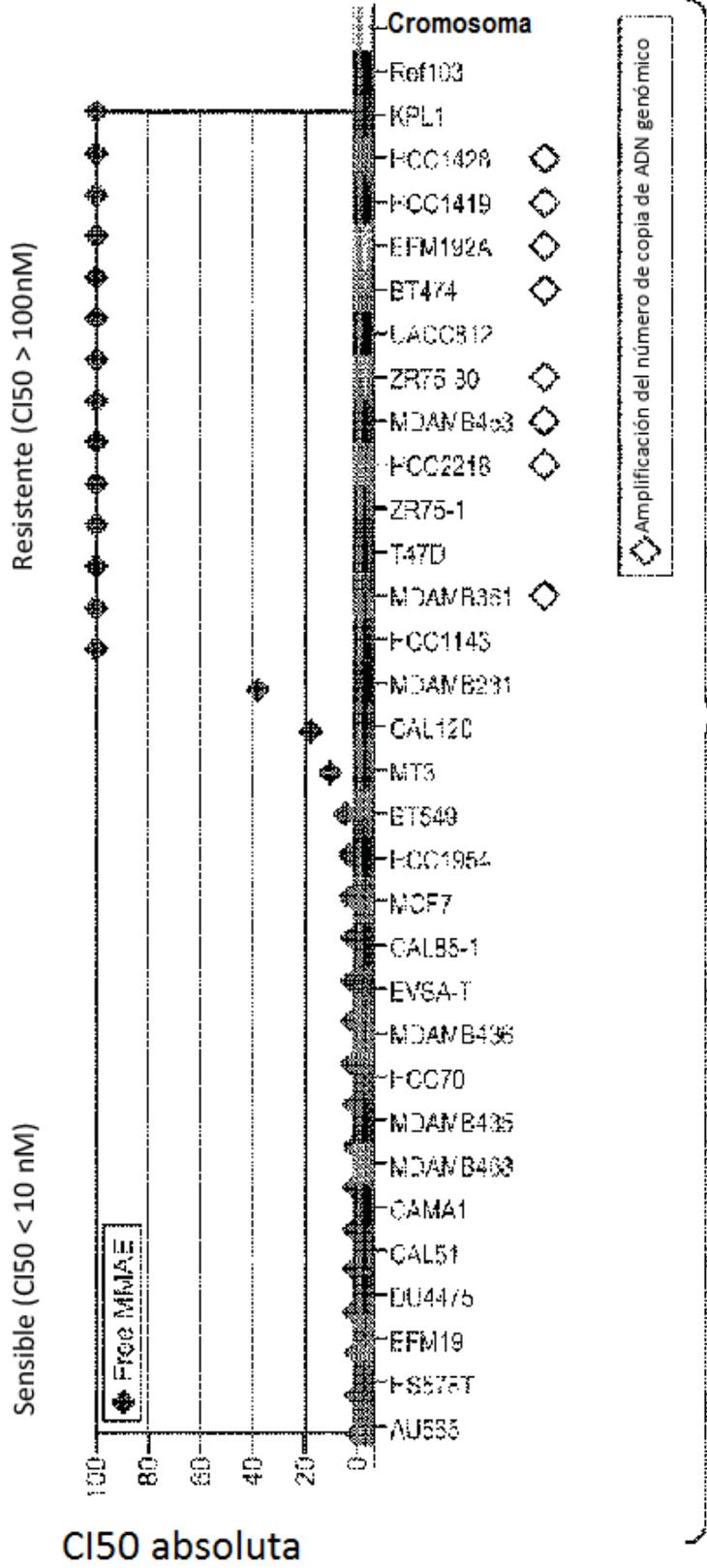
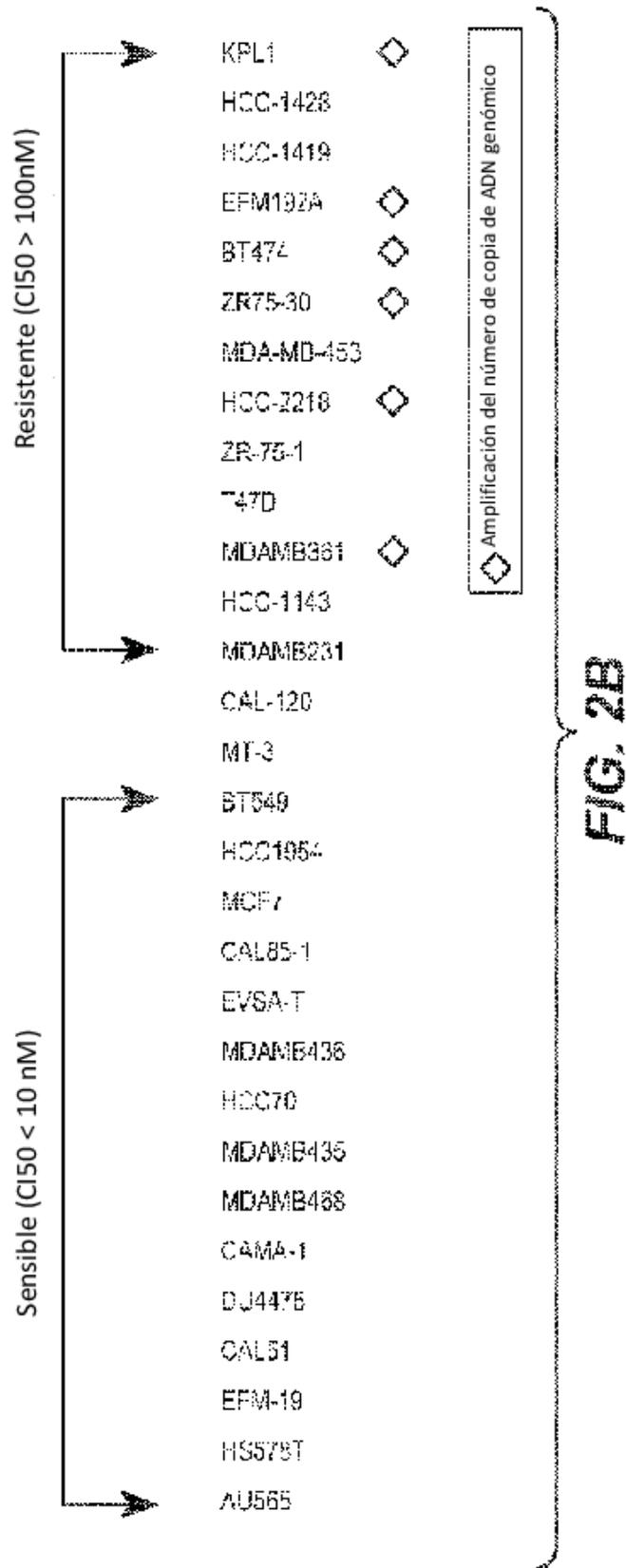


FIG. 2A



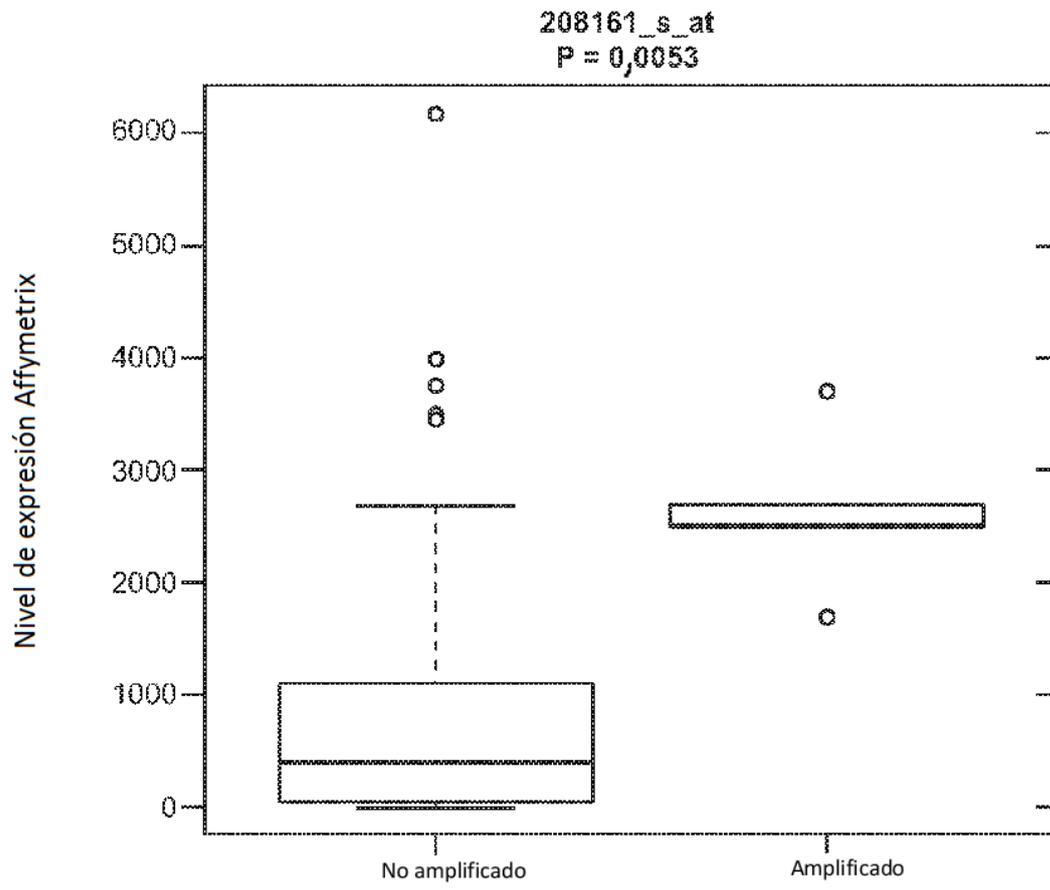


FIG. 3

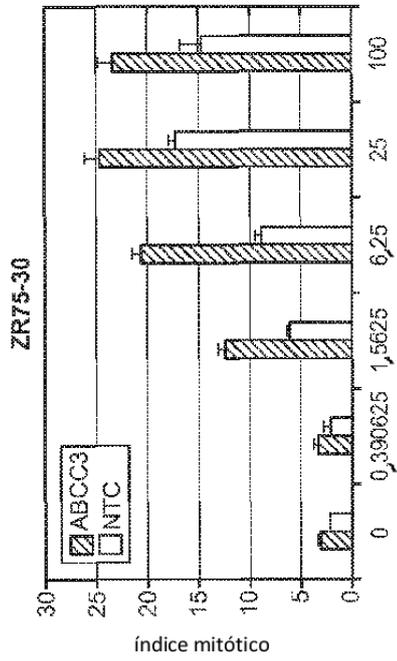


FIG. 4B



FIG. 4D

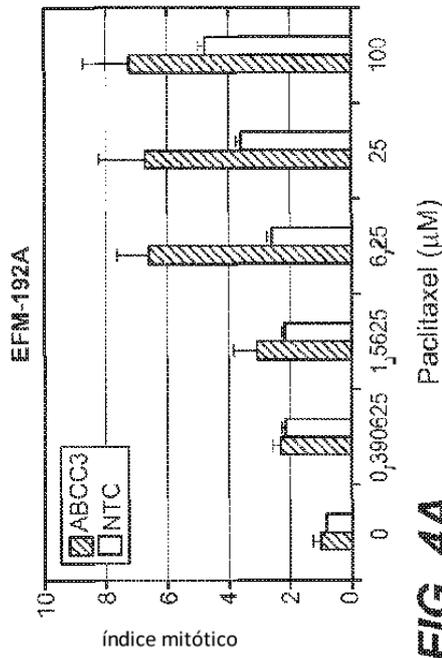


FIG. 4A

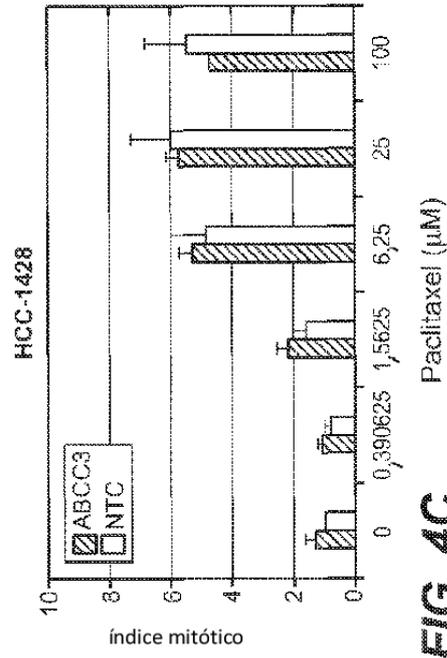


FIG. 4C

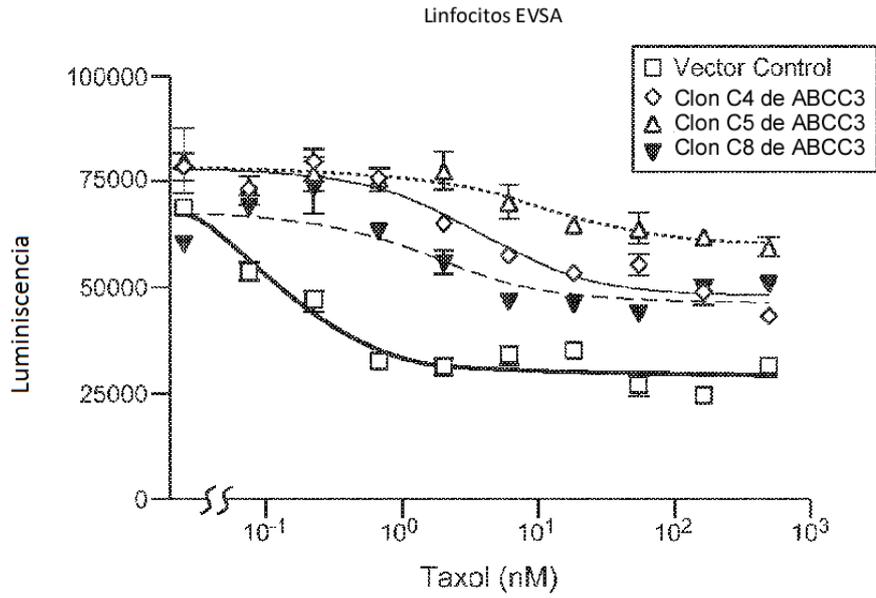


FIG. 5A

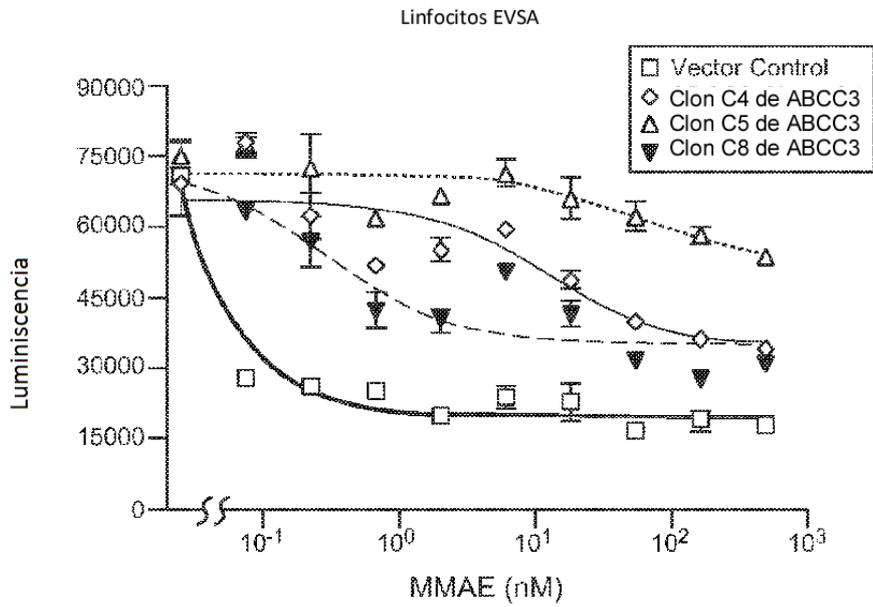
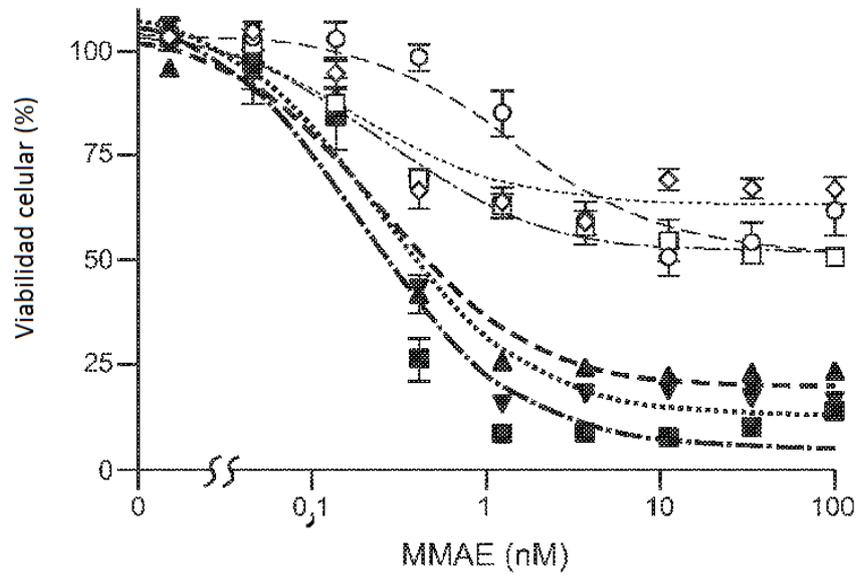


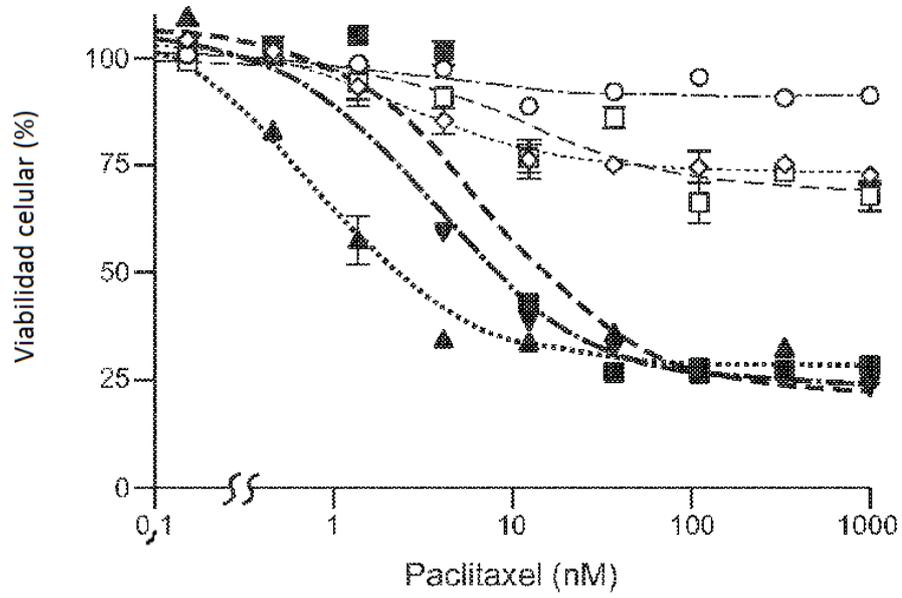
FIG. 5B



○	EFM192A
□	MDAMB361
◇	BT474
■	AU565
▲	EFM19
▼	MDAMB468

Línea celular	CI50 (nM)
EFM192A	>100
MDAMB361	>100
BT474	>100
AU565	0.36
EFM19	0.55
MDAMB468	0.53

FIG. 6A



○	EFM192A
□	MDAMB361
◇	BT474
■	AU565
▼	MDAMB468
▲	EFM19

Línea celular	CI50 (nM)
EFM192A	>1000
MDAMB361	>1000
BT474	>1000
AU565	11.60
MDAMB468	8.96
EFM19	3.23

FIG. 6B

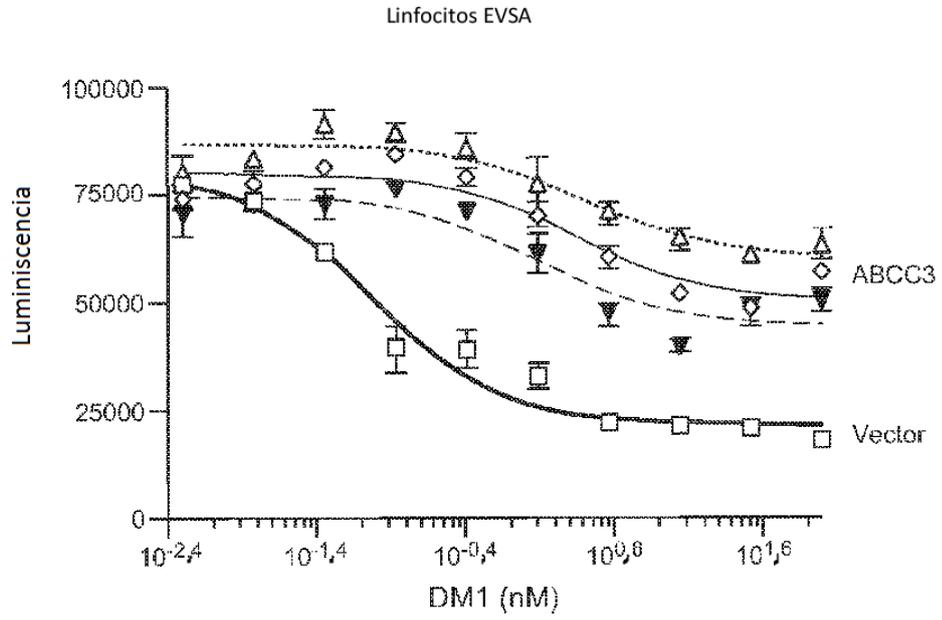


FIG. 7

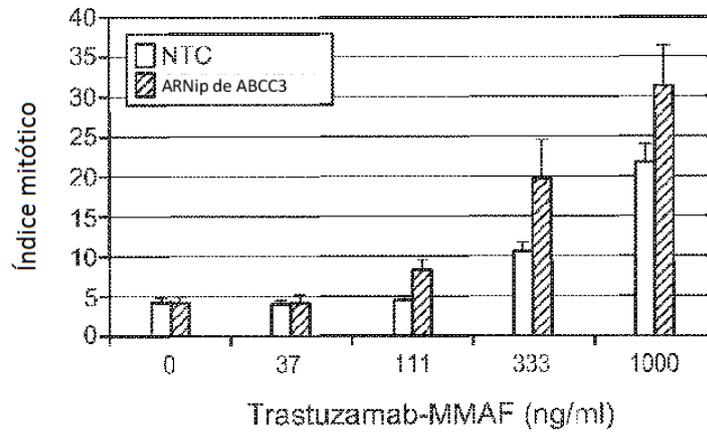


FIG. 8

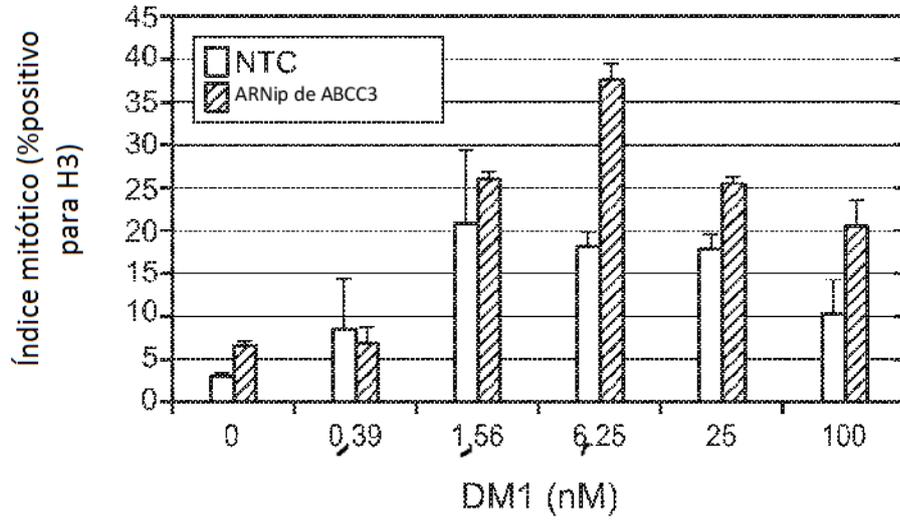


FIG. 9A

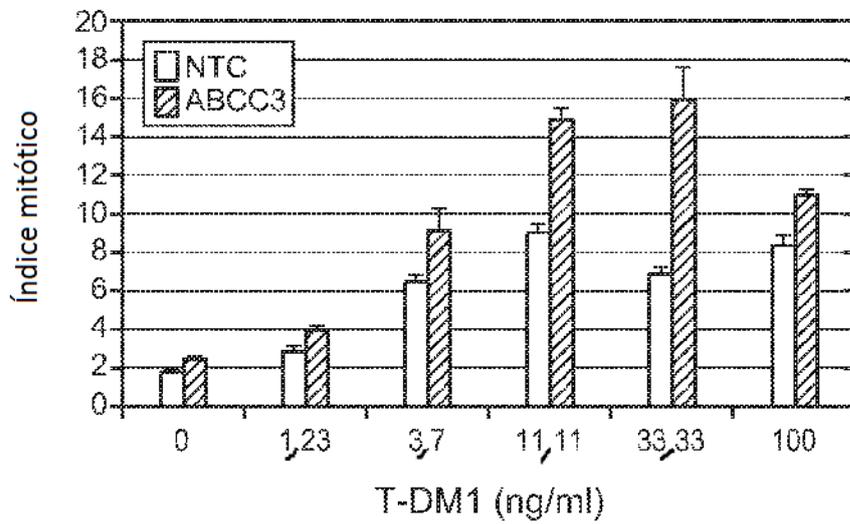


FIG. 9B

ID sujeto	nº copias ABCC3	nº copias CEP17	relación ABCC3/CEP17	estado de amplificación de ABCC3	mejor respuesta (1=CR, 2=PR, 3=SD, 4=PD, 5=EU)	respuesta confirmada del objetivo	(recuento celular 30 o 60)	FISH HER2 (recuento celular 30 o 60)	relación de concentración HER2 RT-PCR y G6PDH
1	Alto	2,07	>7	Fuertemente amplificado	4	4	Positivo	3+	41,83
2	Alto	2,07	>7	Fuertemente amplificado	2	2	Positivo	3+	40,37
3	Alto	2,05	>7	Fuertemente amplificado	2	2	Positivo	2+	36,70
4	6,4	1,65	3,87	Amplificado	3	3	Positivo	1+	8,84
5	3,65	1,87	1,95	Amplificado	3	3	Negativo	2+	4,59
6	2,59	1,50	1,72	Normal	2	2	Negativo	0	2,23
7	6,44	3,95	1,60	Amplificación por grupo	4	4	Valor límite	1+	2,32
8	4,17	2,67	1,56	Normal	2	2	Positivo	1+	17,55
9	4,61	3,00	1,54	Normal	2	2	Positivo	3+	38,04
10	3,71	2,54	1,46	Normal	2	2	Positivo	2+	
11	3,81	2,65	1,43	Normal	2	2	Positivo	0	5,69
12	6,35	4,50	1,41	Normal	2	2	Positivo	1+	
13	2,93	2,11	1,38	Normal	2	2	Positivo	3+	22,80
14	2,91	2,11	1,37	Normal	2	2	Positivo	3+-	6,24
15	4,47	3,73	1,19	Normal	2	2		3+	
16	3,91	3,39	1,15	Normal	2	2	Positivo	1+	
17	2,77	2,56	1,08	Normal	2	2	Positivo	1+	14,43
18	2,41	2,30	1,04	Normal	4	4	Positivo	3+	14,65
19	2,41	2,36	1,02	Normal	2	2	Positivo	3+	19,31
20	4,03	4,00	1,00	Normal	2	3	Positivo	3+	33,92

FIG. 10

CR = respuesta completa; PR = respuesta parcial; SD = enfermedad estable; PD = enfermedad en progresión; UE = no evaluable; G6PDH = glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

FIG. 11



FIG. 11A

Subtipo molecular y sensibilidad a fármacos antimitóticos

Designación de la línea celular	Subtipo de perfilado de la expresión génica	Número copias HER2 qPCR	Des. est.	Subtipo molecular compuesto
BT549	Tipo basal	1,7	0,1	Tipo basal
CAH20	Tipo basal	2,2	0,4	Tipo basal
CAL~51	Tipo basal	2,5	0,0	Tipo basal
CAL-85-1	Tipo basal	1,2	0,0	Tipo basal
DU4475	Tipo basal	3,4	10	Tipo basal
HCC-1143	Tipo basal	1,8	0,1	Tipo basal
HCC-70	Tipo basal	1,0	0,0	Tipo basal
HS 578T	Tipo basal	4,5	0,2	Tipo basal
MDA-MB-231	Tipo basal	1,6	0,0	Tipo basal
MDA-MB-435S	Tipo basal	1,0	0,0	Tipo basal
MDA-MB-436	Tipo basal	10	0,0	Tipo basal
MDA-MB-468	Tipo basal	2,8	0,3	Tipo basal
MT-3	Tipo basal	2,0	0,2	Tipo basal
AU565	Luminal	13,4	1,2	Her 2
BT474	Luminal	17,0	19	Her 2
EFM-192A	Luminal	28,5	0,9	Her 2
HCC-1419	Luminal	49,9	0,6	Her 2
HCC-2218	Luminal	81,2	0,9	Her 2
MDA-MB-361	Luminal	13,9	0,8	Her 2
MDA-MB-453	Luminal	8,0	0,2	Her 2
UACC-812	Luminal	12,4	4,8	Her 2
ZR-75-30	Luminal	31,2	0,4	Her 2
CAH48	Tipo basal	1,5	0,1	Luminal
CAMA-1	Luminal	3,3	0,4	Luminal
EFM-19	Luminal	2,8	0,6	Luminal
EVSA-T	Luminal	2,8	0,2	Luminal
HCC-1428	Luminal	1,0	0,0	Luminal
KPL-1	Luminal	1,9	0,2	Luminal
MCF-7	Luminal	13	0,1	Luminal
T47D	Luminal	2,1	0,1	Luminal
ZR-75-1	Luminal	1,3	0,0	Luminal

FIG. 11B

Mmae CI50 (nM) ¹	Dev.est. MMAE ²	Paclitaxel (CI50 (nM)	Dev.est. Paclitaxel
4,6	2,2	5,5 1	14,1
17,2	4,8	11,4 1	12,4
1,3	2,1	12,8 1	7,6
2,1	4,1	1,7 1	9,2
1,5	3,9	133,6 1	31,8
>100	NA	7,4 1	5,8
1,1	5,6	17,9 1	11,3
0,9	0,3	42,5 1	29,3
38,9	6,0	9,8 1	8,6
0,6	0,4	1,0 1	1,0
1,9	0,6	>1000 1	NA
0,5	0,5	0,52 1	17,3
10,4	18,2	90,1 1	51,1
0,3	0,2	4,0	10,3
>100	NA	>1000	NA
>100	NA	>1000	NA
>100	NA	>1000	NA
>100	NA	>10001	NA
>100	NA	>1000	NA
>100	NA	>1000	NA
>10Q	NA	>1000	NA
>100	NA	>1000	NA
2,4	1,3	12,8	9,4
0,2	0,5	2,8 1	3,7
0,4	0,3	18,4 1	16,4
2,0	10,1	>1000	NA
>100	NA	>1000	NA
>100	NA	>1000	NA
2,7	4,5	0,1	1,2
>100	NA	0,11	1,2
>100	NA	>1000	NA

¹ > 100 (MMAE) > 1000 (paclitaxel) indica que la IC50 no se consiguió en esta línea celular debido a una inhibición menor del 50% de la viabilidad celular

²NA, no aplicable, ya que la línea celular no alcanzó la CI50