

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 377**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2008 E 12194103 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2592156**

54 Título: **Marcadores de expresión génica de la resistencia tumoral al tratamiento con inhibidor de HER2**

30 Prioridad:

08.06.2007 US 942906 P

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

20.09.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LEE-HOEFLICH, SI TUEN y
STERN, HOWARD**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 583 377 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

Marcadores de expresión génica de la resistencia tumoral al tratamiento con inhibidor de HER2

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a marcadores de la resistencia de tumores que expresan HER2 al tratamiento con inhibidores de HER2, tal como anticuerpos contra HER2, que incluyen el trastuzumab.

10 Descripción de la técnica anteriorReceptores de HER y anticuerpos contra HER

15 [0002] La familia de receptores de tirosina quinasas HER son mediadores importantes del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. La familia de receptores puede incluir cuatro miembros diferentes que incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1 o HER1), HER2 (ErbB2 o p185^{neu}), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2).

20 [0003] El segundo miembro de la familia de HER, p185^{neu} se identificó originalmente como el producto del gen transformante de neuroblastomas de ratas tratadas químicamente. La forma activada del proto-oncogén *neu* resulta de una mutación puntual (de valina a ácido glutámico) en la región transmembrana de la proteína codificada. La amplificación del homólogo humano de *neu* se observa en los cánceres de mama y ovario y se correlaciona con un pronóstico pobre (Salmón et al., *Science*, 235: 177-182 (1987); Slamon et al., *Science*, 244: 797-712 (1989); y Patente de Estados Unidos No. 4.968.603). Hasta la fecha, no se ha descrito una mutación puntual análoga a esta
25 en el proto-oncogén *neu* para tumores humanos. También se ha observado la sobreexpresión de HER2 (frecuentemente, pero no uniformemente debido a la amplificación génica) en otros carcinomas incluyendo carcinomas del estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. Véase, entre otros, King et al., *Science*, 229: 974 (1985); Yokota et al., *Lancet*: 1: 765-767 (1986); Fukushigi et al., *Mol Cell Biol.* 6: 955-958 (1986); Geurin et al., *Oncogene Res.*, 3: 21-31 (1988); Cohen et al., *Oncogene*, 4: 81-88 (1989);
30 Yonemura et al., *Cancer Res.*, 51: 1034 (1991); Borst et al., *Gynecol. Oncol.*, 38: 364 (1990); Weiner et al., *Cancer Res.*, 50: 421-425 (1990); Kern et al., *Cancer Res.*, 50: 5184 (1990); Park et al., *Cancer Res.*, 49: 6605 (1989); Zhou et al., *Mol. Carcinog.*, 3: 354-357 (1990); Aasland et al. *Br. J. Cancer* 57: 358-363 (1988); Williams et al. *Pathobiology* 59: 46-52 (1991); y McCann et al., *Cancer*, 65: 88-92 (1990). ErbB2 se puede sobreexpresar en el cáncer de próstata (Gu et al. *Cancer Lett.* 99: 185-9 (1996); Ross et al. *Hum. Pathol.* 28: 827-33 (1997); Ross et al. *Cancer* 79: 2162-70 (1997); y Sadasivan et al. *J. Urol.* 150: 126-31 (1993)).

[0004] Se han descrito anticuerpos dirigidos contra productos proteicos p185^{neu} de rata y HER2 humano.

40 [0005] Drebin y colaboradores han desarrollado anticuerpos contra el producto génico *neu* de rata, p185^{neu}. Véase, por ejemplo, Drebin et al., *Cell* 41: 695-706 (1985); Myers et al., *Meth. Enzym.* 198: 277-290 (1991) y WO94/22478. Drebin et al., *Oncogene* 2: 273-277 (1988) describen que mezclas de anticuerpos reactivos con dos regiones diferentes de p185^{neu} dan lugar a efector sinérgico anti-tumorales sobre células NIH-3T3 transformadas por *neu*. Véase también la Patente de Estados Unidos 5.824.311 publicada el 20 de octubre de 1998.

45 [0006] Hudziak et al., *Mol. Cell. Biol.* 9(3): 1165-1172 (1989) describen la generación de un panel de anticuerpos contra HER2 que se caracterizaron utilizando la línea de células de tumor de mama humana SK-BR-3. La proliferación celular relativa de las células SK-BR-3 tras la exposición a los anticuerpos se determinó mediante tinción con violeta cristal de las monocapas después de 72 horas. Utilizando este ensayo, se obtuvo la máxima inhibición con el anticuerpo llamado 4D5 que inhibió la proliferación celular en un 56%. Otros anticuerpos en el panel
50 redujeron la proliferación celular en menor grado en este ensayo. También se observó que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba las líneas de células de tumor de mama que sobreexpresan HER2 a los efectos citotóxicos de TNF- α . Véase también la Patente de Estados Unidos No. 5.677.171 concedida el 14 de octubre de 1997. Los anticuerpos contra HER2 descritos en Hudziak et al., se caracterizan adicionalmente en Fendly et al. *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts et al. *In Vitro* 26(3):59A (1990); Sarup et al. *Growth Regulation* 1:72-82 (1991); Shepard et al. *J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127 (1991); Kumar et al. *Mol. Cell. Biol.* 11 (2):979-986 (1991); Lewis et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras et al. *Oncogene* 9: 1829-1838 (1994); Vitetta et al. *Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski et al. *J. Biol. Chem.* 269(20): 14661-14665 (1994); Scott et al. *J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991); y D'souza et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 7202-7206 (1994); Lewis et al. *Cancer Research* 56: 1457-1465 (1996); y Schaefer et al. *Oncogene* 15: 1385-1394 (1997).

60 [0007] La versión humanizada recombinante del anticuerpo contra HER2 murino 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, trastuzumab o HERCEPTIN®; Patente de Estados Unidos No. 5.821.337) es clínicamente activa en paciente con cáncer de mama metastático que sobreexpresan HER2 que han recibido una terapia anti-cáncer extensa previa (Baselga et al., *J. Clin. Oncol.* 14: 737-744 (1996)). El trastuzumab recibió la aprobación de comercialización de la Administración de Alimentación y Fármacos el 25 de septiembre de 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastático cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2. En noviembre del 2006, la PDA
65

aprobó el HERCEPTIN® (trastuzumab) como parte de una pauta de tratamiento que contiene doxorubicina, ciclofosfamida y paclitaxel, para el tratamiento adyuvante de pacientes con cáncer de mama positivo en HER2 y positivo en nódulos. Véase también, Press et al., *Cancer Res.* 53:4960-4970 (1993); Baselga et al., *Cancer Res.* 58:2825-2831 (1998); Pegram et al., *Proc. Am. Assoc. Cancer* 38:602 (1997), Abstract 4044; Slamon et al., *N. Engl. J. Med.* 344:783-792 (2001); Lee et al., *Nature* 378:394-396 (1995); Romond et al., *N. Engl. J. Med.* 353:1673-1684 (2005); Ta-Chiu et al., *J. Clin. Oncol.* 7811-7819 (2005).

[0008] Se han descrito otros anticuerpos contra HER2 con varias propiedades en Tagliabue et al. *Int. J. Cancer* 47: 933-937 (1991); McKenzie et al. *Oncogene* 4: 543-548 (1989); Maier et al. *Cancer Res.* 51: 5361-5369 (1991); Bacus et al. *Molecular Carcinogenesis* 3: 350-362 (1990); Stancovski et al. *PNAS (USA)* 88: 8691-8695 (1991); Bacus et al. *Cancer Research* 52: 2580-2589 (1992); Xu et al. *Int. J. Cancer* 53: 401-408 (1993); WO94/00136; Kasprzyk et al. *Cancer Research* 52: 2771-2776 (1992); Hancock et al. *Cancer Res.* 51: 4575-4580 (1991); Shawver et al. *Cancer Res.* 54: 1367-1373 (1994); Arteaga et al. *Cancer Res.* 54: 3758-3765 (1994); Harwerth et al. *J. Biol. Chem.* 267: 15160-15167 (1992); Patente de Estados Unidos No. 5.783.186; y Klapper et al. *Oncogene* 14: 2099-2109 (1997).

[0009] Entre las publicaciones de patentes adicionales relacionadas con los anticuerpos contra HER se incluyen: US 5,677,171, US 5,720,937, US 5,720,954, US 5,725,856, US 5,770,195, US 5,772,997, US 6,165,464, US 6,387,371, US 6,399,063, US2002/0192211A1, US6,015,567, US 6,333,169, US 4,968,603, US 5,821,337, US 6,054,297, US 6,407,213, US 6,719,971, US 6,800,738, US2004/0236078A1, US 5,648,237, US 6,267,958, US 6,685,940, US 6,821,515, WO98/17797 US 6,127,526, US6,333,398, US 6,797,814, US 6,339,142, US 6,417,335, US 6,489,447, WO99/31140, US2003/0147884A1, US2003/0170234A1, US2005/0002928A1, US 6,573,043, US2003/0152987A1, WO99/48527 US2002/0141993A1, WO01/00245, US2003/0086924, US2004/0013667A1, WO00/69460, WO01/00238, WO01/15730, US 6,627,196B1, US6,632,979B1, WO01/00244, US2002/0090662A1, WO01/89566, US2002/0064785, US2003/0134344, WO04/24866, US2004/0082047, US2003/0175845A1, WO03/087131, US2003/0228663, WO2004/008099A2, US2004/0106161, WO2004/048525, US2004/0258685A1, US 5,985,553, US 5,747,261, US 4,935,341, US 5,401,638, US 5,604,107, WO 87/07646, WO 89/10412, WO 91/05264, EP 412,116 B1, EP 494,135 B1, US 5,824,311, EP 444,181 B1, EP 1,006,194 A2, US 2002/0155527A1, WO 91/02062, US 5,571,894, US 5,939,531, EP 502,812 B1, WO 93/03741, EP 554,441 B1, EP 656,367 A1, US 5,288,477, US 5,514,554, US 5,587,458, WO 93/12220, WO 93/16185, US 5,877,305, WO 93/21319, WO 93/21232, US 5,856,089, WO 94/22478, US 5,910,486, US 6,028,059, WO 96/07321, US 5,804,396, US 5,846,749, EP 711,565, WO 96/16673, US 5,783,404, US 5,977,322, US 6,512,097, WO 97/00271, US 6,270,765, US 6,395,272, US 5,837,243, WO 96/40789, US 5,783,186, US 6,458,356, WO 97/20858, WO 97/38731, US 6,214,388, US 5,925,519, WO 98/02463, US 5,922,845, WO 98/18489, WO 98/33914, US 5,994,071, WO 98/45479, US 6,358,682 B1, US 2003/0059790, WO 99/55367, WO 01/20033, US 2002/0076695 A1, WO 00/78347, WO 01/09187, WO 01/21192, WO 01/32155, WO 01/53354, WO 01/56604, WO 01/76630, WO02/05791, WO 02/11677, US 6,582,919, US2002/0192652A1, US 2003/0211530A1, WO 02/44413, US 2002/0142328, US 6,602,670 B2, WO 02/45653, WO 02/055106, US 2003/0152572, US 2003/0165840, WO 02/087619, WO 03/006509, WO03/01207 WO 03/028638, US 2003/0068318, WO 03/041736, EP 1,357,132, US 2003/0202973, US 2004/0138160, US 5,705,157, US 6,123,939, EP 616,812 B1, US 2003/0103973, US 2003/0108545, US 6,403,630 B1, WO 00/61145, WO 00/61185, US 6,333,348 B1, WO 01/05425, WO 01/64246, US 2003/0022918, US 2002/0051785 A1, US 6,767,541, WO 01/76586, US 2003/0144252, WO 01/87336, US 2002/0031515 A1, WO 01/87334, WO 02/05791, WO 02/09754, US 2003/0157097, US 2002/0076408, WO 02/055106, WO 02/070008, WO 02/089842 y WO 03/86467.

[0010] La publicación de la solicitud de US No. 2005010 (publicada el 12 de mayo de 2005) y su homóloga PCT, WO 20054432, se refieren a un método para el tratamiento de cáncer, que incluyen cáncer de pulmón, cáncer de hueso y cáncer de ovario, con una combinación de un ligando ErbB2 y un anticuerpo contra ErbB.

[0011] La publicación de la solicitud de US No. 20050119288 (publicada el 2 de junio de 2005) y su homóloga PCT, WO 200516347, se refieren a un método para el tratamiento de la sobreexpresión del receptor erbB2 mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer inhibidor del receptor erbB2; y posteriormente, después de un intervalo que comprende menos de 24 horas, de una a seis cantidades terapéuticamente eficaces de un segundo inhibidor del receptor erbB2.

[0012] WO 2006026313, publicada el 9 de marzo 2006, se refiere a un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración de 4-quinazolinaminas, que son inhibidores duales de EGFR y ErbB2, en combinación con por lo menos otro inhibidor de la familia de ErbB.

[0013] El HERCEPTIN® (trastuzumab) proporciona ventajas clínicas para un amplio porcentaje de pacientes diagnosticados con cáncer de mama positivo en HER2, tanto solo como en el sistema con adyuvante, en combinación con quimioterapia. Sin embargo, un número significativo de pacientes positivos en HER2 muestra una resistencia primaria o resistencia adquirida al tratamiento con trastuzumab. Por lo tanto, existe una gran necesidad de identificar genes que pudieran estar implicados en la resistencia al tratamiento con trastuzumab y otros anticuerpos contra HER2.

[0014] El Pertuzumab (también conocido como anticuerpo monoclonal humano recombinante 2C4; OMNITARG™, Genentech, Inc, South San Francisco) representa el primer en una nueva clase de agentes conocidos como

inhibidores de la dimerización de HER (HDI) y funciona para inhibir la capacidad de HER2 para formar heterodímeros activos con otros receptores de HER (tal como EGFR/HER1, HER3 y HER4) y es activo independientemente de los niveles de expresión de HER2. Véase, por ejemplo, Harari y Yarden Oncogene 19:6102-14 (2000); Yarden and Sliwkowski. Nat Rev Mol Cell Biol 2:127-37 (2001); Sliwkowski Nat Struct Biol 10:158-9 (2003); Cho et al. Nature 421:756-60 (2003); and Malik et al. Pro Am Soc Cancer Res 44:176-7 (2003).

[0015] El bloqueo del pertuzumab en la formación de heterodímeros HER2-HER3 en células tumorales se ha demostrado para inhibir la señalización celular crítica, lo cual da lugar a una proliferación tumoral y supervivencia reducidas (Agus et al. Cancer Cell 2:127-37 (2002)).

[0016] El Pertuzumab se ha experimentado como un agente individual en la fase clínica la en pacientes con cáncer avanzado y en la fase II en pacientes con cáncer de ovario y cáncer de mama, así como cáncer de pulmón y próstata. En un estudio en fase I, los pacientes con tumores sólidos incurables, localmente avanzados, recurrentes o metastásicos, que habían progresado durante o después de la terapia estándar se trataron con pertuzumab administrado intravenosamente cada 3 semanas. El pertuzumab en general se toleró bien. La regresión tumoral se consiguió en 3 de 20 pacientes evaluados para la respuesta. Dos pacientes confirmaron respuestas parciales. La enfermedad estable que duraba más de 2,5 meses se observó en 6 de 21 pacientes (Agus et al. Pro Am Soc Clin Oncol 22:192 (2003)). En dosis de 2,0-15 mg/kg, la farmacocinética del pertuzumab era lineal y la depuración media variaba de 2,69 a 3,74 mL/día/kg y la vida media de eliminación terminal promedio variaba de 15,3 a 27,6 días. No se detectaron anticuerpos para pertuzumab (Allison et al. Pro Am Soc Clin Oncol 22:197 (2003)).

Diagnóstico

[0017] Los pacientes tratados con el anticuerpo contra HER2 trastuzumab se seleccionan para la terapia basada en la sobreexpresión/amplificación de HER2. Véase, por ejemplo, WO99/31140 (Paton et al.), US2003/0170234A1 (Hellmann, S.), y US2003/0147884 (Paton et al.); así como WO01/89566, US2002/0064785, y US2003/0134344 (Mass et al.). Véase, también, patente de Estados Unidos No. 6,573,043, patente de Estados Unidos No. 6,905,830, y US2003/0152987, Cohen et al., referente a inmunohistoquímica (IHC) y hibridación fluorescente in situ (FISH) para detectar la sobreexpresión y amplificación de HER2.

[0018] WO2004/053497 y US2004/024815A1 (Bacus et al.), así como US 2003/0190689 (Crosby y Smith), se refieren a determinar o predecir la respuesta a terapia con trastuzumab. US2004/013297A1 (Bacus et al.) se refiere a la determinación o predicción de la respuesta a la terapia con anticuerpo contra EGFR ABX0303. WO2004/000094 (Bacus et al.) se refiere a determinar la respuesta a GW572016, una molécula pequeña, inhibidor de la tirosina quinasa EGFR-HER2. WO2004/063709, Amler et al., se refiere a biomarcadores y métodos para determinar la sensibilidad al inhibidor de EGFR, erlotinib HCl. US2004/0209290 y WO04/06558, Cobleigh et al., se refieren a marcadores de expresión génica para pronóstico del cáncer de mama. Véase, también, WO03/078662 (Baker et al.), y WO03/040404 (Bevilacqua et al.). WO02/44413 (Danenber, K.) se refiere a la determinación de la expresión génica de EGFR y HER2 para determinar una pauta quimioterapéutica.

[0019] Los pacientes tratados con pertuzumab se pueden seleccionar para terapia en base a la activación o dimerización de HER. Las publicaciones de patentes referidas a pertuzumab y la selección de pacientes para la terapia con el mismo incluyen: patente de Estados Unidos No. 6,949,245, WO01/00245, US2005/0208043, US2005/0238640, US2006/0034842, y US2006/0073143 (Adams et al.); US2003/0086924 (Sliwkowski, M.); US2004/0013667A1 (Sliwkowski, M.); así como WO2004/008099A2, y US2004/0106161 (Bossennaier et al.).

[0020] Cronin et al. Am. J. Path. 164(1): 35-42 (2004) describe la medición de expresión génica en tejidos embebidos en parafina latentes. Ma et al. Cancer Cell 5:607-616 (2004) describen el perfil génico mediante microarray de oligonucleótidos de genes utilizando ARN aislado de secciones de tejido tumoral tomadas de biopsias primarias latentes.

[0021] El documento WO 2005/044091 da a conocer un procedimiento para predecir la probabilidad de respuesta del tumor que sobreexpresa ErbB2 al tratamiento con un agente de reconocimiento de ErbB2 mediante la evaluación de la expresión de PTEN.

Descripción resumida de la invención

[0022] La presente invención es como se define en la reivindicación 1. El sujeto es un paciente de cáncer de mama humano diagnosticado con un tumor de mama que expresa HER2.

[0023] En varias realizaciones, el diagnóstico incluye la cuantificación del nivel de expresión de HER2, tal como mediante inmunohistoquímica (IHC) y/o hibridación fluorescente in situ (FISH).

[0024] En otras realizaciones, el cáncer expresa HER2 por lo menos a un nivel de 1+, o por lo menos a un nivel de 2+, o a un nivel de 3+.

[0025] En aún otra realización, el cáncer es cáncer de mama metastásico.

[0026] El inhibidor de HER2 puede ser un agente que interfiere con la activación o función de HER2.

5 [0027] Los inhibidores de HER 2 incluyen, sin limitación, anticuerpos contra HER y fragmentos de anticuerpo, antagonistas de HER2 de molécula pequeña, inhibidores de tirosina quinasa HER2, y moléculas antisentido.

[0028] En una realización, el inhibidor de HER2 es un anticuerpos o fragmento de anticuerpo contra HER2, o una molécula que se une e inhibe el receptor de HER2.

10 [0029] En varias realizaciones, el anticuerpo contra HER2 puede inhibir la escisión del ectodominio de HER2, puede bloquear la activación por ligando de un receptor de HER2, o puede inhibir la dimerización de HER2.

[0030] En otra realización, el anticuerpo contra HER2 se une al sitio de unión heterodimérica de HER2.

15 [0031] En otra realización, el anticuerpos o fragmento de anticuerpo contra HER2 se une al epítipo 4D5 y, por ejemplo, se puede seleccionar del grupo que consiste en anticuerpos humanizados huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y trastuzumab, y fragmentos de los mismos.

20 [0032] En una realización preferida, el anticuerpo contra HER2 es trastuzumab o un fragmento del mismo.

[0033] En una realización adicional, el anticuerpo contra HER2 bloquea la activación a ligando de un receptor de HER2 de manera más eficaz que el trastuzumab.

25 [0034] En una realización diferente, el anticuerpo contra HER2 se une al epítipo 2C4 y puede ser, por ejemplo, pertuzumab o un fragmento del mismo.

[0035] En varias realizaciones, la muestra biológica es una muestra de tumor, tal como una muestra es de una muestra fijada de tejido de cáncer embebido en cera de un paciente.

30 [0036] En otra realización, la muestra de tumor es un tejido de biopsia central.

[0037] También se describe en el presente documento un grupo o matriz que comprende polinucleótidos que se hibridan a dos o más, o por lo menos tres, o por lo menos 5 de los siguientes genes: CDK11, DYRK1A, LATS2, STK10, Wee1, DUSP4, DUSP6, HIPK3, JNK, MAP4K4, PTPN11, Socs5, PPM1H, DKFZP586B16, DGK1, FLJ35107, FLT1, HK2, ITK, MOAP1, KIAA0685, KIAA1639, LIM/PDLIM5, PANK1, P14K2B, PPP2R1A, PRKWNK3, RYK, SPEC2, STK22C, STYK1, y TXND3. El grupo o matriz puede comprender polinucleótidos que se hibridan a todos los siguientes genes: CDK11, DYRK1A, LATS2, STK10, Wee1, DUSP4, DUSP6, HIPK3, JNK, MAP4K4, PTP11, Socs5, PPM1H, DKFZP586B16, DGKI, FLJ35107, FLT1, HK2, ITK, MOP1, KIAA0685, KIAA1639, LIM/PDL1M5, PANK1, P14K2B, PPP2R1A, PRKWNK3, RYK, SPEC2, STK22C, STYK1, y TXND3.

[0038] El grupo o matriz puede comprender polinucleótidos que se hibrida a los siguientes genes: DYRK1A, HK2, Socs5, STK10, Kiaa1639, y MAP4K4. El grupo o matriz puede comprender polinucleótidos que se hibridan a los siguientes genes: PTPN11, KIAA0685, y PPM1H.

45 **Breve descripción de los dibujos**

[0039]

50 Figura 1. Medición de la respuesta a trastuzumab de la línea celular BT474 amplificada por HER2 mediante el ensayo de incorporación de ³H-timidina.

Figura 2. Refinado de cribado HTP adicional mediante experimentos pilotos automáticos. NTC = control no marcado (negativo).

55 Figura 3. Optimización del factor Z del coeficiente de la ventana de cribado.

Figura 4. Resumen del cribado de resistencia a trastuzumab.

Figura 5. Análisis estadístico.

60 Figura 6. El análisis de datos mediante la representación de valores iniciales del cribado mostró que p27 es un valor hallado de 4 oligos.

Figura 7. Análisis combinado de los valores hallados de la biblioteca de quinasas.

65 Figura 8. Resultados del cribado de la biblioteca de quinasas.

- Figura 9. Desarrollo del cribado secundario.
- Figura 10. Análisis combinado de los cribados.
- 5 Figura 11. Resumen del cribado de la biblioteca de fosfatasa.
- Figura 12. Datos de expresión de GeneLogic.
- 10 Figura 13. Valores hallados máximos en base al fenotipo más fuerte y valor hallado de >2 oligos.
- Figura 14. Ensayo de captación de ³H-timidina después de 72 horas de tratamiento con trastuzumab en la línea celular BT474, con y sin la eliminación de genes candidatos.
- 15 Figura 15. Ensayo de captación de ³H-timidina después de 72 horas de tratamiento con trastuzumab en la línea celular BT474.
- Figura 16. Ensayo de captación de ³H-timidina de la línea celular BT474M después de 72 horas de tratamiento con trastuzumab y ensayos luminiscentes de títulos de células después de 7 días de tratamiento con trastuzumab.
- 20 Figura 17. Ensayo de captación de ³H-timidina de múltiples líneas celulares de cáncer de mama amplificadas por HER2 mediante un rango de dosis del tratamiento con Lapatinib durante 72 horas.
- Figura 18. Hibridación western para examinar el nivel de fosforilación y el nivel total de HER3 en BT474 después del tratamiento con trastuzumab con el tiempo (parte superior). ELISA de fosfo-Akt y ELISA de Akt total para medir Akt1 en la línea celular BT474 después del tratamiento con trastuzumab con el tiempo (parte inferior).
- 25 Figura 19. ELISA de fosfo-Akt y ELISA de Akt total para medir Akt1 en células BT474 después del tratamiento con trastuzumab con el tiempo.
- 30 Figura 20. Cladograma – miembros de la familia de PPM1. La similitud de la secuencia de aminoácidos relativa entre otros miembros de la familia de tipo PP2C y PPM1H mediante la alineación de la secuencia de aminoácidos de la familia y análisis mediante el programa informático de clúster W.
- 35 Figura 21. Ensayo de captación de ³H-timidina después de 72 horas de tratamiento con trastuzumab en la línea celular BT474 con y sin la eliminación de miembros de la familia PP2C estrechamente relacionados PPM1H, PPM1J, PPM1M.
- Figura 22. Ensayo de captación de ³H-timidina de una línea celular de mama amplificada con HER2, HCC1419, por un intervalo de la dosis del tratamiento con Lapatinib durante 72 horas con y sin la eliminación de miembros de la familia PP2C estrechamente relacionados PPM1H y PPM1M.
- 40 [0040] Tabla 1. Lista de marcadores identificados de resistencia a trastuzumab.
- 45 [0041] Tabla 2. Resumen de los datos de expresión en líneas celulares de tipo basal y tumores.
- [0042] Tabla 3. Números de acceso de los marcadores identificados en el presente documento.+
- 50 Descripción detalla de la realización preferida
- Definiciones
- [0043] A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, NY 1992), proporcionan un experto en la materia una guía general para muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.
- 55 [0044] Un experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que podrían utilizarse en la práctica de la presente descripción. Para los objetivos de la presente invención, a continuación se definen los siguientes términos.
- 60 [0045] Un “receptor de HER” o “HER” es un receptor de proteína tirosina quinasa que pertenece a la familia de receptores de HER e incluye receptores EGFR (ErbB1, HER1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4). El receptor de HER comprenderá generalmente un dominio extracelular, que se puede unir a un ligando de HER y/o
- 65

dimerizar con otra molécula receptora HER; un dominio transmembrana lipofílico; un dominio tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxi terminal que alberga varios residuos de tirosina que se pueden fosforilar. El receptor de HER puede ser una receptor de HER de "secuencia nativa" o una "variante en la secuencia de aminoácidos" del mismo. Preferiblemente, el receptor de HER es un receptor de HER humano de secuencia nativa. De este modo, el término "HER", tal como se utiliza aquí, comprenderá HER1, HER2, HER3 y HER4.

[0046] Los términos "ErbB1", "HER1", "receptor del factor de crecimiento epidérmico" y "EGFR" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a EGFR tal como se describe, por ejemplo, en Carpenter et al. Ann. Rev. Biochem. 56. 881-914 (1987), incluyendo formas mutantes naturales del mismo (por ejemplo, un EGFR mutante por delección como en Ullrich et al, Nature (1984) 309:418425 y Humphrey et al. PNAS (USA) 87: 4207-4211 (1990)), así como variantes de los mismos, tales como EGFRvIII. Las variantes de EGFR también incluyen variantes por delección, sustitución e inserción, por ejemplo, las descritas en Lynch et al (New England Journal of Medicine 2004, 350:2129), Paez et al (Science 2004, 304:1497), y Pao et al (PNAS 2004, 101:13306).

[0047] Las expresiones "ErbB2" y "HER2" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a proteína HER2 humana descritas, por ejemplo, en Semba et al., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985) y Yamamoto et al. Nature 319:230-234 (1986) (GenBank número de acceso X03363). El término "*erbB2*" se refieren al gen que codifica la HER2 humana y "neu" se refiere al gen que codifica p185^{neu} de rata. La HER2 preferida es la HER2 humana de secuencia nativa.

[0048] En el presente documento, "dominio extracelular de HER2" o "ECD de HER2" se refieren a un dominio de HER2 que está fuera de la célula, anclado a una membrana celular o en circulación, que incluye fragmentos de la misma. En una realización, el dominio extracelular de HER2 puede comprender cuatro dominios: "Dominio I" (residuos de aminoácidos de aproximadamente 1-195, "Dominio II" (residuos de aminoácidos de aproximadamente 196-319), "Dominio III" (residuos de aminoácidos de aproximadamente 320-488), y "Dominio IV" (residuos de aminoácidos de aproximadamente 489-630) (numeración de residuos sin péptido señal). Véase Garrett et al. Mol. Cell. 11: 495-505 (2003), Cho et al. Nature 421: 756-760 (2003), Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004), y Plowman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1746-1750 (1993), así como la figura 1 en el presente documento.

[0049] "ErbB3" y "HER3" se refieren al polipéptido receptor tal como se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5,183,884 y 5,480,968, así como Kraus et al. PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989).

[0050] Los términos "ErbB4" y "HER4" se refieren aquí al polipéptido receptor tal como se describe, por ejemplo, en la Solicitud de patente EP No. 599.274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1746-1750 (1993); y Plowman et al., Nature 366: 473-475 (1993), incluyendo isoformas de los mismos, por ejemplo, tal como se describe en WO99/19488, publicada el 22 de abril de 1999.

[0051] Por "ligando de HER" se entiende un polipéptido que se une y/o activa un receptor de HER. El ligando de HER de particular interés en el presente documento es un ligando de HER humano de secuencia nativa, tal como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Savage et al., J. Biol. Chem. 247: 7612-7621 (1972)); factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) (Marquardt et al., Science 223: 1079-1082 (1984)); anfiregulina también conocida como schwannoma o factor de crecimiento autocrino de queratinocitos (Shoyab et al. Science 243: 1074-1076 (1989); Kimura et al. Nature 348: 257-260 (1990); y Cook et al. Mol. Cell. Biol. 11: 2547-2557 (1991)); betacelulina (Shing et al., Science 259: 1604-1607 (1993); y Sasada et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 190: 1173 (1993)); factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) (Higashiyama et al., Science 251: 936-939 (1991)); epiregulina (Toyoda et al., J. Biol. Chem. 270: 7495-7500 (1995); y Komurasaki et al. Oncogene 15: 2841-2848 (1997)); una heregulina (ver a continuación); neuregulina-2 (NRG-2) (Carraway et al., Nature 387: 512-516 (1997)); neuregulina-3 (NRG-3) (Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 9562-9567 (1997)); neuregulina-4 (NRG-4) (Harari et al. Oncogene 18: 2681-89 (1999)) y cripto (CR-1) (Kannan et al. J. Biol. Chem. 272 (6): 3330-3335 (1997)). Los ligandos de HER que se unen a EGFR incluyen EGF, TGF- α , anfiregulina, betacelulina, HB-EGF y epiregulina. Los ligandos de HER que se unen a HER3 incluyen heregulinas. Los ligandos de HER capaces de unirse a HER4 incluyen betacelulina, epiregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 y heregulinas.

[0052] "Heregulina" (HRG) cuando se utiliza en el presente documento se refiere a un polipéptido codificado por el producto génico de heregulina tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5,641,869 o Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993). Ejemplos de heregulinas incluyen heregulina- α , heregulina- β 1, heregulina- β 2 y heregulina- β 3 (Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); y la Patente de Estados Unidos No. 5.641.869); factor de diferenciación *neu* (NDF) (Peles et al. Cell 69: 205-216 (1992)); actividad inductora del receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls et al. Cell 72:801-815 (1993)); factores de crecimiento glial (GGFs) Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993); factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho et al. J. Biol. Chem. 270:14523-14532 (1995)); γ -heregulina (Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997)).

[0053] Un "dímero de HER" en el presente documento es un dímero no asociado covalentemente que comprende por lo menos dos receptores de HER diferentes. Dichos complejos pueden formarse cuando una célula que expresa

dos o más receptores de HER se expone a un ligando de HER y se puede aislar mediante inmunoprecipitación y analizarse mediante SDS-PAGE tal como se describe en Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20): 14661-14665 (1994), por ejemplo. Otras proteínas, tales como la subunidad de receptor de citoquina (por ejemplo, gp130) se puede asociar con el dímero. Preferiblemente, el dímero de HER comprende HER2.

5 [0054] Un "heterodímero de HER" en el presente documento es un heterodímero no asociado covalentemente que comprende por lo menos dos receptores de HER diferentes, tales como los heterodímeros EGFR-HER2, HER2-HER3 o HER2-HER4.

10 [0055] Un "inhibidor de HER" es un agente que interfiere con la activación o la función de HER. Entre los ejemplos de HER se incluyen anticuerpos contra HER (por ejemplo, anticuerpos EGFR, HER2, HER3, o HER4); fármacos dirigidos a EGFR; anatógonistas de HER de molécula pequeña; inhibidores de tirosina quinasa de HER; inhibidores de tirosina quinasa duales de HER2 y EGFR, tales como lapatinib/GW572016; moléculas antisentido (véase, por ejemplo, WO2004/87207); y/o agentes que se unen a, o interfieren con la función de, las moléculas de señalización cascada abajo, tales como MAPK o Akt. Preferiblemente, el inhibidor de HER es un anticuerpo o molécula pequeña que se une a un receptor de HER. El término "inhibidor de HER" incluye específicamente inhibidores de HER1, HER2, HER3 y HER4. De este modo, por ejemplo, un inhibidor de HER2 es un agente que interfiere con la activación o la función de HER2, incluyendo anticuerpos, anatógonistas de HER2 de molécula pequeña, inhibidores de tirosina quinasa de HER2, inhibidores de tirosina quinasa duales de HER2 y EGFR, moléculas antisentido, y similares.

20 [0056] Un "inhibidor de la dimerización de HER" o "HDI" es un agente que inhibe la formación de un homodímero de HER o heterodímero de HER. Preferiblemente, el inhibidor de la dimerización de HER es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo que se une a HER2 en el sitio de unión heterodimérico del mismo. Sin embargo, los inhibidores de la dimerización de HER también incluyen moléculas pequeñas peptídicas y no peptídicas y otras entidades químicas que inhiben la formación de homodímeros y heterodímeros de HER. El inhibidor de la dimerización de HER más preferido en el presente documento es pertuzumab o MAb 2C4. La unión de 2C4 al sitio de unión heterodimérica de HER2 se muestra en la figura 4. Otros ejemplos de inhibidores de la dimerización de HER incluyen anticuerpos que se unen a EGFR e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de otros receptores de HER (por ejemplo, anticuerpo monoclonal de EGFR 806, MAb 806, que se une a EGFR activado o "no unido"; véase Johns et al., J Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)); anticuerpos que se unen a HER3 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de otros receptores de HER; anticuerpos que se unen a HER4 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de otros receptores de HER; inhibidores de la dimerización de péptidos (patente de Estados Unidos No. 6,417,168); inhibidores de la dimerización antisentido; etc.

30 [0057] Un "inhibidor de la dimerización de HER2" en el presente documento es un anticuerpo contra HER2 u otro anatógonista de HER2, tal como una molécula pequeña peptídica o no peptídica, que se une a HER2 e interfiere con la formación de oligómeros que contienen HER2, incluyendo homodímeros y heterodímeros de HER2, tales como uno o más de los heterodímeros HER2-HER2, HER2-EGFR, HER2-HER3 y HER2-HER4. Preferiblemente, el inhibidor de la dimerización de HER2 es una molécula, tal como un anticuerpo contra HER2 o una molécula pequeña peptídica o no peptídica, que bloquea la formación de todos los heterodímeros HER2-HER2, HER2-EGFR y HER2-HER3, por ejemplo mediante la unión a HER2 e un punto requerido para la heterodimerización, tal como el sitio de unión heterodimérica mostrado en la figura 4. Un representante habitual de dichos inhibidores de la dimerización de HER2 es pertuzumab, que también se indica como "inhibidor de la dimerización de HER" en un sentido más amplio.

40 [0058] Un "anticuerpo contra HER" es un anticuerpo que se une a un receptor de HER. Opcionalmente, el anticuerpo contra HER interfiere además con la activación o la función de HER. Preferiblemente, el anticuerpo contra HER se une al receptor de HER2. Un anticuerpo contra HER2 de particular interés en el presente documento es trastuzumab. Otro ejemplo de anticuerpo contra HER2 es pertuzumab.

50 [0059] La "activación de HER" se refiere a la activación o fosforilación de cualquiera de uno o más receptores de HER. En general, la activación de HER da lugar a la transducción de señales (por ejemplo, la causada por un dominio quinasa intracelular de un receptor de HER que fosforila residuos de tirosina en el receptor de HER o un polipéptido sustrato). La activación de HER puede estar mediada por la unión del ligando HER a un dímero de HER que comprende el receptor de HER de interés. La unión del ligando de HER a un dímero de HER puede activar un dominio quinasa de uno o más de los receptores de HER y/o la fosforilación de residuos de tirosina en polipéptidos sustrato adicionales, tales como quinasas intracelulares Akt o MAPK.

60 [0060] La "fosforilación" se refiere a la adición de uno o más grupos fosfato a una proteína, tal como un receptor de HER, o un sustrato del mismo.

65 [0061] Un anticuerpo que "inhibe la dimerización de HER" es un anticuerpo que inhibe, o interfiere con, la formación de un dímero de HER, independientemente del mecanismo subyacente. Preferiblemente, dicho anticuerpo se une a HER2 en el sitio de unión heterodimérica del mismo. El anticuerpo inhibidor de la dimerización más preferido en el presente documento es pertuzumab o MAb 2C4. La unión de 2C4 al sitio de unión heterodimérica de HER2 se

muestra en la figura 4. Otros ejemplos de anticuerpos que inhiben la dimerización de HER incluyen anticuerpos que se unen a EGFR e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de otros receptores de HER (por ejemplo, anticuerpo monoclonal de EGFR 806, MAb 806, que se une a EGFR activado o "no unido"; véase Johns et al., J Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)); anticuerpos que se unen a HER3 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de otros receptores de HER; y anticuerpos que se unen a HER4 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de otros receptores de HER

[0062] Un anticuerpo que "bloquea la activación por ligando de un receptor de HER de manera más eficaz que el trastuzumab" es aquel que reduce o elimina la activación por el ligando de HER del receptor o receptores de HER o el dímero o dímeros de HER de manera más eficaz (por ejemplo, como mínimo, aproximadamente 2 veces más eficaz) que el trastuzumab. Preferiblemente, dicho anticuerpo bloquea la activación por ligando de HER de un receptor de HER como mínimo aproximadamente de manera tan eficaz como un anticuerpo monoclonal murino 4D5 o un fragmento Fab del mismo, o como trastuzumab o como un fragmento Fab del mismo. Se puede evaluar la capacidad de un anticuerpo contra bloquear la activación por ligando de un receptor de HER mediante el estudio de dímeros de HER directamente o mediante la evaluación de la activación de HER, o la señalización cascada abajo, que resulta de la dimerización de HER, y/o mediante la evaluación del sitio de unión anticuerpo-HER2, etc. Los ensayos de cribado de anticuerpos con la capacidad de inhibir la activación por ligando de un receptor de HER de manera más eficaz que el trastuzumab se describen en Agus et al. Cancer Cell 2: 127-137 (2002) y la patente de Estados Unidos No. 6,949,245 (Adams et al.). A modo de ejemplo sólo, se puede analizar: la inhibición de la formación de dímeros de HER (véase, por ejemplo, figuras 1A-B de Agus et al. Cancer Cell 2: 127-137 (2002); y patente de Estados Unidos No. 6,949,245); reducción en la activación por ligando de HER de células que expresan dímeros de HER (patente de Estados Unidos No. 6,949,245 y figuras 2A-B de Agus et al. Cancer Cell 2: 127-137 (2002), por ejemplo); bloqueo de la unión de ligando de HER a células que expresan dímeros de HER (patente de Estados Unidos No. 6,949,245, y la figura 2E de Agus et al. Cancer Cell 2: 127-137 (2002), por ejemplo); inhibición del crecimiento celular de células cancerosas (por ejemplo, células MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D) que expresan dímeros de HER en presencia (o ausencia) del ligando de HER (patente de Estados Unidos No. 6,949,245 y las figuras 3A-D de Agus et al. Cancer Cell 2: 127-137 (2002), por ejemplo); inhibición de la señalización en cascada (por ejemplo, inhibición de la fosforilación de AKT dependiente de HRG o la inhibición de la fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF α) (véase, patente de Estados Unidos No. 6,949,245, y figuras 2C-D de Agus et al. Cancer Cell 2: 127-137 (2002), por ejemplo). También se puede evaluar si el anticuerpo inhibe la dimerización de HER mediante el estudio del sitio de unión anticuerpo-HER2, por ejemplo, mediante la evaluación de una estructura o modelo, tal como una estructura cristalina, del anticuerpo unido a HER2 (véase, por ejemplo, Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)).

[0063] Un "sitio de unión heterodimérica" en HER2 se refiere a una región en el dominio extracelular de HER2 que pone en contacto, o interfiere con, una región en el dominio extracelular de EGFR, HER3 o HER4 tras la formación de un dímero con el mismo. La región se encuentra en el Dominio II de HER2. Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004).

[0064] El anticuerpo contra HER2 puede "inhibir la fosforilación de AKT dependiente de HRG" y/o inhibir "la fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF α " de manera más efectiva (por ejemplo, como mínimo, 2 veces más eficaz) que el trastuzumab (véase Agus et al. Cancer Cell 2: 127-137 (2002) y WO01/00245, a modo de ejemplo).

[0065] El anticuerpo contra HER2 puede ser aquel que, como el pertuzumab, "no inhibe la separación del ectodominio de HER2" (Molina et al. Cancer Res. 61:4744-4749(2001)). Por otro lado, el trastuzumab puede inhibir la separación del ectodominio de HER2. De este modo, el anticuerpo contra HER2 puede ser aquel que, como el trastuzumab, inhibe la separación del ectodominio de HER2.

[0066] Un anticuerpo contra HER2 que se "une a un sitio de unión heterodimérica" de HER2, se une a residuo en el dominio II (y opcionalmente también se une a residuos en otros de los dominios del dominio extracelular de HER2, tales como los dominios I y III), y puede impedir estéricamente, como mínimo en cierto grado, la formación de un heterodímero HER2-EGFR, HER2-HER3, o HER2-HER4. Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004) caracterizan la estructura cristalina de HER2-pertuzumab, depositada con la RCSB Protein Data Bank (ID Code IS78), que ilustra un anticuerpo contra ejemplo que se une al sitio de unión heterodimérica de HER2.

[0067] Un anticuerpo que "se une al dominio II" de HER2 se une a los residuos en el dominio II y opcionalmente los residuos en otros dominios de HER2, tales como los dominios I y III. Preferiblemente, el anticuerpo que se une al dominio II se une a la unión entre los dominios I, II y III de HER2.

[0068] En el presente documento "tiempo para la progresión de la enfermedad" o "TTP" se refieren al tiempo, generalmente medido en semanas o meses, desde el tiempo del tratamiento inicial hasta que el cáncer progresa o empeora. Dicha progresión se puede evaluar por el médico experto.

[0069] Por "TTP extensivo" se entiende el incremento del tiempo para el progreso de la enfermedad en un paciente tratado en relación con un paciente no tratado.

[0070] "Supervivencia" se refiere a que el paciente permanece vivo, e incluye la supervivencia global, así como la supervivencia sin progresión.

5 [0071] "Supervivencia global" se refiere a un paciente que permanece vivo durante un periodo definido de tiempo, tal como 1 año, 5 años, etc. desde el momento de diagnóstico o tratamiento.

[0072] "Supervivencia sin progresión" se refiere al paciente que permanece vivo sin progresión de la enfermedad. Por "supervivencia extensiva" se entiende el incremento de la supervivencia global o sin progresión en un paciente tratado en relación con un paciente no tratado.

10

[0073] Una "respuesta objetiva" se refiere a una respuesta medible, que incluye una respuesta completa (CR) o una respuesta parcial (PR).

15 [0074] Por "respuesta completa" o "CR" se entiende la desaparición de todos los signos del cáncer en respuesta al tratamiento. Esto no siempre significa que el cáncer se haya curado.

[0075] "Respuesta parcial" o "PR" se refiere a una disminución en el tamaño de uno o más tumores o lesiones, o en la extensión del cáncer en el cuerpo, en respuesta al tratamiento.

20

[0076] El término "tumor refractario" o "cáncer refractario" se utiliza para referirse a tumores que no consiguen responder o son resistentes a un cierto tratamiento, tal como un tratamiento con un inhibidor de HER2, tal como un anticuerpo contra HER2, por ejemplo, trastuzumab, cuando se administra solo o en combinación con otros tratamientos contra el cáncer. Para los objetivos de este documento, los tumores refractarios también comprenden tumores que parecen inhibirse por dicho tratamiento o tratamientos, pero que reaparecen en 12 meses desde la completación de dicho tratamiento.

25

[0077] Un tumor que "responde poco" a cierto tratamiento, tal como un tratamiento con un inhibidor de HER2, tal como un anticuerpo contra HER2, por ejemplo, trastuzumab, no muestra una mejora estadísticamente significativa en respuesta a dicho tratamiento cuando se compara al no tratamiento o al tratamiento con placebo en un modelo animal reconocido o una prueba clínica humana o que responde al tratamiento inicial, pero crece a medida que continúa el tratamiento.

30

[0078] El término "evolución esperada" se utiliza para referirse a un proceso de tratamiento que un médico habitual prudente utiliza para tratar una cierta enfermedad, tal como cáncer. La evolución esperada varía dependiendo del tipo y la fase del cáncer, la condición del paciente y el historial del tratamiento, y similares, y será evidente para los expertos en la materia.

35

[0079] La "expresión" de proteínas se refiere a la conversión de la información codificada en un gen en ARN mensajero (ARNm) y a continuación en la proteína.

40

[0080] En el presente documento, una muestra o célula que "expresa" una proteína de interés (tal como un receptor de HER o un ligando de HER) es aquella en que el ARNm que codifica la proteína, incluyendo fragmentos del mismo, se determina que está presente en la muestra o la célula.

45

[0081] La frase "amplificación génica" se refiere a un proceso por el cual se forman múltiples copias de un gen o fragmento de gen en una célula o línea celular particular. La región duplicada (un tramo de ADN amplificado) se refiere a menudo como "amplicón". Habitualmente, la cantidad de ARN mensajero (ARNm) producido también incrementa en la proporción del número de copias realizadas del gen particular expresado.

50

[0082] El término "modular" se utiliza en el presente documento para indicar que se regula por incremento o se regula por descenso la expresión de un gen o el nivel de las moléculas de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades de proteínas, o actividad de una o más proteínas o subunidades de proteínas, de manera que la expresión, el nivel o actividad es superior o inferior a los observados en ausencia del modulador.

55

[0083] Los términos "inhibir", "subregular o regular por descenso", y "reducir" se utilizan indistintamente y significan que se reduce la expresión de un gen o el nivel de las moléculas de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades de proteínas, o actividad de una o más proteínas o subunidades de proteínas, en relación a uno o más controles, tales como, por ejemplo, uno o más controles positivos y/o negativos.

60

[0084] El término "sobreregular o regular por incremento" se utiliza para indicar que se eleva la expresión de un gen o el nivel de las moléculas de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades de proteínas, o actividad de una o más proteínas o subunidades de proteínas, en relación a uno o más controles, tales como, por ejemplo, uno o más controles positivos y/o negativos.

65

[0085] Un "ARN de interferencia" o "ARN de interferencia pequeño (ARNsi)" es una molécula de ARN de doble cadena normalmente inferior a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud que reduce la expresión de un gen diana. Los ARN de interferencia se pueden identificar y sintetizar utilizando métodos conocidos (Shi Y., Trends in Genetics 19(1):9-12 (2003), WO/2003056012 y WO2003064621), y bibliotecas de siRNA están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Dharmacon, Lafayette, Colorado.

[0086] Un polipéptido de "secuencia nativa" es aquel que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (por ejemplo, receptor de HER o ligando de HER) derivado de la naturaleza, incluyendo variantes naturales y alélicas. Dichos polipéptidos de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir mediante medios recombinantes o sintéticos. De este modo, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de un polipéptido humano natural, polipéptido murino o polipéptido de cualquier otra especie de mamífero.

[0087] El término "anticuerpo" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada.

[0088] El término "anticuerpo monoclonal" tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo(s), a excepción de posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando dichas variantes generalmente presentes en pequeñas cantidades. Dicho anticuerpo monoclonal incluye habitualmente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a diana de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon de una pluralidad de clones, tales como un grupo de clones de hibridoma, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que la secuencia de unión a diana seleccionada se puede alterar adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en el cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad in vivo, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada es también un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que habitualmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas en que habitualmente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo por obtenerse a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar según la presente invención, se pueden fabricar mediante un conjunto de técnicas, que incluyen, por ejemplo, el método del hibridoma descrito (por ejemplo, Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo la patente de Estados Unidos No. 4,816,567), tecnologías de expresión en fagos (véase, por ejemplo, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al. *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o de tipo humano en animales que tienen partes o todos los locus o genes de inmunoglobulina humana que codifican las secuencias de inmunoglobulinas humanas (véase, por ejemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); patentes de Estados Unidos Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,591,669 (todas de GenPharm); patente de Estados Unidos No. 5,545,807; WO 1997/17852; patentes de Estados Unidos Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016; 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 Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); y Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995)).

[0089] Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Mono del viejo Mundo, Simio, etc) y secuencias de la región constante humana, así como anticuerpos "humanizados"

[0090] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la estructura ("framework") (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

[0091] Los anticuerpos HER2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 o trastuzumab tal como se describe en la tabla 3 de la patente de Estados Unidos 5,821,337; los anticuerpos 520C9 humanizado (WO93/21319); y 2C4 humanizado, tal como pertuzumab tal como se describe en el presente documento.

[0092] Un "anticuerpo intacto" en el presente documento es aquel que comprende dos regiones de unión a antígeno, y una región Fc. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una región Fc funcional.

[0093] Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, que comprende preferiblemente la región de unión a antígeno del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diabodies; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo contra cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de un fragmento o fragmentos de anticuerpos.

[0094] "Anticuerpos nativos" son habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestos de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un puente disulfuro covalente, mientras que el número de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuros entre cadenas espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de un conjunto de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante (V_H) en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que hay residuos de aminoácidos concretos que forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y pesada.

[0095] El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de dominios variables se denominan regiones estructura ("framework") (FR). Los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas de manera próxima mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

[0096] El término "región hipervariable" cuando se utiliza en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende generalmente residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Los residuos de la "región de estructura" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se ha definido en el presente documento.

[0097] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio único de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de unión a antígeno y aún es capaz de reticular con el antígeno.

[0098] "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo una especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas de antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

[0099] El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de una serie de residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente invención para Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes transportan por lo menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos de Fab' que tienen cisteínas bisagras entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0100] Las "cadenas ligeras" de anticuerpos contra cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente diferentes, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

[0101] El término "región Fc" en el presente documento se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define normalmente por albergar desde el residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la misma. La lisina C-terminal(residuo 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede eliminar, por ejemplo, durante la producción o la purificación del anticuerpo o mediante el diseño recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos de K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin residuos K447 eliminados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

[0102] A menos que se indique lo contrario, en el presente documento la numeración de los residuos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU como en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). El "índice de EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo EU IgG1 humano.

[0103] Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Ejemplos de "funciones efectoras" incluyen la unión a C1q; la citotoxicidad dependiente de complemento; la unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por descenso de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. dichas funciones efectoras requieren generalmente que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se puede evaluar utilizando varios ensayos descritos en el presente documento, por ejemplo.

[0104] Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc hallada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos de A y no A); región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa, así como variantes naturales de los mismos.

[0105] Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa debido a por lo menos una modificación de aminoácido, preferiblemente a una o más sustituciones de aminoácido. Preferiblemente, la región Fc variante tiene por lo menos una sustitución de aminoácidos en comparación con la región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, sustituciones de uno a aproximadamente diez aminoácidos, y preferiblemente sustituciones de aproximadamente uno a aproximadamente cinco aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante poseerá preferiblemente por lo menos aproximadamente el 80% de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y lo más preferiblemente, por lo menos aproximadamente un 90% de homología con las mismas, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% de homología con las mismas.

[0106] Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden asignarse a "clases" diferentes. Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de ellas pueden dividirse a su vez en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

[0107] "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcRs) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) reconocen un anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan Fc γ RIII solo, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Para determinar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo ADCC in vitro, tal como el descrito en las patentes de Estados Unidos 5.500.362 ó 5.821.337. Células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede determinar in vivo, por ejemplo en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes et al. *PNAS (USA)*, 95:652-656 (1998).

[0108] "Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan por lo menos Fc γ RIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las células PBMCs y NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMCs, tal como se describe en el presente documento.

[0109] Los términos "receptor Fc" y "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. La FcR preferida es una FcR humana de secuencia nativa. Además, una FcR preferida es aquella que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII, y Fc γ RIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas ("spliced") de estos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un "receptor de activación") y Fc γ RIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor de activación Fc γ RIIA contiene un motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (revisado en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Los FcRs se revisan 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. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están comprendidos por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587 (1976); y Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)) y regula la homeostasis de las inmunoglobulinas.

[0110] "Citotoxicidad dependiente del complemento" y "CDC" se refieren a la capacidad de una molécula de lisar una diana en presencia del complemento. El mecanismo de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) complejado con un antígeno afín. Para determinar la activación del complemento se puede realizar un ensayo CDC, por ejemplo tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

[0111] Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios se presentan en una única cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994). Los fragmentos scFv de los anticuerpos contra HER2 se describen en WO93/16185; Patente de Estados Unidos 5.571.894 y Patente de Estados Unidos No. 5.587.458.

[0112] El término "diabodies" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H - V_L). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diabodies se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

[0113] Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo que no está conjugado a una molécula heteróloga, tal como un grupo citotóxico o radiomarcador.

[0114] Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con las utilidades de diagnóstico y terapéuticas del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos y no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95% en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0115] Un anticuerpo "madurado por afinidad" es aquel con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables del mismo que da lugar a una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee estas alteraciones. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. *BioTechnology* 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad mediante el barajado de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de residuos de CDR y/o estructural ("framework") se describe 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).

[0116] El término "especie de anticuerpo principal" en el presente documento se refiere a la estructura de anticuerpo en una composición que es la molécula de anticuerpo cuantitativamente predominante en la composición. En una realización, la especie de anticuerpo principal es un anticuerpo HER2, tal como un anticuerpo que se une al Dominio II de HER2, anticuerpo que inhibe la dimerización de HER de manera más eficaz que el trastuzumab, y/o un anticuerpo que se une a un sitio de unión heterodimérica de HER2. La realización preferente en el presente documento de la especie de anticuerpo principal es aquel que comprende las secuencias de aminoácidos de cadena ligera variable y cadena pesada variable en las SEQ ID Nos. 3 y 4, y lo más preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada en las SEQ ID Nos. 11 y 12 (pertuzumab).

[0117] Un anticuerpo "variante en la secuencia de aminoácidos" en el presente documento es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos que difiere de una especie de anticuerpo principal. Normalmente, las variantes en la secuencia de aminoácidos poseerán por lo menos aproximadamente el 70% de homología con la especie de anticuerpo principal, y preferiblemente, tendrán por lo menos aproximadamente el 80%, más preferiblemente por lo menos el 90% de homología con la especie de anticuerpo principal. Las variantes en las secuencias de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones y/o adicionales en ciertas posiciones en o adyacentes a la secuencia de aminoácidos de la especie de anticuerpo principal. Ejemplos de variantes en la secuencia de aminoácidos en el presente documento incluyen una variante ácida (por ejemplo, variante de anticuerpo desamidada), una variante básica, un anticuerpo con una extensión de secuencia líder amino-terminal (por ejemplo, VHS-) en una dos cadenas ligeras del mismo, un anticuerpo con un residuo de lisina C-terminal en una o dos cadenas pesadas del mismo, etc., e incluye combinaciones de variaciones en las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y/o ligeras. La variante de anticuerpo contra particular interés en el presente documento es el anticuerpo que comprende una extensión de la secuencia líder amino terminal en una o dos cadenas ligeras del mismo, opcionalmente que comprende además otras diferencias en las secuencias de aminoácidos y/o glicosilación en relación con la especie de anticuerpo principal.

[0118] Un anticuerpo "variante por glicosilación" en el presente documento es un anticuerpo con uno o más grupos carbohidratos unidos al mismo que difieren de uno o más grupos carbohidratos unidos a una especie de anticuerpo principal. Ejemplos de variantes por glicosilación en el presente documento incluyen el anticuerpo con una estructura de oligosacárido G1 o G2, en lugar de la estructura de oligosacárido G0, unida a una región Fc del mismo, el anticuerpo con uno o dos grupos carbohidrato unidos a una o dos cadenas ligeras del mismo, el anticuerpo sin carbohidrato unido a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, etc., y combinaciones de las alteraciones de glicosilación.

[0119] Cuando el anticuerpo tiene una región Fc, se puede unir una estructura de oligosacárido a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, por ejemplo, en el residuo 299 (298, numeración de residuos EU). Para pertuzumab, G0 era la estructura de oligosacárido predominante, estando otras estructuras de oligosacáridos, tales como G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) y G2 en menores cantidades en la composición de pertuzumab.

[0120] A menos que se indique lo contrario, una "estructura de oligosacárido G1" en el presente documento incluye las estructuras G-1, G1-1, G1(1-6) y G1(1-3).

[0121] Una "extensión de la secuencia líder" en el presente documento se refiere a uno o más residuos de aminoácido de la secuencia líder amino-terminal que están presentes en el extremo amino de una o más cadenas

pesada o ligera de un anticuerpo. Una extensión líder amino-terminal de ejemplo comprende o consiste en tres residuos de aminoácido, VHS, presentes en una o ambas cadenas ligera de una variante de anticuerpo.

5 [0122] Un anticuerpo "desaminado" es aquel en que uno o más residuos de asparagina del mismo se han derivatizado, por ejemplo, en un ácido aspártico, un succinimida o un ácido isoaspártico.

[0123] El término "tumor," tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

10 [0124] Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma (incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma y cáncer de células de isletas), mesotelioma, schwannoma (incluyendo neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma, y leucemia o tumores linfoides. Entre los ejemplos más particulares de dichos cánceres se incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroidal, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma penil, carcinoma testicular, cáncer de esófago, tumores del tracto biliar, así como cáncer de cabeza y cuello.

25 [0125] Un cáncer "avanzado" es aquel que se extiende fuera del sitio u órgano de origen, ya sea mediante invasión local o metástasis.

30 [0126] Un cáncer "recurrente" es aquel que se ha vuelto a desarrollar, ya sea en el sitio inicial o en un sitio distante, después de la respuesta a una terapia inicial.

35 [0127] La "patología" del cáncer incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, el crecimiento celular anormal o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de células vecinas, liberación de citoquinas u otros productos secretores a niveles anormales, supresión o empeoramiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, neoplasia, pretumores, tumores, invasión de tejidos u órganos circundantes o distantes, tales como nódulos linfáticos, etc.

40 [0128] En el presente documento, un "sujeto" es un "sujeto con cáncer" humano, es decir, uno que padece de uno o más síntomas de cáncer.

45 [0129] Una "muestra de tumor" en el presente documento es una muestra derivada de, o que comprende células tumorales de, un tumor de paciente. Ejemplos de muestras de tumores en el presente documento incluyen, pero sin limitación, biopsias de tumores, células tumorales circulantes, proteínas de plasma circulantes, fluido ascítico, cultivos de células primarias o líneas celulares primarias derivadas de tumores o que muestran propiedades de tipo tumoral, así como muestras de tumores conservadas, tales como muestras tumorales fijadas con formalina, bañadas en parafina o muestras de tumores congeladas.

[0130] Una muestra de tumor "fijada" es aquella que se ha conservado histológicamente utilizando un fijador.

50 [0131] Una muestra de tumor "fijada con formalina" es aquella que se ha conservado utilizando formaldehído como fijador.

55 [0132] Una muestra de tumor "bañada" es aquella rodeada por un medio firme y generalmente duro, tal como parafina, cera, celoidina o una resina. El baño posibilita el corte de secciones finas para el examen microscópico o para la generación de microarrays de tejido (TMAs).

[0133] Una muestra de tumor "bañada con parafina" es aquella rodeada por una mezcla purificada de hidrocarburos sólidos derivados del petróleo.

60 [0134] En el presente documento, una muestra de tumor "congelada" se refiere a una muestra de tumor que está o ha sido congelada.

65 [0135] Una muestra de cáncer o muestra biológica que "muestra la expresión, amplificación o activación de HER" es aquella que, en una prueba diagnóstica, expresa (incluyendo sobreexpresa) un receptor de HER, ha amplificado el gen de HER y/o de otro modo demuestra la activación o fosforilación de un receptor de HER.

[0136] Una muestra de cáncer o muestra biológica que "muestra la activación de HER" es aquella que, en una prueba diagnóstica, demuestra la activación o fosforilación de un receptor de HER. Dicha activación se puede determinar directamente (por ejemplo, midiendo la fosforilación de HER por ELISA) o indirectamente (por ejemplo, mediante el perfil de expresión génica o mediante la detección de heterodímeros de HER, tal como se describe en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2004/0106161, publicada el 3 de junio de 2004).

[0137] En el presente documento, "perfil de la expresión génica" se refiere a una evaluación de la expresión de uno o más genes como alternativas para determinar la fosforilación de HER directamente.

[0138] Un "ensayo fosfo-ELISA" en el presente documento es un ensayo en que se evalúa la fosforilación de uno o más receptores de HER, especialmente HER2, en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando un reactivo, normalmente un anticuerpo, para detectar el receptor de HER, sustrato o molécula de señalización cascada abajo fosforilados. Preferiblemente, se utiliza un anticuerpo que detecta HER2 fosforilado. El ensayo se puede realizar en lisados celulares, preferiblemente de muestras biológicas nuevas o congeladas.

[0139] Una célula de cáncer con "sobrexpresión o amplificación de receptor de HER" es aquella que presenta niveles significativamente más elevados de una proteína o gen de receptor de HER en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar causada por la amplificación génica o por la mayor transcripción o traducción. La sobreexpresión o traducción del receptor de HER se puede determinar en un ensayo de diagnóstico o pronóstico mediante la evaluación de niveles incrementados de la proteína HER presentada en la superficie de una célula (por ejemplo, a través de un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). Alternativamente o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica HER en la célula, por ejemplo, a través de técnicas de hibridación fluorescente in situ (FISH; véase WO98/45479 publicada en octubre de 1998), transferencia southern, o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR de tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). Se puede estudiar también la sobreexpresión o amplificación del receptor de HER midiendo el antígeno diseminado (por ejemplo, dominio extracelular de HER) en un fluido biológico, tal como suero (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.933.294 publicada el 12 de junio de 1990; WO91/05264 publicada el 18 de abril de 1991; patent de Estados Unidos No. 5.401.638 publicada el 28 de marzo de 1995; y Sias et al. J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, existen varios ensayos in vivo para el técnico experto. Por ejemplo, se pueden exponer células en el cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radioactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a las células en el paciente, por ejemplo, mediante el rastreo de radioactividad o mediante el análisis de una biopsia tomada de un paciente expuesto previamente al anticuerpo.

[0140] En el presente documento, un "agente antitumoral" se refiere a un fármaco utilizado para tratar el cáncer. Los ejemplos no limitantes de agentes antitumorales en el presente documento incluyen agentes quimioterapéuticos, inhibidores de dimerización de HER, anticuerpos contra HER, anticuerpos dirigidos contra antígenos asociados a tumor, compuestos antihormonales, citoquinas, fármacos dirigidos a EGFR, agentes antiangiogénicos, inhibidores de tirosina quinasa, agentes inhibidores del crecimiento y anticuerpos, agentes citotóxicos, anticuerpos que inducen apoptosis, inhibidores de COX, inhibidores de farnesil transferasa, anticuerpos que se unen a proteína CA125 oncofetal, cavunas de HER2, inhibidores de Raf o ras, doxorubicina liposomal, topotecán, taxano, inhibidores duales de tirosina quinasa, TLK286, EMD-7200, pertuzumab, trastuzumab, erlotinib, y bevacizumab.

[0141] Un "agente antitumoral aprobado" es un fármaco utilizado para tratar el cáncer que se aprobado para la comercialización por una autoridad reguladora, tal como la Food and Drug Administration (FDA) o equivalente en extranjero de la misma.

[0142] Cuando un agente antitumoral se administra como un "agente antitumoral único" es el único agente antitumoral administrado para tratar el cáncer, es decir no se administra en combinación con otro agente antitumoral, tal como quimioterapia.

[0143] Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se utiliza aquí, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula de cáncer que expresa HER in vitro o in vivo. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento puede ser aquel que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan HER en la fase S. Entre los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento se incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar diferente a la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la fase M. Los bloqueadores clásico de la fase M incluyen vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topo II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también afectan a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluoruracilo y ara-C. Se puede encontrar más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes and antineoplastic drugs" por Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la página 13.

[0144] Ejemplos de anticuerpos "inhibidores de crecimiento" son aquellos que se unen a HER2 e inhiben el crecimiento de células de cáncer que sobreexpresan HER2. Los anticuerpos contra HER2 inhibidores del

crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de células de tumores de mama SK-BR-3 en un cultivo celular en más de un 205, y preferiblemente en más de un 50% (por ejemplo, desde aproximadamente un 50% hasta aproximadamente un 100%) en una concentración de anticuerpo contra aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml, donde la inhibición de crecimiento se determina seis días después de la exposición de las células SK-BR-3 al anticuerpo (véase, la Patente de Estados Unidos No. 5.677.171 concedida el 14 de octubre de 1997). El ensayo de inhibición del crecimiento de células SK-BR-3 se describe con más detalle en esta patente y en la presente a continuación. El anticuerpo inhibidor del crecimiento preferido es una variante humanizada de anticuerpo monoclonal murino 4D5, por ejemplo, trastuzumab.

[0145] Un anticuerpo que "induce la apoptosis" es aquel que induce la muerte celular programada determinada mediante la unión de annexina V, la fragmentación de ADN, el encogimiento celular, la dilatación del retículo endoplasmático, la fragmentación celular y/o la formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). La célula es aquella que sobreexpresa el receptor de HER2. Preferiblemente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas o vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, Calu3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. Están disponibles varios métodos para evaluar los sucesos celulares asociados a la apoptosis. Por ejemplo, se puede medir la translocación de la fosfatidil serina (PS) mediante la unión a annexina; la fragmentación de ADN se puede evaluar a través del encadenamiento de ADN; y la condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación de ADN se puede evaluar mediante cualquier incremento en células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo que induce apoptosis es aquel que da lugar a aproximadamente 2 a 50 veces, preferiblemente aproximadamente 5 a 50 veces, y más preferiblemente aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de la unión a annexina en relación a células no tratadas en un "ensayo de unión a annexina utilizando células BT474" (ver a continuación). Ejemplos de anticuerpos contra Her2 que inducen la apoptosis son 7C2 y 7F3.

[0146] El "epítipo 4D5" es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se une el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y trastuzumab. Este epítipo está próximo al dominio transmembrana de HER2 y en el Dominio IV de HER2. Para cribar anticuerpos que se unen al epítipo 4D5, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado ("cross-blocking assay") de rutina, tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, se puede realizar un mapeo epitópico para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 4D5 de HER2 (por ejemplo, alguno o más residuos en la región desde aproximadamente el residuo 529 hasta aproximadamente el residuo 625, ambos inclusive del ECD de HER2, la numeración de los residuos incluye el péptido señal).

[0147] El "epítipo 2C4" es la región del dominio extracelular de HER2 al que se une el anticuerpo 2C4. Con el fin de cribar los anticuerpos que se unen al epítipo 2C4, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Preferiblemente, el anticuerpo bloquea la unión de 2C4 a HER2 en aproximadamente el 50% o más. Alternativamente, se puede realizar un mapeo de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 2C4 de HER2. El epítipo 2C4 comprende residuos del Dominio II en el dominios extracelular de HER2. 2C4 y pertuzumab se unen al dominio extracelular de HER2 en la unión de los dominios I, II y III. Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

[0148] El epítipo "7C2/7F3" es la región en el extremo N terminal, en el Dominio I, del dominio extracelular de HER2 a la que se unen los anticuerpos 7C2 y/o 7F3 (cada uno depositado con la ATCC, véase a continuación). Para cribar anticuerpos que se unen al epítipo 7C2/7F3, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado ("cross-blocking assay") de rutina, tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Alternativamente, se puede realizar un mapeo epitópico para establecer si el anticuerpo se une al epítipo 7C2/7F3 en HER2 (por ejemplo, uno o más residuos en la región desde aproximadamente el residuo 22 hasta aproximadamente el residuo 53 del ECD de HER2, la numeración de los residuos incluye el péptido señal).

[0149] El "tratamiento" se refiere al tratamiento terapéutico. Por tanto, el paciente a tratar en el presente documento se ha diagnosticado que tiene cáncer.

[0150] El término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar el cáncer en un paciente. La cantidad eficaz del fármaco puede reducir el número de células de cáncer; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la infiltración de células de cáncer en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la metástasis del tumor; inhibir, en cierto grado, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en cierto grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Siempre que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o matar las células de cáncer existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La cantidad eficaz puede extender la supervivencia libre de progresión (por ejemplo, medido por el Criterio de Evaluación de Respuesta para Tumores Sólidos, RECIST o cambios CA-125), puede dar lugar a una respuesta objetiva (incluyendo una respuesta parcial, PR, o una respuesta completa, CR, incrementar el tiempo de supervivencia global y/o mejorar uno o más síntomas del cáncer (por ejemplo, evaluado mediante FOSI).

[0151] El término "agente citotóxico" tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a una sustancia que

inhibe o impide la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³²) e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como las toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, micótico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos.

5 [0152] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®); sulfonatos de alquilo, tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas, tales como benzodopa, arboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente, bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colquicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectinam y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; una espongiatrina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos, tales como antibióticos de enediína (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omega11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediína de cromoproteínas relacionadas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección con liposoma de clorhidrato de doxorubicina (DOXIL®) y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona, y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; antiadrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; rellenos de ácido fólico, tales como ácido folínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziouona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziouona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; trichotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de paclitaxel con nanopartículas diseñadas con albúmina (ABRAXANE™), y docetaxel (TAXOTERE®); cloranbucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatraxato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; bisfosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolano de nucleósido de citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en los mecanismos de señalización implicados en la proliferación aberrante de células, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas, tales como la vacuna THERATOPE® y vacuns de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAPID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo, EURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); sorafenib (Bayer); SU-11248 (Pfizer); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores, así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

65 [0153] Un "agente antihormonal" o "agente terapéutico endocrino" es un agente que actúa para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que pueden inducir el crecimiento del cáncer. Pueden ser hormonas. Los ejemplos incluyen: antiestrógenos con perfil de agonista/antagonista mezclado, incluyendo, tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (VISTA®), trioxifeno, keoxifeno, y moduladores de receptores de estrógeno selectivos (SERM), tales como SERM3;

antiestrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como EM800 (dichos agentes pueden bloquear la dimerización de receptores de estrógeno (ER), inhibir la unión a ADN, incrementar el recambio de ER y/o suprimir los niveles de ER); inhibidores de aromatasa, incluyendo inhibidores de aromatasa esteroideales, tales como formestano y exemestano (AROMASIN®), e inhibidores de aromatasa no esteroideales, tales como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de aromatasa incluyen vorozol (RIVISOR®), actato de megestrol (MEGASE®), fadrozol, y 4(5)-imidazoles; agonistas de la hormona luteinizante liberadora de hormonas, incluyendo leuprolide (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, buserelina, y triptorelina; esteroides sexuales, incluyendo progestinas, tales como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, estrógenos, tales como dietilestilbestrol y premarina, y andrógenos/retinoides, tales como fluoximesterona, todos los ácidos transretinoico y fenretinida; onapristona; anti-progesteronas; reguladores por descensode receptores de estrógeno (ERDs); antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida.

[0154] Un "agente quimioterapéutico antimetabolito" es un agente que es estructuralmente similar a un metabolito, pero no se puede utilizar por el organismo de una manera productiva. Muchos agentes quimioterapéuticos antimetabolitos interfieren con la producción de los ácidos nucleicos, ARN y ADN. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos antimetabolitos incluyen gemcitabina (GEMZAR®), fluorouracilo (5-FU), capecitabina (XELODAJ), 6-mercaptopurina, metotrexato, 6-tioguanina, pemetrexed, raltitrexed, arabinosilcitosina ARA-C citarabina (CYTOSAR-U®), dacarbazina (DTIC-DOME®), azocitosina, desoxicitosina, piridimido, fludarabina (FLUDARA®), cladribina, 2-desoxi-D-glucosa etc. El agente quimioterapéutico antimetabolito es gemcitabina.

[0155] "Gemcitabina" o "monoclorhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero b)" es un análogo de nucleósido que muestra actividad antitumoral. La fórmula empírica para el clorhidrato de gemcitabina es $C_{19}H_{11}F_2N_3O_4 \cdot A1 \cdot HCl$. El clorhidrato de gemcitabina es comercializado por Eli Lilly bajo el nombre comercial GEMZAR®.

[0156] Un "agente quimioterapéutico de base platino" comprende un compuesto orgánico que contiene platino como una parte integral de la molécula. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos de base platino se incluyen carboplatino, cisplatino, y oxaliplatino.

[0157] Por "quimioterapia de base platino" se entiende terapia con uno o más agentes quimioterapéuticos de base platino, opcionalmente en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos.

[0158] Por un cáncer "resistente a la quimioterapia" se entiende que el paciente con cáncer ha progresado mientras recibe una pauta de quimioterapia (es decir, el paciente es "refractario a la quimioterapia") o el paciente ha progresado en 12 meses (por ejemplo, en 6 meses) después de completar la pauta de quimioterapia.

[0159] Por cáncer "resistente a platino" se entiende que el paciente con cáncer ha progresado mientras recibe quimioterapia basada en platino (es decir, el paciente es "refractario al platino"), o el paciente ha progresado antes de 12 meses (por ejemplo, en 6 meses) después de completar una pauta de quimioterapia basada en platino.

[0160] Un "agente anti-angiogénico" se refiere a un compuesto que bloquea, o interfiere con, hasta cierto grado, el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor anti-angiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o un anticuerpo que se unen a un factor de crecimiento o receptor de un factor de crecimiento implicados en la inducción de la angiogénesis. El factor anti-angiogénico preferido de la presente invención es un anticuerpo que se une al Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), tal como bevacizumab (AVASTIN®) (véase la patente de Estados Unidos No. 6,884,879B1).

[0161] El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Algunos ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas del crecimiento, tales como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo, y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidal; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGFs), tales como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento I y II de tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones, tales como interferón- α , β , y γ ; factores estimulantes de colonias (CSFs), tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (ILs), tales como IL-1, IL-1 α , IL-2 (por ejemplo, PROLEUKIN®), IL-3, IL-4, IL-5 IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- α o TNF- β , y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y ligando kit (LK). Tal y como se utiliza en la presente invención, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

[0162] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fármaco dirigido a EGFR" se refiere a un agente terapéutico que se une a EGFR y, opcionalmente inhibe la activación de EGFR. Ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, patente de Estados Unidos No. 4,943, 533, Mendelsohn et al.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano reformado (H225) (véase, WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo dirigido a EGFR totalmente humano (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutantes de tipo II (patente de Estados Unidos No. 5,212,290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR, tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 5,891,996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tal como ABX-EGF (véase WO98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo contra EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compite con EGF y TGF-alfa por la unión a EGFR; y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR se puede conjugar con un agente citotóxico, generando así un inmunoconjugado (véase, por ejemplo, EP659,439A2, patente de Merck GmbH). Ejemplos de moléculas pequeñas que se unen a EGFR incluyen ZD1839 o Gefitinib (IRESSA; Astra Zeneca); CP-358774 o Erlotinib (TARCEVA™; Genentech/OSI); y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen); EMD-7200.

[0163] Un "inhibidor de tirosina quinasa" es una molécula que inhibe la actividad de tirosina quinasa de una tirosina quinasa, tal como un receptor de HER. Entre los ejemplos de dichos inhibidores se incluyen los fármacos dirigidos a EGFR indicados en el párrafo anterior; inhibidor de tirosina quinasa de HER2 de molécula pequeña, tal como TAK165 disponible en Takeda; CP-724,714, un inhibidor selectivo oral del receptor tirosina quinasa HER2 (Pfizer y OSI); inhibidores duales de HER, tales como EKB-569 (disponible en Wyeth) que se une preferiblemente a EGFR, pero inhibe células que sobreexpresan HER2 y EGFR; GW572016 (disponible en Glaxo) un inhibidor de tirosina quinasa oral de HER2 y EGFR; PKI-166 (disponible en Novartis); inhibidores de pan-HER, tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de Raf-1, tales como el agente antisentido ISIS-5132 disponible en ISIS Pharmaceuticals que inhibe la señalización de Raf-1; inhibidores de TK no dirigidos a HER, tales como mesilato de Imatinib (Gleevac®) disponible en Glaxo; inhibidor de quinasa I regulada extracelular de MAPK CI-1040 (disponible en Pharmacia); quinazolininas, tales como PD 153035,4-(3-cloroanilino) quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d] pirimidinas; curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen grupos de nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (por ejemplo, las que se unen a un ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (patente de Estados Unidos No. 5,804,396); trifostinas (patente de Estados Unidos No. 5,804,396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-HER, tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de Imatinib (Gleevac; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o tal como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patentes: patente de Estados Unidos No. 5,804,396; WO99/09016 (American Cyanamid); WO98/43960 (American Cyanamid); WO97/38983 (Warner Lambert); WO99/06378 (Warner Lambert); WO99/06396 (Warner Lambert); WO96/30347 (Pfizer, Inc); WO96/33978 (Zeneca); WO96/3397 (Zeneca); and WO96/33980 (Zeneca).

[0164] Una dosis "fija" o "plana" de un agente terapéutico en el presente documento se refiere a una dosis que se administra a un paciente humano sin considerar el peso (WT) o el área de la superficie corporal (BSA) del paciente. La dosis fija o plana no se proporciona por tanto como una dosis en mg/kg o una dosis de mg/m², sino como una cantidad absoluta del agente terapéutico.

[0165] Una dosis "de carga" en el presente documento comprende en general una dosis inicial de un agente terapéutico administrado a un paciente, y va seguido de una o más dosis de mantenimiento del mismo. En general, se administra una dosis de carga única, pero en el presente documento se contemplan múltiples dosis de carga. Habitualmente, la cantidad de la(s) dosis de carga administrada(s) supera la cantidad de la(s) dosis de mantenimiento administrada(s) y/o la(s) dosis de carga se administra(n) más frecuentemente que la dosi(s) de mantenimiento, para conseguir la concentración deseada en estado estacionario del agente terapéutico antes de la que se puede conseguir con la(s) dosis de mantenimiento.

[0166] Una dosis de "mantenimiento" se refiere en el presente documento a una o más dosis de un agente terapéutico administrado al paciente durante un periodo de tratamiento. Normalmente, las dosis de mantenimiento se administran en intervalos de tratamiento espaciados, tales como aproximadamente cada semana, aproximadamente cada dos semanas, aproximadamente cada 3 semanas o aproximadamente cada 4 semanas.

[0167] La "astringencia" de las reacciones de hibridación se determina fácilmente por el experto en la materia, y en general es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, temperatura de lavado, y concentración salina. Por lo general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación adecuada, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para renaturalizarse cuando se hallan presentes cadenas complementarias en un entorno por debajo de la temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseado entre la sonda y la secuencia de hibridación, mayor es la temperatura relativa que puede utilizarse. Como resultado, se deduce que

temperaturas relativamente superiores favorecerían que las condiciones de reacción sean más astringentes, mientras que temperaturas inferiores favorecerían condiciones de reacción menos astringentes. Para detalles adicionales y una explicación de la astringencia de las reacciones de hibridación, véase Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[0168] "Condiciones astringentes" o "condiciones de astringencia elevada", tal como se define aquí, habitualmente: (1) utilizan una temperatura elevada y una fuerza iónica baja para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015M/citrato sódico 0,0015M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) utilizan un agente desnaturalizante durante la hibridación, como la formamida, por ejemplo, formamida (v/v) al 50% con albúmina sérica bovina al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) utilizan formamida al 50%, 5XSSC (NaCl 0,75M, citrato sódico 0,075M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5X solución de Denhardtts, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2X SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50%, seguido de un lavado a astringencia elevada que consiste en 0,1XSSC con EDTA a 55°C.

[0169] "Condiciones de astringencia moderada" pueden identificarse tal como se describe por Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen la utilización de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, la temperatura, la fuerza iónica y el % de SDS) menos astringentes que las descritas más arriba. Un ejemplo de condiciones de astringencia moderada es la incubación durante toda la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5XSSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de 5X Denhardt, sulfato de dextrano al 10% y ADN de esperma de salmón desmenuzado y desnaturalizado a 20 mg/ml, seguido de lavados de los filtros en 1XSSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., tanto como sea necesario para adaptar factores como la longitud de la sonda y similares.

[0170] En el contexto de la presente invención, la referencia a "por lo menos uno", "por lo menos dos", "por lo menos tres", "por lo menos cuatro", "por lo menos cinco", etc. de los genes indicados en cualquiera de los grupos de genes concretos significa cualquiera de ellos y cualquiera y todas las combinaciones de los genes indicados.

30 Descripción detallada

[0171] La práctica de la presente invención utilizará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular y bioquímica, que están dentro de la rutina del sector. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura, tales como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology", 4ª edición (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); y "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., eds., 1994).

40 Identificación de marcadores de diagnóstico de resistencia al tratamiento con inhibidores de HER2

[0172] Tal como se ha descrito anteriormente, el trastuzumab se utiliza en la práctica clínica e disposición de adyuvante y metastásico para el tratamiento del cáncer de mama en pacientes cuyo tumor sobreexpresa el oncogén HER2. Actualmente, los niveles de expresión de HER2 se miden habitualmente mediante dos tipos principales de ensayo, inmunohistoquímica (IHC) y la hibridación fluorescente in situ (FISH). De este modo, la sobreexpresión de HER2 se puede analizar mediante IHC, por ejemplo, utilizando el HERCEPTEST® (Dako). Las secciones bañadas en parafina de una biopsia de tumor se pueden someter al ensayo IHC y según el criterio de intensidad de tinción de la proteína HER2 siguiente:

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

Puntuación 1+ se detecta una tinción de la membrana débil o escasamente perceptible en más del 10% de las células tumorales. Las células sólo están teñidas en la parte de su membrana.

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

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

60 Los tumores con puntuaciones 0 ó 1+ para la valoración de la sobreexpresión de HER2 se pueden caracterizar como no sobreexpresantes de HER2, mientras que aquellos tumores con puntuaciones de 2+ ó 3+ se pueden caracterizar como sobreexpresantes de HER2.

65 Los tumores que sobreexpresan HER2 se pueden evaluar por las puntuaciones inmunohistoquímicas correspondientes al número de copias de moléculas de HER2 expresadas por célula y se pueden determinar bioquímicamente:

0 = 0-10.000 copias/célula,
 1+ = por lo menos aproximadamente 200.000 copias/célula,
 2+ = por lo menos aproximadamente 500.000 copias/célula,
 5 3+ = por lo menos aproximadamente 2.000.000 copias/célula.

[0173] La sobreexpresión de HER2 en el nivel 3+, que conduce a una activación independiente del ligando de la tirosina quinasa (Hudziak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7159-7163 (1987)), tiene lugar en aproximadamente el 30% de los cánceres de mama, y en estos pacientes, se disminuye la supervivencia sin recaída y la supervivencia global (Slamon et al., Science, 244:707-712 (1989); Slamon et al., Science, 235:177-182 (1987)).

[0174] Alternativamente o adicionalmente, se pueden realizar ensayos FISH, tales como INFORM™ (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION™ (Vysis, Illinois) en un tejido tumoral bañado en parafina, fijado a formalina para determinar el grado (si lo hay) de amplificación de HER2 en el tumor.

[0175] Para una revisión, véase Winston et al., Am J. Pathol 121(Suppl. 1):S33-49 (2004).

[0176] En pacientes con cáncer de mama metastásico, aproximadamente el 30% de los pacientes que dieron positivo para HER2 por IHC o FISH (es decir, pacientes con tumores que expresan HER2) muestran una respuesta objetiva al trastuzumab solo y aproximadamente el 50% al trastuzumab más quimioterapia. Algunos de los pacientes restantes pueden aún derivar un beneficio clínico sin una respuesta objetiva, pero existe aún una proporción que muestra una resistencia primaria al trastuzumab. Además, muchos pacientes que se benefician inicialmente en la situación metastásica progresan finalmente con el tratamiento con trastuzumab (resistencia adquirida). Los pacientes con resistencia primaria o adquirida al tratamiento con trastuzumab se refieren colectivamente como "refractarios" o "resistentes" a dicho tratamiento. En la situación de adyuvante, la adición de trastuzumab a la quimioterapia da lugar a una mejora significativa en la supervivencia sin enfermedad. No obstante, existe aún un grupo de pacientes cuyo tumor aparece reaparece después del tratamiento.

[0177] La presente invención se basa en la identificación de genes que están asociados con la resistencia a trastuzumab. Por consiguiente, los niveles de expresión de dichos genes pueden servir como marcadores de diagnóstico para identificar pacientes con tumores que expresan HER2 que tienen menos probabilidades de responder a las terapias actuales con trastuzumab u otros inhibidores de HER2 y podrían beneficiarse de nuevos tratamientos de combinación, incluyendo trastuzumab u otros inhibidores de HER2 en combinación con otros agentes anticancerosos y/o modalidades de tratamiento.

[0178] Se sabe que las quinasas y fosfatasa controlan el proceso reversible de la fosforilación y están desreguladas en una variedad de enfermedades, incluyendo el cáncer. Por consiguiente, se eligió una estrategia de ARNi a gran escala para identificar las quinasas y fosfatasa que están asociadas con la resistencia al tratamiento con trastuzumab. En particular, la realización del cribado de ARNi a gran escala en líneas celulares positivas en HER2 que son sensibles al tratamiento con trastuzumab in vitro, se ha identificado un grupo de quinasas y fosfatasa cuya pérdida de función volvió las líneas celulares resistentes al tratamiento con trastuzumab. Los resultados se validaron mediante el reensayo del ARNi y mediante la confirmación de los resultados en dos líneas celulares diferentes (BT474 y SKBR3). Los detalles de este cribado se proporcionan en el ejemplo siguiente.

[0179] De este modo, se han identificado los siguientes genes por estar asociados al tratamiento con inhibidores de HER2: CDK11, DYRK1A, LATS2, STK10, Weel, DUSP4, DUSP6, HIPK3, JNK, MAP4K4, PTPN11, Socs5, PPM1H, DKFZP586B16, DGK1, FLJ35107, FLT1, HK2, ITK, MOAP1, KIAA0685, KIAA1639, LIM/PDLIM5, PANK1, P14K2B, PPP2R1A, PRKWNK3, RYK, SPEC2, STK22C, STYK1, TXND3. Estos genes también se indican en la tabla 1, junto con los números de acceso de GenBank de NCBI. La expresión o actividad reducida de uno o más de estos genes, o las correspondientes moléculas de ARN o proteínas codificadas en una muestra biológica obtenida del paciente, en relación al control, indica que el tumor del paciente probablemente mostrará resistencia al tratamiento con un inhibidor de HER2.

[0180] El control puede ser, por ejemplo, un gen presente en la misma célula, que se sabe que está regulado por descenso en pacientes que muestran resistencia al tratamiento con inhibidor de HER2 (control positivo), tal como, por ejemplo, p27 o PTEN. Alternativamente o adicionalmente, el control puede ser el nivel de expresión del mismo gen en una célula normal del mismo tipo de célula (control negativo). Los niveles de expresión también se pueden normalizar, por ejemplo, a los niveles de expresión de genes constitutivos, tales como gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y/o β-actina, o a los niveles de expresión de todos los genes en la muestra analizada. En una realización, la expresión de uno o más de los genes indicados anteriormente se estima como positiva si está en la mediana o superior, por ejemplo, en comparación con otras muestras del mismo tipo de tumor. El nivel de expresión en la mediana se puede determinar esencialmente de manera simultánea con la medición de la expresión génica o se puede haber determinado previamente. Estos y otros métodos son conocidos en la técnica y son evidentes para los expertos en la materia.

[0181] Aunque la presente invención identifica marcadores específicos de la resistencia del tumor al tratamiento con un inhibidor de HER2, los marcadores alternativos la expresión de los cuales está regulada positiva o negativamente con la expresión de un gen identificado específicamente en el presente documento, también son adecuados como marcadores de la resistencia. De este modo, los marcadores alternativos incluyen genes que son reguladores positivos del mismo mecanismo que el mecanismo regulado positivamente por un gen identificado específicamente en el presente documento, o un mecanismo cascada abajo. La menor expresión (desactivación o inhibición) de dichos genes será un indicador de la resistencia de los tumores que expresan HER2 al tratamiento con inhibidores de HER2. Se incluyen en este grupo genes que muestran un patrón de expresión similar a un gen identificado específicamente en el presente documento, donde el patrón de expresión similar puede resultar, por ejemplo, de la implicación de ambos genes en un proceso biológico particular y/o estar bajo el control regulador común en células tumorales. Los marcadores alternativos también incluyen genes la expresión de los cuales se correlaciona de manera inversa con la expresión de un gen identificado específicamente en el presente documento, es decir, genes la expresión de los cuales está regulada negativamente de forma coordinada con un gen descrito específicamente. Se incluyen en este grupo de marcadores alternativos los genes que son reguladores negativos del mismo mecanismo que un mecanismo regulado positivamente por un gen identificado específicamente en el presente documento, o un mecanismo cascada abajo. La mayor expresión (activación o sobreexpresión) de dichos genes será un indicador de la resistencia de tumores que expresan HER2 al tratamiento con inhibidores de HER2.

Métodos de diagnóstico

[0182] Los métodos para identificar pacientes para el tratamiento con inhibidores de HER2, tales como anticuerpos contra HER2, se han descrito anteriormente.

[0183] Varios métodos para determinar la expresión de ARNm o proteína incluyen, sin limitación, el perfil de expresión génica, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que incluyen PCR de tiempo real cuantitativa (qRT-PCR), análisis con microarray que se puede realizar mediante un equipo disponible comercialmente, siguiendo los protocolos del fabricante, tales como mediante la utilización de la tecnología GenChip Affymetrix, análisis en serie de la expresión génica (SAGE) (Velculescu et al., Science 270:484-487 (1995); y Velculescu et al., Cell 88:243-51 (1997)), MassARRAY, Análisis de la expresión génica mediante la secuenciación masiva en paralelo de la firma (MPSS) (Brenner et al., Nature Biotechnology 18:630-634 (2000)), proteómica, inmunohistoquímica (IHC), etc. Preferiblemente se cuantifica el ARNm. Dicho análisis de ARNm se realiza preferiblemente utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o mediante análisis con microarray. Cuando se utiliza la PCR, una forma preferida de PCR es la PCR de tiempo real cuantitativa (qRT-PCR).

[0184] Las etapas de un protocolo representativo para el perfil de la expresión génica utilizando tejidos fijados bañados en parafina como fuente de ARN, que incluyen aislamiento de ARNm, purificación, extensión con cebadores y amplificación, se indican en varios artículos publicados (por ejemplo: Godfrey et al. J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 (2000); Specht et al., Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001)). Brevemente, un proceso representativo empieza con un corte de secciones de aproximadamente 10 microgramos de grosor de muestras de tejido de tumor bañadas en parafina. A continuación, el ARNm se extrae y se eliminan la proteína y el ADN. Los métodos generales para la extracción de ARNm son conocidos en la técnica y se describen en libros de texto estándar de biología molecular, incluyendo Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons (1997). Los métodos para la extracción de ARN de tejidos bañados en parafina se describen, por ejemplo, en Rupp y Locker, Lab Invest. 56:A67 (1987), y De Andrés et al., BioTechniques 18:42044 (1995). En particular, el aislamiento de ARN se puede realizar utilizando un kit de purificación, un grupo de tampones y proteasa de fabricantes comerciales, tales como Qiagen, según las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, el ARN total de las células en el cultivo se puede aislar utilizando minicolumnas de Qiagen RNeasy. Otros kits de aislamiento de ARN disponibles comercialmente incluyen el kit de purificación de ADN y ARN completo MasterPure™ (EPICENTRE®, Madison, WI), y el kit de aislamiento de ARN en bloque con parafina (Ambion, Inc.). El ARN total de las muestras de tejido se puede aislar utilizando RNA Stat-60 (Tel-Test). El ARN preparado del tumor se puede aislar, por ejemplo, mediante centrifugación con un gradiente en densidad de cloruro de cesio. Después del análisis de la concentración de ARN, se pueden incluir etapas de reparación y/o amplificación de ARN, si son necesarias, y el ARN de transcribe de forma inversa utilizando promotores específicos de genes seguido de PCR. Preferiblemente, se utiliza PCR de tiempo real, que es compatible con PCR competitiva cuantitativa, donde el competidor interno para cada secuencia diana se utiliza para la normalización y la PCR comparativa cuantitativa que utiliza un gen de normalización contenido en la muestra, o un gen constitutivo para RT-PCR. Para más detalles, véase, por ejemplo: "PCR: The Polymerase Chain Reaction", Mullis et al., eds., 1994; y Held et al., Genome Research 6:986-994 (1996). Finalmente, los datos se analizan para identificar la mejor opción u opciones de tratamiento disponibles para el paciente en base al patrón de expresión génica característico identificado en la muestra de tumor examinada.

[0185] Los niveles de expresión también se pueden determinar a nivel de proteína, por ejemplo, utilizando varios tipos de inmunoensayos o técnicas de proteómica.

[0186] En los inmunoensayos, se detecta la proteína marcadora de diagnóstico diana utilizando un anticuerpo que se une específicamente al marcador. El anticuerpo estará habitualmente marcada con un grupo detectable. Existen numerosos marcadores que se pueden agrupar generalmente en las siguientes categorías:

Radioisótopos, tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , y ^{131}I . El anticuerpo se puede marcar con el radioisótopo utilizando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2, Coligen et al. (1991) Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs, por ejemplo, y la radioactividad se puede medir utilizando el recuento del centelleo.

[0187] Existen marcadores fluorescentes, tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lissamina, ficoeritrina y rojo de Texas. Los marcadores fluorescentes se pueden conjugar al anticuerpo utilizando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, supra, por ejemplo. La fluorescencia se puede cuantificar utilizando un fluorímetro.

[0188] Existen varios marcadores de enzima-sustrato y la patente de Estados Unidos No. 4,275,149 proporciona una revisión de algunos de ellos. La enzima cataliza en general una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir utilizando varias técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se describen anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y puede entonces emitir luz que se puede medir (utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo) o proporciona energía a un aceptor fluorescente. Ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de Estados Unidos No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasa heterocíclicas (tales como, uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan et al. (1981) *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzym.* (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York 73:147-166.

[0189] Entre los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato se incluyen, por ejemplo: peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, donde la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilén diamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (TMB)); fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico; y β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o un sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

[0190] Para los expertos en la materia, están disponibles numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato. Para una revisión general de las mismas, véanse las patentes de Estados Unidos Nos. 4.275.149 y 4.318.980.

[0191] Algunas veces, el marcador está indirectamente conjugado con el anticuerpo. El técnico experto conoce las diversas técnicas para conseguir esto. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcadores mencionados anteriormente se pueden conjugar con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y, de este modo, el marcador se puede conjugar con el anticuerpo contra esta manera indirecta. Alternativamente, para conseguir la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). De este modo, se puede conseguir la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo.

[0192] En otras versiones de técnicas de inmunoensayo, el anticuerpo no necesita estar marcado, y la presencia del mismo se puede detectar utilizando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo.

[0193] De este modo, los inmunoensayos de diagnóstico en el presente documento pueden estar en formato de ensayo, incluyendo, por ejemplo, ensayos de unión competitiva, ensayos sandwich directo e indirecto y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

[0194] Los ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un patrón marcado de competir con el analito de la muestra de prueba por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de antígeno en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos en general se insolubilizan antes o después de la competición, de manera que el patrón y el analito que están unidos a los anticuerpos se pueden separar de manera conveniente del patrón y el analito que no están unidos.

[0195] Los ensayos de sándwich implican la utilización de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una parte inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína a detectar. En un ensayo de sándwich, el analito de la muestra de prueba está unido por un primer anticuerpo que está inmovilizado en un soporte sólido y a continuación, un segundo anticuerpo se une al analito, formando así un complejo de tres partes insoluble. véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar marcado en sí mismo por un grupo detectable

(ensayos de sándwich directos) o se puede medir utilizando un anticuerpo antiinmunoglobulina que está marcado con un grupo detectable (ensayo de sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de sándwich es un ensayo ELISA en cuyo caso el grupo detectable es una enzima.

5 [0196] Los niveles de proteína también se pueden detectar utilizando técnicas de proteómica. El término "proteoma" se define como la totalidad de las proteínas presentes en una muestra (por ejemplo, tejido, organismo o cultivo celular) en un cierto punto del tiempo. La proteómica incluye, entre otras cosas, el estudio de los cambios globales de la expresión de proteínas en una muestra (también referido como "proteómica de expresión"). La proteómica incluye habitualmente las siguientes etapas: (1) separación de proteínas individuales en una muestra mediante electroforesis en gel 2-D (2-D PAGE); (2) identificación de las proteínas individuales recuperadas del gen, por ejemplo mediante espectrometría de masas o secuenciación N-terminal, y (3) análisis de los datos utilizando bioinformática. Los métodos de la proteómica son alternativas o complementos valiosos a otros métodos del perfil de expresión génica, y se pueden utilizar, solos o combinados con otros métodos, para detectar los productos de los marcadores de la resistencia a tumores de la presente invención.

15 [0197] La medición de los niveles de expresión de los biomarcadores se puede realizar utilizando un programa informático ejecutado por un procesador adecuado. El software y procesadores adecuados son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. El programa puede estar incluido en el software almacenado en un medio tangible, tal como CD-ROM, un disco flexible, un disco duro, un DVD, o una memoria asociada con el procesador, pero los expertos en la materia fácilmente entenderán que el programa completo o partes del mismo se podrían ejecutar alternativamente por un dispositivo diferente a un procesador, y/o incluido en un microprograma y/o un hardware destinado de una manera conocida.

25 [0198] Después de la medición de los niveles de expresión de los genes identificados en el presente documento, o sus productos de expresión, y la determinación de que el sujeto probablemente o no responderá al tratamiento con un inhibidor de HER2, los resultados del ensayo, hallazgos, diagnósticos, predicciones y/o recomendaciones de tratamiento se registran habitualmente y se comunican a los técnicos, médicos y/o pacientes, por ejemplo. En ciertas realizaciones, se utilizarán ordenadores para comunicar dicha información a las partes interesadas, tales como pacientes y/o médicos. En algunas realizaciones, los ensayos se realizarán o los resultados de los análisis se analizarán en un país o jurisdicción que difiere del país o jurisdicción al que se comunican los resultados o diagnósticos.

35 [0199] Se comunica el diagnóstico, predicción y/o recomendación de tratamiento en base al nivel de expresión en un sujeto de prueba de uno o más de los biomarcadores en el presente documento al sujeto tan pronto como sea posible después de completar el ensayo y generar el diagnóstico y/o predicción. Los resultados y/o información relacionada se pueden comunicar al sujeto mediante el médico que trata al sujeto. Alternativamente, los resultados se pueden comunicar directamente al sujeto de prueba mediante cualquier medio de comunicación, incluyendo por escrito, formas electrónicas de comunicación, tales como email o teléfono. La comunicación se puede facilitar mediante uso de un ordenador, tal como en el caso de comunicaciones por email. En ciertas realizaciones, la comunicación que contiene resultados de un test de diagnóstico y/o las conclusiones sacadas del test y/o las recomendaciones del tratamiento basadas en el test, se puede generar y liberar automáticamente al sujeto utilizando una combinación de hardware y software informático que será familiar para los expertos en telecomunicaciones. Un ejemplo de un sistema de comunicaciones orientado al cuidado de la salud se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.283.761; sin embargo, la presente invención no se limita a métodos que utilizan este sistema de comunicaciones particular. En ciertas realizaciones de los métodos de la invención, todas o algunas de las etapas de los métodos, incluyendo el ensayo de muestras, diagnóstico de enfermedades y comunicación de los resultados o diagnósticos de los ensayos, se pueden llevar a cabo en diversas jurisdicciones (por ejemplo, extranjerías).

Identificación de inhibidores de HER2

50 [0200] La primera etapa en la identificación de inhibidores de un polipéptido HER2 es habitualmente un cribado in vitro para identificar compuestos que selectivamente se unen a HER2. La afinidad de unión de los compuestos candidatos se puede analizar mediante la unión directa (véase, por ejemplo, Schoemaker et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 285:61-69 (1983)) o mediante unión indirecta, por ejemplo, competitiva. En experimentos de unión competitiva, se utiliza normalmente la concentración de un compuesto necesario para sustituir el 50% de otro compuesto unido al polipéptido diana (IC50) como medición de la afinidad de unión. Si el compuesto de prueba se une a HER2 selectivamente y con afinidad elevada, la sustitución de otro compuesto unido a HER2, tal como un anticuerpo contra HER2, se identifica como inhibidor de HER2. Los ensayos de base celular se pueden utilizar de manera similar.

60 [0201] Un grupo preferido de inhibidores de HER2 incluye anticuerpos que se unen específicamente a HER2. La "afinidad de unión" a anticuerpo se puede determinar mediante métodos de equilibrio (por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA) o cinética (por ejemplo, análisis BIACORE™), por ejemplo. Además, el anticuerpo puede someterse a otros "ensayos de actividad biológica", por ejemplo, a efectos de evaluar su "potencia" o actividad farmacológica y eficacia potencial como agente terapéutico. Dichos ensayos son conocidos en la técnica y dependen del antígeno diana y uso pretendido para el anticuerpo.

[0202] Otros inhibidores de HER2 incluyen moléculas pequeñas peptídicas y no peptídicas y moléculas antisentido, ribozimas y de triple hélice.

5 [0203] Los inhibidores de HER2 que no son anticuerpos, tales como inhibidores de HER2 de molécula pequeña peptídica y no peptídica, se pueden identificar mediante ensayos de unión o interacción, conocidos en la técnica.

[0204] Todos los ensayos de unión para inhibidores son habituales en que exigen el contacto del inhibidor candidato con un polipéptidos HER2 bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interacciones. En los ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado se puede aislar o detectar en la mezcla de reacción. En una realización particular, el HER2 o el inhibidor candidato se inmoviliza en una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se realiza mediante el cubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptidos HER2 y secado. Alternativamente, se puede utilizar un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido HER2 a inmovilizar, para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza mediante la adición del componente no inmovilizado, que puede estar marcado por un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando se completa la reacción, se extraen los componentes no reaccionados, por ejemplo, mediante lavado y se detectan los complejos anclados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado lleva un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que tuvo lugar la complejación. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no lleva un marcador, la complejación se puede detectar, por ejemplo, utilizando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

[0205] Si el compuesto candidato es un polipéptido que interacciona con, pero no se une a, HER2, la interacción de HER2 con el polipéptido respectivo se puede analizar mediante métodos conocidos para detectar las interacciones proteínas-proteína. Dichos ensayos incluyen estrategias tradicionales, tales como, por ejemplo, reticulación, coimmunoprecipitación y copurificación a través de columnas en gradiente o cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína se pueden monitorizar mediante la utilización de un sistema genético basado en levadura descrito por Fields y colaboradores (Fields and Song, *Nature* (London), 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)) tal como se describe por Chevray and Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión a ADN, el otro que funciona como dominio de transcripción-activación. El sistema de expresión de levadura descrito en las publicaciones anteriores (referido en general como "sistema de dos híbridos") aprovecha esto y utiliza dos proteínas híbridas, una en que la proteína diana se fusiona al dominio de unión a ADN de Gal4, y la otra, en que las proteínas activadoras del candidato se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1-lacZ bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos de interacción se detectan con un sustrato cromogénico para β -galactosidasa. En Clontech está disponible comercialmente un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de dos híbridos. Este sistema también se puede extender para mapear dominios de proteínas implicados en interacciones específicas de proteínas, así como señalar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

[0206] Se enfatiza que los ensayos de cribado descritos específicamente en el presente documento son únicamente con fines ilustrativos. Los expertos en la materia conocen un conjunto de otros ensayos, que se pueden seleccionar dependiendo del tipo de candidatos antagonistas cribados (por ejemplo, polipéptidos, péptidos, moléculas orgánicas pequeñas no peptídicas, ácidos nucleicos, etc.) y son igualmente adecuados para los objetivos de la presente invención.

[0207] Los ensayos aquí descritos se pueden utilizar para cribar bibliotecas de compuestos, incluyendo, sin limitación, bibliotecas químicas, bibliotecas de productos naturales (por ejemplo, colecciones de microorganismos, animales, plantas, etc.) y bibliotecas combinatorias comprendidas de péptidos, oligonucleótidos, moléculas orgánicas pequeñas aleatorias. En una realización particular, los ensayos del presente documento se utilizan para cribar bibliotecas de anticuerpos, incluyendo, sin limitación, bibliotecas de anticuerpos humanos sin manipular, recombinantes, sintéticos y semisintéticos. La biblioteca de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una biblioteca de expresión en fagos, incluyendo, bibliotecas monovalentes, que expresa de promedio un anticuerpo contra cadena sencilla o fragmento de anticuerpo por partícula de fago y bibliotecas multivalentes, que expresan de promedio dos o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos por partícula viral. Sin embargo, las bibliotecas de anticuerpos a cribar según la presente invención no se limitan a las bibliotecas de expresión en fagos. Otras técnicas de expresión en fagos incluyen, por ejemplo, expresión de ribosomas o ARNm (Mattheakis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9022-9026 (1994); Hanes y Pluckthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4937-4942 (1997)), expresión en células microbianas, tal como expresión bacteriana (Georgiou et al., *Nature Biotech.* 15:29-34 (1997)), o expresión en células de levadura (Kieke et al., *Protein Eng.* 10:1303-1310 (1997)), expresión en células de mamífero, expresión en esporas, expresión viral, tal como expresión retroviral (Urban et al., *Nucleic Acids Res.* 33:e35 (2005)), expresión basada en la unión proteína-ADN (Odegrip et al., *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* 101:2806-2810 (2004); Reiersen et al., *Nucleic Acids Res.* 33:e10 (2005)), y expresión en micropartículas (Sepp et al., *FEBS Lett.* 532:455-458 (2002)). Las

bibliotecas de otras moléculas, tales como bibliotecas combinatorias de moléculas pequeñas sintéticas, también se pueden cribar de forma similar.

[0208] Los inhibidores de HER2 también se diseñan para reducir el nivel de la expresión del gen de HER2 endógeno, por ejemplo, utilizando estrategias conocidas con antisentido o ribozima para inhibir o prevenir la traducción del ARNm de HER2 o estrategias con triple hélice para inhibir la transcripción de genes de HER2. Dichos antagonistas de antisentido, ribozimas y triple hélice se pueden diseñar para reducir o inhibir la actividad del gen de HER2 no dañado, o si es apropiado, mutante. Las técnicas para la producción y la utilización de dichas moléculas son conocidas por los expertos en la materia.

[0209] Las moléculas de ARN y ADN antisentido pueden actuar directamente para bloquear la traducción de ARNm mediante la hibridación al ARNm endógeno marcado evitando así la traducción. Alternativamente, el ARN o ADN antisentido pueden inhibir o evitar la transcripción del gen diana. La estrategia con antisentidos implica el diseño de oligonucleótidos (ADN o ARN) que son complementarios a un ARNm de HER2, o complementarios a una parte del gen diana, tal como un elemento regulador que controla la transcripción del gen. Habitualmente, los ácidos nucleicos antisentido deben tener por lo menos seis nucleótidos de longitud, y son preferiblemente oligonucleótidos que varían de 6 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud.

Producción de anticuerpos

[0210] Dado que, en la realización preferidas, el inhibidor de HER2 es un anticuerpo, la siguiente descripción representa técnicas de ejemplo para la producción de anticuerpos contra HER2 utilizados según la presente invención. El antígeno de HER a utilizar para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de un receptor de HER o una parte del mismo, que contiene el epítipo deseado. De manera alternativa, para generar anticuerpos se pueden utilizar células que expresan HER en su superficie celular (por ejemplo, células NIH-3T3 transformadas para sobreexpresar HER2; o una línea celular de carcinoma, tal como células SK-BR-3, véase Stancovski et al. PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991)). Otras formas de receptor de HER útiles para la generación de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia.

Anticuerpos policlonales

[0211] Los anticuerpos policlonales se desarrollan preferiblemente en animales mediante inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente a una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, la hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

[0212] Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación de, 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 la inyección intradérmica de la solución en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días más tarde los animales sangran y el suero se ensaya para el título de anticuerpo. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Preferiblemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden producir en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, los agentes de agregación, tales como el alumbre, se utilizan de forma adecuada para potenciar la respuesta inmune.

Anticuerpos monoclonales

[0213] Varios métodos para producir anticuerpos monoclonales en el presente documento están disponibles en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), mediante métodos de ADN recombinante (patente de Estados Unidos No. 4,816,567).

[0214] En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmunizan como se ha descrito anteriormente para conseguir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Coding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press. 1986)).

[0215] Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las

células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirán habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

5 [0216] Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, contribuyen a una producción estable a un nivel elevado de anticuerpo por las células seleccionadas productoras de los anticuerpos, y son sensibles a un medio, tal como medio HAT. Entre éstas, las líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk
10 Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); y Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

15 [0217] Se ensaya el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante la inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

20 [0218] La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

25 [0219] Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos contra la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press, 1986)). Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPM1-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

30 [0220] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

35 [0221] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de ningún otro modo producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Entre los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo se incluyen Skerra et al., *Curr. Opinión in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol Revs.*, 130:151-188 (1992).

45 [0222] En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos generados utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Las posteriores publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (rango de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks et al., *Biol. Technology*, 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas convencionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

55 [0223] El ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o mediante unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es inmunoglobulina.

60 [0224] Habitualmente, dichos polipéptidos que no son inmunoglobulinas se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo divalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

65

Anticuerpos humanizados

[0225] Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos se han descrito en la técnica. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos importados, que habitualmente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos contra roedores.

[0226] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado "mejor-ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo contra roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. A continuación, la secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta como la región de estructura humano (FR) 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 de estructura particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región de estructura se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

[0227] Es también importante que los anticuerpos se humanicen manteniendo una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles normalmente y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos que muestran y visualizan probables estructuras conformaciones tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La observación de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir del receptor y secuencias importadas, de manera que se consigue la característica del anticuerpo deseado, tal como una mayor afinidad para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

[0228] El ejemplo 3 siguiente describe la producción de anticuerpos contra HER2 humanizados de ejemplo que se unen a ErbB2 y se bloquean la activación por el ligando de un receptor de HER. El anticuerpo humanizado de particular interés aquí bloquea la activación mediada por EGF, TGF- α y/o HRG de MAPK esencialmente de manera tan eficaz como el anticuerpo monoclonal 2C4 murino (o un fragmento Fab del mismo) y/o se une a HER2 esencialmente de manera tan eficaz como el anticuerpo monoclonal 2C4 murino (o un fragmento Fab del mismo). El anticuerpo humanizado de la presente invención puede comprender, por ejemplo, residuos de la región hipervariable no humanos incorporados en un dominio pesado variable humano y puede comprender además una sustitución en la región de estructura (FR) en una posición seleccionada del grupo que consiste en 69H, 71H y 73H utilizando el sistema de numeración del dominio variable establecido en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones en FR en dos o todas las posiciones 69H, 71H y 73H.

[0229] Un anticuerpo humanizado de ejemplo de interés de la presente invención comprende residuos determinantes de complementariedad del dominio pesado variable GFTFTDYTMX, donde X es preferiblemente D o S (SEC ID NO: 7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEC ID NO: 8); y/o NLGPSFYFDY (SEC ID NO: 9), que comprende opcionalmente modificaciones de aminoácidos de estos residuos de CDR, por ejemplo, donde las modificaciones mantienen o mejorar esencialmente la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante del anticuerpo contra interés puede tener de aproximadamente uno a aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR pesadas variables anteriores. Dichas variantes de anticuerpo se pueden preparar mediante maduración por afinidad, por ejemplo, tal como se describe a continuación. El anticuerpo humanizado más preferido comprende la secuencia de aminoácidos del dominio pesado variable en la SEC ID No. 4.

[0230] El anticuerpo humanizado puede comprender residuos determinantes de complementariedad del dominio ligero variable KASQDVSIGVA (SEC ID NO: 10); SASYX1X2X3, donde X1 es preferiblemente R o L, X2 es preferiblemente Y o E, y X3 es preferiblemente T o S (SEC ID NO: 11); y/o QQYYIYPYT (SEC ID NO: 12), por ejemplo, adicionalmente a los residuos de CDR de dominio pesado variable en el párrafo anterior. Dichos

anticuerpos humanizados comprenden opcionalmente modificaciones de aminoácidos de los residuos de CDR anteriores, por ejemplo, donde las modificaciones mantienen o mejoran esencialmente la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo contra interés puede tener de aproximadamente uno a aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR ligeras variables anteriores. Dichas variantes de anticuerpo se pueden preparar mediante maduración por afinidad, por ejemplo, tal como se describe a continuación. El anticuerpo humanizado más preferido comprende la secuencia de aminoácidos del dominio ligero variable en la SEC ID No. 3.

[0231] La presente invención también contempla anticuerpos madurados por afinidad que se unen a HER2 y bloquean la activación por ligando de un receptor de HER. El anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, por ejemplo, uno que comprende las secuencias ligeras y/o pesadas variables de las SEC ID Nos. 3 y 4, respectivamente (es decir, que comprende la VL y/o VH de pertuzumab). El anticuerpo madurado por afinidad se une preferiblemente al receptor de HER2 con una afinidad superior a la de 2C4 murino o pertuzumab (por ejemplo, desde aproximadamente dos o aproximadamente cuatro veces hasta aproximadamente 100 veces o aproximadamente 100 veces de mejora en la afinidad, por ejemplo tal como se valora utilizando un ELISA de dominio extracelular (ECD) de HER2). Ejemplos de residuos de CDR pesada variable para la sustitución incluyen H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, o combinaciones de dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o siete de estos residuos). Ejemplos de residuos de CDR ligera variable para la alteración incluyen L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 o combinaciones de dos o más (por ejemplo, dos a tres, cuatro, cinco o hasta aproximadamente diez de estos residuos).

[0232] Se contemplan varias formas del anticuerpo humanizado o el anticuerpo madurado por afinidad. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como una Fab, que está opcionalmente conjugado con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto. El anticuerpo IgG1 intacto preferido comprende la secuencia de cadena ligera en la SEQ ID NO: 13 y la secuencia de cadena pesada en la SEQ ID NO: 14.

Anticuerpos humanos

[0233] 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 repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen la región de unión (J_H) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y en la línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en estos ratones mutantes en la línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación con antígenos. Ver, por ejemplo Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-2555 (1993); Jakobovits et al., Nature 362, 255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7: 33 (1993); y las Patentes de Estados Unidos 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807. Alternativamente, la tecnología de expresión de fagos (McCafferty et al., Nature 348, 552-553 [1990]) se puede utilizar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en el marco de un gen de proteína de recubrimiento principal o secundario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena única del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Así, el fago mimetiza alguna de las propiedades de la célula B. La expresión del fago se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión ver, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3, 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la expresión de fagos. Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991) aislaron un conjunto diverso de anticuerpos contra anti-oxazolona a partir de una pequeña librería combinatoria aleatoria de genes V derivados de bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos en un conjunto diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente 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). Véase también las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.565.332 y 5.573.905.

[0234] Tal como se ha descrito anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos mediante células B activadas *in vivo* (véase las Patentes de Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275).

[0235] Los anticuerpos contra HER2 humanos se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.772.997 concedida el 30 de junio de 1998 y WO97/00271 publicada el 3 de enero de 1997.

Fragmentos de anticuerpos

[0236] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos que comprenden una o

más regiones de unión a antígeno. Habitualmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, 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 se pueden producir actualmente directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos en fagos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E coli* y pueden acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otra estrategia, los fragmentos F(Ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el técnico de la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo contra elección es una fragmento Fv de cadena única (scFv). Véase WO 93/16185; Patente de Estados Unidos No. 5.571.894; y Patente de Estados Unidos No. 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

15 *Anticuerpos biespecíficos*

[0237] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión con por lo menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes de la proteína HER2. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a HER2 con un sitio o sitios de unión por EGFR, HER3 y/o HER4. Alternativamente, un brazo de HER2 puede combinarse con un brazo que se une a una molécula inductora en un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2 o CD3) o receptores Fc para IgG (FCγR), tales como FCγRI (CD64), FCγRII (CD32) y FCγRIII (CD16) con el fin de centrar los mecanismos de defensa celulares en la célula que expresa HER2. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan HER2. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a HER2 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos contra longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

[0238] WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico HER2/FCγRIII y la Patente de Estados Unidos 5.837.234 describe un anticuerpo biespecífico de HER2/FCγRI IDM1 (Osidem). En WO98/02463 se muestra un anticuerpo biespecífico de HER2/Fcα. La Patente de Estados Unidos No. 5.821.337 describe un anticuerpo biespecífico de HER2/CD3. MDX-210 es un anticuerpo biespecífico de HER2-FcγRIII.

[0239] Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción habitual de anticuerpos específicos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda y los rendimientos de producto son bajos. En WO 93/08829 y en Trauneker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) se describen procesos similares.

[0240] Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se produce preferiblemente con una dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para la unión a cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen particular importancia.

[0241] En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera sencilla de separación. Esta estrategia se describe en WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

[0242] Según otra estrategia descrita en la Patente de Estados Unidos No. 5.731.168, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivos de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante del anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

[0243] Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, y el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir las células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980 junto con un grupo de técnicas de reticulación.

[0244] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se descomponen proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0245] El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico F(ab')₂ completamente humanizado. Cada fragmento de Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor de HER2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

[0246] Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diabody" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

[0247] Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Otras modificaciones en la secuencia de aminoácidos

[0248] Se contempla la modificación o modificaciones en la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante la introducción de cambios apropiados de nucleótidos en el ácido nucleico del anticuerpo o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución se realiza hasta llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los

cambios de aminoácidos también pueden alterar procesos post-traduccionales del anticuerpo, tales como el cambio del número o posición de sitios de glicosilación.

5 [0249] Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son posiciones preferidas para la mutagénesis se denomina “mutagénesis por rastreo de alanina”, tal como se describe por Cunningham y Wells Science, 244: 1081-1085 (1989). Aquí, se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferiblemente alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas posiciones de aminoácidos que demuestran una sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación mediante la introducción de variantes adicionales u otras variantes en los sitios de sustitución o para los mismos. De este modo, mientras que el sitio para la introducción de una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminada, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar la acción de una mutación en un sitio determinado, se realiza la mutagénesis de rastreo de alanina o aleatorio en el codón o región diana y se criban las variantes de anticuerpo expresadas por la actividad deseada.

20 [0250] Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxi terminales que varían de longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencias de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Entre los ejemplos de inserciones terminales se incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al N o C terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media del anticuerpo en el suero.

25 [0251] Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen por lo menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituida por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en la FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de “sustituciones preferidas”. Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados “ejemplos de sustituciones”, en la siguiente tabla o tal como se describe posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y cribar los productos.

Tabla 1

Residuo original	Ejemplos de sustituciones	Substituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (U)	glu;	glu
Cys(C)	ser;	ser
Gln(Q)	asn;	asn
Glu(E)	asp;	asp
Gly(G)	pro; ala	ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu(L)	Norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

35 [0252] Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se realizan mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hélice o lámina, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar según las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, in Biochemistry, segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

no polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
 polar no cargado: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

ácido: Asp (D), Glu (E)
básico: Lys (K), Arg (R), His(H)

5 [0253] Alternativamente, los residuos naturales se pueden dividir en grupos basados en propiedades comunes de la cadena lateral:

hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
10 ácidos: Asp, Glu;
básicos: His, Lys, Arg;
residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
aromático: Trp, Tyr, Phe.

15 [0254] Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

[0255] También se puede sustituir, generalmente por serina, cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. En cambio, se pueden añadir el enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

20

[0256] Un tipo particularmente preferido de variante por sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación al anticuerpo parental del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes por sustitución implica la maduración por afinidad utilizando la expresión en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de esta manera se expresan de manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetados en cada partícula. A continuación, las variantes expresadas en el fago se criban por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se describe en la presente invención. Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede aplicar la mutagénesis por rastreo de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura del cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el HER2 humano. Dichos residuos de contacto y residuos próximos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en la presente invención. Una vez se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se describe en la presente invención y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para un desarrollo posterior.

25

30

35

40

[0257] Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por alteración se entiende la eliminación de uno o más grupos carbohidratos hallados en el anticuerpo, y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

45

[0258] La glicosilación de anticuerpos es habitualmente por unión a N u O. La unión a N se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. La glicosilación por unión a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina.

50

[0259] La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza de manera conveniente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos, de manera que contenga una o más de las secuencias tripéptido descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición o sustitución por uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O).

55

[0260] Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a la misma. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2003/0157108 A1, Presta, L. Véase también US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bifurcada en el carbohidrato unido a la región Fc del anticuerpo se referencia en WO03/011878, Jean-Mairet et al. y patente de Estados Unidos No. 6.602.684, Umana et al. Los anticuerpos con por lo menos un residuo

60

65

de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se describen en WO97/30087 Patel et al. Véase también, WO98/58964 (Raju, S.) y WO99/22764 (Raju, S.) referentes a anticuerpos con el carbohidrato unido a la región Fc de los mismos..

5 [0261] Puede ser deseable modificar el anticuerpo contra la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, para aumentar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, el residuo o
10 residuos de cisteína se pueden introducir en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una mayor citólisis mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Véase Caron et al., J. Exp. Med. 176: 1191-195 (1992) y Schopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con mayor actividad antitumoral también se pueden preparar utilizando reticuladores heterobifuncionales tal como se describe en Wolff et al. Cancer Research 53: 2560-2565 (1993).
15 Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y puede tener por tanto una mayor capacidad de lisis de complemento y ADCC. Véase Stevenson et al. anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

[0262] WO00/42072 (Presta, L.) describe anticuerpos con función ADCC mejorada en presencia de células efectoras humanas, donde los anticuerpos comprenden sustituciones de aminoácidos en la región Fc de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo con ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración de residuos Eu). Preferiblemente, la región de Fc alterada es una región Fc de IgG1 humana que comprende o consiste en sustituciones de uno, dos o tres de estas posiciones. Dichas sustituciones se combinan opcionalmente con una sustitución o sustituciones que incrementan la unión de Clq y/o CDC.

25 [0263] Los anticuerpos con la unión a Clq y/o citotoxicidad dependiente de complemento alteradas se describen en WO99/51642, patente de Estados Unidos No. 6,194,551 B1, patente de Estados Unidos No. 6,242,195B1, patente de Estados Unidos No. 6,528,624B1 y patente de Estados Unidos No. 6,538,124 (Idusogie et al.). Los anticuerpos comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones de aminoácido 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de la región Fc de los mismos (numeración de residuos Eu).

30 [0264] Para incrementar la vida media del anticuerpo en el suero, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor salvaje en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.739.277, por ejemplo. Tal como se utiliza aquí, el término "epítipo de unión a receptor salvaje" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable del incremento en la vida media de la molécula IgG en el suero *in vivo*.

[0265] Los anticuerpos con una unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), y semividas incrementadas, se describen en WO00/42072 (Presta, L.) y US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejorar la unión de la región Fc a FcRn. Por ejemplo, la
40 región Fc puede tener sustituciones en una o más de las posiciones 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 ó 434 (numeración de residuos Eu). La variante de anticuerpo que comprende la región de Fc preferida con una unión a FcRn mejorada comprende las sustituciones de aminoácidos en una, dos, tres de las posiciones 307, 380 y 434 de la región Fc de la misma (numeración de residuos Eu).

45 [0266] También se contemplan anticuerpos diseñados con tres o más (preferiblemente cuatro) sitios de unión a antígeno funcionales (Solicitud US No. US2002/0004587 A1, Miller et al.).

[0267] Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una serie de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes en las secuencias de aminoácidos naturales) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida de sitio), la mutagénesis de PCR y la mutagénesis de cassette de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

55 *Cribado ("screening") de anticuerpos con las propiedades deseadas*

[0268] Las técnicas para generar anticuerpos se han descrito anteriormente. Se seleccionan anticuerpos que tienen ciertas características biológicas según se desee.

60 [0269] Para identificar un anticuerpo que bloquea la activación por ligando de un receptor de HER, se puede determinar la capacidad del anticuerpo para bloquear la unión del ligando de HER a células que expresan el receptor de HER (por ejemplo, en conjugación con otro receptor de HER con el que el receptor de HER de interés forma un heterooligómero de HER). Por ejemplo, las células que expresan de forma natural o se transfectan para expresar receptores de HER del heterooligómero de HER se pueden incubar con el anticuerpo y, a continuación, exponerse a
65 ligando de HER marcado. A continuación, se puede evaluar la capacidad del anticuerpo para bloquear la unión del ligando al receptor de HER en el heterooligómero de HER.

[0270] Por ejemplo, la inhibición de la unión de HRG a las líneas de células tumorales de mama MCF7 por anticuerpos HER2 se puede realizar utilizando cultivos de MCF7 en monocapas en hielo en un formato de placas de 24 pocillos esencialmente tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6,949,245. Se pueden añadir anticuerpos monoclonales HER2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos. A continuación, se pueden añadir rHRG β ₁₁₇₇₋₂₂₄ marcado con ¹²⁵I (25 μ m) y la incubación se puede continuar durante 4 a 16 horas. Se pueden preparar curvas de dosis-respuesta y se puede calcular un valor IC₅₀ para el anticuerpo contra interés. En una realización, el anticuerpo que bloquea la activación por ligando de un receptor de HER tendrá una IC₅₀ para inhibir la unión de HRG a células MCF7 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferiblemente 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab, la IC₅₀ para inhibir la unión de HRG a células MCF7 en este ensayo puede ser, por ejemplo, aproximadamente 100 nM o menos, más preferiblemente 50 nM o menos.

[0271] Alternativamente, o adicionalmente, se puede evaluar la capacidad de un anticuerpo para bloquear la fosforilación de tirosina de un receptor de HER presente en un heterooligómero de HER estimulada por un ligando de HER. Por ejemplo, las células que expresan de forma endógena los receptores de HER o se transfectan para expresarlos se pueden incubar con el anticuerpo y, a continuación, analizar la actividad de fosforilación de tirosina dependiente del ligando de HER utilizando un anticuerpo monoclonal antifosfotirosina (que está opcionalmente conjugado con un marcador detectable). El ensayo de activación del receptor quinasa descrito en la patente de Estados Unidos No. 5.766.963 también está disponible para determinar la activación del receptor de HER y el bloqueo de esa actividad por un anticuerpo.

[0272] En una realización, se puede cribar un anticuerpo que inhibe la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina p180 en células MCF7 esencialmente tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6,949,245. Por ejemplo, las células MCF7 se pueden emplazar en placas de 24 pocillos y se pueden añadir anticuerpos monoclonales para HER2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente; a continuación se puede añadir rHRG β ₁₁₇₋₂₄₄ a cada pocillo hasta una concentración final de 0,2 nM y la incubación se puede continuar durante 8 minutos. Se puede aspirar el medio de cada pocillo y las reacciones se pueden detener mediante la adición de 100 μ l de tampón muestra de SDS (5% SDS, 25 mM DTT, y 25 mM de tris-HCl, pH 6,8). Cada muestra (25 μ l) se puede pasar por electroforesis en un gel de gradiente 4-12% (Novex) y, a continuación, se puede transferir por electroforesis a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Se pueden revelar inmunotransferencias de antifosfotirosina (a 1 μ /ml) y se puede cuantificar la intensidad de la banda reactiva predominante a Mr - 180.000 mediante densitometría de reflectancia. El anticuerpo seleccionado preferiblemente inhibirá significativamente la estimulación por HRG de la fosforilación de la tirosina p180 hasta aproximadamente 0-35% del control en este ensayo. Se puede preparar una curva dosis-respuesta para la inhibición de la estimulación de HRG de la fosforilación de tirosina p180 determinada mediante densitometría de reflectancia y se puede calcular una IC₅₀ para el anticuerpo contra interés. En una realización, el anticuerpo que bloquea la activación por ligando de un receptor de HER tendrá una IC₅₀ para inhibir la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina p180 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferiblemente 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab, la IC₅₀ para inhibir la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina p180 en este ensayo puede ser, por ejemplo, aproximadamente 100 nM o menos, más preferiblemente 50 nM o menos.

[0273] Se puede evaluar también los efectos inhibidores del crecimiento del anticuerpo en células MDA-MB-175, por ejemplo, esencialmente tal como se describe en Schaefer et al. Oncogene 15: 1385-1394 (1997). Según este ensayo, las células MDA-MB-175 se pueden tratar con un anticuerpo monoclonal de HER2 (10 μ g/mL) durante 4 días y se puede teñir con violeta cristal. La incubación con un anticuerpo contra HER2 puede mostrar un efecto inhibidor del crecimiento en esta línea celular similar a la mostrada por el anticuerpo monoclonal 2C4. En una realización adicional, la HRG exógena no invertirá significativamente esta inhibición. Preferiblemente, el anticuerpo será capaz de inhibir la proliferación celular de células MDA-MB-175 en mayor grado que el anticuerpo monoclonal 4D5 (y opcionalmente en mayor grado que el anticuerpo monoclonal 7F3), ambos en presencia y ausencia de HRG exógena.

[0274] En una realización, el anticuerpo HER2 de interés puede bloquear la asociación dependiente de heregulina de HER2 con HER3 en ambas células MCF7 y SK-BR-3 tal como se determina en un experimento de co-inmunoprecipitación, tal como el descrito en la patente de Estados Unidos No. 6,949,245 sustancialmente de manera más eficaz que el anticuerpo monoclonal 4D5, y preferiblemente sustancialmente de manera más eficaz que el anticuerpo monoclonal 7F3.

[0275] Para identificar los anticuerpos contra HER2 inhibidores del crecimiento, se pueden cribar anticuerpos que inhiben el crecimiento de células cancerosas que sobreexpresan HER2. En una realización, el anticuerpo inhibidor del crecimiento de elección es capaz de inhibir el crecimiento de células SK-BR-3 en un cultivo celular en aproximadamente 20-100% y preferiblemente en aproximadamente el 50-100% a una concentración de anticuerpo contra aproximadamente 0,5 a 30 μ g/ml. Para identificar dichos anticuerpos, se puede realizar un ensayo con SK-BR-3 descrito en la Patente de Estados Unidos No. 5.677.171. Según este ensayo, las células SK-BR-3 se

desarrollan en una mezcla 1:1 de medio F12 y DMEM complementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina y penicilina estreptomina. Las células SK-BR-3 se emplazan en 20.000 células en un plato de cultivo celular de 35 mm (2 ml/placa de 35 mm), se añade por plato de 0,5 a 30 µg/ml del anticuerpo contra HER2. Después de seis días, se cuenta el número de células en comparación con las células no tratadas utilizando un contador celular electrónico COULTER™. Se pueden seleccionar aquellos anticuerpos que inhiben el crecimiento de las células SK-BR-3 en aproximadamente 20-100% o aproximadamente 50-100% como anticuerpos inhibidores del crecimiento. Véase la patente de Estados Unidos 5.677.171 para ensayos de cribado para anticuerpos inhibidores del crecimiento, tales como 4D5 y 3E8.

[0276] A efectos de seleccionar anticuerpos que inducen la apoptosis, existe un ensayo de unión a anexina utilizando células BT474. Las células BT474 se cultivan y desarrollan en placas tal como se describe en el párrafo anterior. A continuación, se extrae el medio y se sustituye por medio nuevo solo o medio que contiene 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal. Después de un periodo de incubación de tres días, se lavan las monocapas con PBD y se separan por tripsinización. A continuación, las células se centrifugan, se resuspenden en tampón de unión a Ca²⁺ y se hacen alícuotas en tubos tal como se ha descrito anteriormente para el ensayo de la muerte celular. A continuación, los tubos reciben anexina marcada (por ejemplo, anexina V-FTIC) (1 µg/ml). Las muestras se pueden analizar utilizando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ de CellQuest (Becton Dickinson). Se seleccionan los anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina en relación con el control como anticuerpos inductores de apoptosis. Además del ensayo de unión a anexina, existe un ensayo de tinción de ADN que utiliza células BT474. A efectos de realizar este ensayo, se incuban células BT474 que se han tratado con el anticuerpo contra interés tal como se describe en los dos párrafos anteriores, con 9 µg/ml de HOECHST 33342™ durante 2 horas a 37°C, a continuación se analizan en un citómetro de flujo EICS ELITE™ (Coulter Corporation) utilizando software MODFIT LT™ (Verity Software House). Los anticuerpos que inducen un cambio en el porcentaje de células apoptóticas que es 2 veces o superior (y preferiblemente 3 veces o superior) que las células no tratadas (hasta el 100% de células apoptóticas) se pueden seleccionar como anticuerpos proapoptóticos utilizando este ensayo. Véase WO98/17797 para ensayos para el cribado de anticuerpos que inducen la apoptosis, tales como 7C2 y 7F3.

[0277] Para cribar anticuerpos que se unen a un epítipo en HER2 unido por un anticuerpo contra interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado ("cross-blocking assay") de rutina, tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), para evaluar si el anticuerpo bloquea de forma cruzada la unión de un anticuerpo, tal como 2C4 o pertuzumab, a HER2. Alternativamente, o adicionalmente, se puede realizar un mapeo epitópico mediante métodos conocidos en el sector y/o se puede estudiar la estructura de anticuerpo-HER2 (Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)) para ver qué dominio(s) de HER2 está(n) unidos por el anticuerpo.

Métodos para el tratamiento del cáncer

[0278] Los pacientes identificados según la presente invención como probablemente resistentes al tratamiento con inhibidores de HER2, probablemente se beneficiarán de los tratamientos combinados.

[0279] Los tratamientos de combinación pueden incluir quimioterapia conjuntamente con la utilización de un inhibidor de HER2, tal como un anticuerpo contra HER2, por ejemplo, trastuzumab o pertuzumab.

[0280] El objetivo del tratamiento quimioterapéutico del cáncer es curar el paciente o, como mínimo, ralentizar la progresión de la enfermedad, aumentar la supervivencia, reducir la posibilidad de reaparición del cáncer, controlar los síntomas y/o mantener o mejorar la calidad de vida. La quimioterapia varía dependiendo del tipo de cáncer, y, en el caso de tumores sólidos, se puede realizar antes y/o después de la extracción quirúrgica del tumor primario. Para algunos cánceres, existen varias terapias estándar universalmente aceptadas, mientras que el tratamiento de otras no está aún estandarizado.

[0281] Anteriormente se han indicado agentes quimioterapéuticos de ejemplo y en general se clasifican según su mecanismo de acción. Algunos agentes quimioterapéuticos dañan directamente el ADN y ARN. Mediante la alteración de la replicación del ADN, dichos agentes quimioterapéuticos detienen completamente la replicación o dan lugar a la producción de ADN o ARN anticodificante. Esta categoría incluye, por ejemplo, cisplatino (Platinol®), daunorubicina (Cerubidine®), doxorubicina (Adriamycin®), y etopósido (VePesid®). Otro grupo de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer interfieren con la formación de nucleótidos o desoxiribonucleótidos, de manera que se bloquea la síntesis de ARN y la replicación celular. Ejemplos de fármacos en esta clase incluyen metotrexato (Abitrexate®), mercaptopurina (Purinethol®), fluorouracilo (Adrucil®), e hidroxiaurea (Hydrea®). Una tercera clase de agentes quimioterapéuticos realiza la síntesis o rotura de husos mitóticos y, como resultado, interrumpe la división celular. Ejemplos de fármacos en esta clase incluyen vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) y taxenos, tales como, paclitaxel (Taxol®), y docetaxel (Taxotere®). Otras clasificaciones, por ejemplo, basadas en la estructura química de los agentes quimioterapéuticos también son posibles.

[0282] Para el cáncer de mama, la doxorubicina (Adriamycin®) es considerada por la mayoría el agente quimioterapéutico individual más eficaz. Además, el 5-FU se ha utilizado clínicamente durante varias décadas y es el

pilar de muchas terapias de combinación para el cáncer de mama. Otros agentes quimioterapéuticos utilizados habitualmente para el tratamiento del cáncer de mama incluyen, por ejemplo, antraciclinas, derivados de taxano y varias terapias de combinación, tales como quimioterapia con CMF (ciclofosfamida-metotrexato-fluorouracilo). La mayoría de pacientes reciben quimioterapia inmediatamente después de la extirpación quirúrgica del tumor. Esta estrategia se refiere habitualmente como terapia con adyuvante. Sin embargo, la quimioterapia se puede administrar también antes de cirugía, tal como se denomina el tratamiento con neoadyuvante. Aunque la utilización de quimioterapia con neoadyuvante se origina del tratamiento de cánceres de mama avanzadas e inoperables, ha ganado aceptación en el tratamiento otros tipos de cáncer. La eficacia de la quimioterapia con neoadyuvante se ha analizado en varias pruebas clínicas. En la prueba entre múltiples centros del National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18 (NSAB B-18) (Fisher et al., J. Clin. Oncology 15:2002-2004 (1997); Fisher et al., J. Clin. Oncology 16:2672-2685 (1998)), la terapia con neoadyuvante se realizó con una combinación de adriamicina y ciclofosfamida ("pauta AC"). En otra prueba clínica, la terapia con neoadyuvante se administró utilizando una combinación de 5-fluorouracilo (5-flu), epirubicina y ciclofosfamida ("pauta FEC") (van Der Hage et al., J. Clin. Oncol. 19:4224-4237 (2001)). Otras pruebas clínicas también han utilizado pautas de tratamiento con neoadyuvante que contienen taxano. Véase, por ejemplo, Holmes et al., J. Natl. Cancer Inst. 83:1797-1805 (1991) y Moliterni et al., Seminars in Oncology, 24:S17-10-S-17-14 (1999). Para más información sobre quimioterapia con neoadyuvantes para el cáncer de mama, véase, Cleator et al., Endocrine-Related Cancer 9:183-195 (2002).

[0283] El 5-FU, CPT-11 (irinotecan), y el oxaliplatino, administrados solos o combinados, han demostrado ser eficaces en el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado (CRC) (véase, por ejemplo, Grothey et al. (2004) J. Clin. Oncol. 22:1209-15).

[0284] Se ha observado que el cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC) responde bien a la terapia de combinación con vinorelbina, cisplatino y opcionalmente paclitaxel (véase, por ejemplo Rodríguez et al. (2004) Am. J. Clin. Oncol. 27:299-303).

[0285] Las pautas terapéuticas para el tratamiento de otros tipos de cáncer también son conocidas por los expertos en la materia.

[0286] En el siguiente ejemplo no limitante se describirán más detalles de la invención.

Ejemplo

Identificación de marcadores de resistencia a trastuzumab en cáncer de mama con HER2+

[0287] El HER2 se sobreexpresa mediante la amplificación génica en aproximadamente el 20% de los cánceres de mama. Se sabe que la amplificación del gen de HER2 conduce a un nivel significativamente superior de la expresión del receptor de HER2 en comparación con células normales: por ejemplo, IHC3+ = 1×10^6 receptores/célula (células normales = 2×10^4). También se sabe que la amplificación de HER2 está asociada con un grado tumoral superior, una positividad de nódulos linfáticos y un pronóstico malo y el estado de HER2 en la metástasis está altamente correlacionado con el estado de HER2 en el tumor primario.

[0288] Aunque el trastuzumab ha sido altamente satisfactorio en el tratamiento de tumores positivos en HER2, tal como cáncer de mama positivo en HER2, ciertos tumores no son sensibles o muestran o desarrollan resistencia al tratamiento con trastuzumab.

[0289] Utilizando una línea celular que es conocida por ser sensible al trastuzumab in vitro (BT474), se realizó un cribado con ARNsi para identificar genes que cuando se eliminan (o desactivan) conducen a la inducción de la resistencia a trastuzumab in vitro. Los resultados obtenidos validados del cribado son marcadores de diagnóstico candidatos de la resistencia a trastuzumab in vivo.

Métodos:

[0290] *Línea celular y ensayo:* Se utilizó la línea celular BT474, que es positiva en HER2 y sensible a trastuzumab in vitro. En base a la información en la literatura, se utilizaron PTEN y p27 como controles positivos para desarrollar un ensayo para el cribado. Se ha descrito que la eliminación de PTEN y p27 reduce la capacidad del trastuzumab para disminuir la proliferación celular in vitro. Este efecto se ha observado en el presente estudio también y se utilizaron estos controles positivos para optimizar el ensayo. Se observó que el método más eficaz de determinar la respuesta del trastuzumab in vitro era midiendo la proliferación celular a través de un ensayo de captación de ^3H -timidina. Brevemente, se distribuyeron ARNsi y lipofectamina sobre placas de 96 pocillos. A continuación, las células se emplacaron sobre el ARNsi alícuotado y a las 24 horas, se añadió trastuzumab a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$. A las 72 horas, se añadió ^3H -timidina a los cultivos. Se midió la cantidad de ^3H incorporado utilizando una placa celular de 96 pocillos cultivada en el día 4 (indicado en la figura 1).

[0291] *Cribado de ARNsi:* se optimizó el cribado para un cribado automatizado utilizando un formato de placa de 96 pocillos utilizando luciferasa o controles no marcadores como control negativo y PTEN y p27 como control positivo

(Figuras 2 y 3). El formato de cribado finalizado se representa en la figura 4. Utilizando este método, se cribaron las quinasas y fosfatasa de Dharmacon, que cubrían 979 genes (779 genes de una biblioteca de quinasas y 200 genes de una biblioteca de fosfatasa) y se analizaron con 4 ARNsi cribados individualmente contra cada gen.

5 [0292] *Análisis de los datos*: Los datos se analizaron de varias maneras. Un método fue normalizar los datos a varios controles que incluyen controles negativos, los controles positivos o al promedio de la placa (figura 5). Se consideró que un gen era un resultado positivo si por lo menos 2 de los 4 oligos de ARNsi estaban por encima de un umbral del valor z de 1,5. Los datos también se analizaron manualmente mediante la representación de los datos y la identificación de los puntos que eran superiores a 1,5 desviaciones estándar por encima de la media para el control no marcador, de nuevo considerando un mínimo de 2 de los 4 oligos de ARNsi que puntuaban positivo como un resultado positivo (figura 6).

Resultados:

15 [0293] *Datos de cribado primario*: A partir del análisis de los datos del cribado, se identificaron 25 genes como resultados positivos a partir de la biblioteca de quinasas mediante todos los métodos de análisis de datos que se utilizaron (figura 7). Se observó que los 5 genes adicionales que se identificaron manualmente estaban muy próximos al umbral en el análisis bioestadístico y se incluyeron en la siguiente etapa. Ambos controles positivos, PTEN y p27, estaban en las placas cribadas inicialmente (biblioteca de quinasas y una placa de biblioteca de fosfatasa) y se identificaron como resultados positivos, sugiriendo que el cribado se realizó correctamente para detectar el tipo de resultados positivos de interés. Los resultados positivos se encontraban en varias categorías de potencial interés que incluían reguladores del ciclo celular, elementos principales en la señalización cascada abajo de los receptores de tirosina quinasa, y varias otras categorías (figura 8).

25 [0294] *Validación de resultados positivos*: Para la validación posterior, nos centramos en 28 genes de este cribado inicial. Esto incluye los 30 indicados anteriormente menos los dos controles positivos PTEN y p27 que ya se han validado en otros estudios. Se utilizaron dos métodos para la validación. En primer lugar, se recribaron los ARNsi en células BT474 para determinar si la observación se repetiría en el mismo sistema. A continuación, los genes también se cribaron en una línea celular diferente (SKBR3) que también es positiva en HER2 y sensible a trastuzumab. Ejemplos de cómo se realizaron los controles positivos PTEN y p27 en los cribados de validación se muestra en la figura 9. Los 28 resultados positivos (diferentes de PTEN y p27) del cribado primario se indican en la figura 10 junto con los resultados del cribado de repetición y el cribado en células SKBR3. Algunos de los candidatos más prometedores considerando la acción en los cribados de validación se indican sombreados.

35 [0295] En un cribado posterior más pequeño, se cribaron las placas de bibliotecas de fosfatasa restantes (diferentes de la placa que contenía PTEN que se cribó con la biblioteca de quinasas). Los resultados del análisis de todas las placas de fosfatasa se muestran en la figura 11. Se identificó PTEN como un resultado positivo de 3 oligos mediante dos métodos. Hubo 3 genes adicionales que eran resultados positivos de por lo menos 2 oligos mediante todos los métodos de normalización y se indican sombreados en la lista de resultados positivos de la figura 11.

45 [0296] Otro método de validación fue examinar los datos de GeneLogic para determinar si cualquiera de los genes mostraba evidencias de la menor expresión en cáncer de mama positivo en HER2 en comparación con tejido de mama normal o con cáncer de mama negativo en HER2. Cuatro genes mostraron dicho patrón, SOCS5, LATS2, PTPN11, y DYRK1A y de este modo valía la pena un seguimiento adicional incluso si los datos del cribado de validación no eran tan importantes (por ejemplo, LATS2) (Figura 12).

50 [0297] Los resultados positivos principales en base al fenotipo más fuerte y los resultados positivos de más de 2 oligos (PPM1H, DYRK1A, STK10, y PTPN11) se muestran en la figura 13.

[0298] Las figuras 14 y 15 muestran ejemplos de los resultados positivos principales del aumento de la proliferación celular en células BT474 y células BT474-M1 tratadas con trastuzumab.

55 [0299] La figura 16 muestra los resultados de captación de ³H-timidina y los ensayos luminiscentes de titulación de células y demuestran que la proliferación incrementada a los 3 días (a) está asociada con un incremento del número de células a los 7 días (b).

[0300] La figura 17 muestra que la eliminación de los genes candidatos también atenúa la respuesta de lapatinib en múltiples líneas celulares (PPM1H en particular).

60 [0301] La figura 18 muestra que PPM1H y PTPN11 regulan negativamente el eje de señalización de HER3/PI3K.

[0302] Los datos indicados en la figura 19 muestran que la eliminación de los cuatro genes candidatos (PPM1H, PTPN11, DYK1A y STK10) puede incrementar la fosforilación de Akt.

65

[0303] En base a estos datos experimentales, PPM1H parece ser un indicador particularmente útil y fiable de la resistencia a trastuzumab. Esta molécula pertenece a la familia de proteínas de fosfatasa 2C y es conocida por jugar un papel en otros tipos de células, tales como el crecimiento externo de neuritas y el posible papel oncogénico en el adenocarcinoma de colon. Otros miembros de la familia identificados en este documento se han relacionado con diversos mecanismos, por ejemplo, PP2C α y β se unen a CDK2/CDK6; ILKAP esta relacionada con la señalización de integrina/GSK-beta; PHLPP I a pAkt fosfatasa, y se ha observado que PP2C γ ?FIN13 de ratón regula negativamente el crecimiento.

[0304] La figura 20 es un cladograma que muestra los miembros de la familia de PPM1.

[0305] La figura 21 muestra que PPM1M y PPM1J también atenúan la respuesta de trastuzumab in vitro, sin embargo más débil que PPM1H.

[0306] Los resultados mostrados en la figura 22 muestran que la eliminación de PPM1M también disminuía la respuesta de Lapatinib in vitro.

[0307] A partir de estos datos parece que PPMH1 presenta funciones similares a otros miembros de la familia de PP2C. En particular, sin unirse a ninguna teoría, se cree que PPMH1 puede funcionar como pAkt fosfatasa similar a otro miembro de la familia, PHLPP para desfosforilar la P-Akt1 (S473).

[0308] Sin embargo, el PPM1H también es diferente y puede tener una función nueva, diferente de la de otros miembros de la familia de PP2C. Esta nueva función es la modulación de la señalización cascada arriba de HER3. De este modo, el PP2C puede funcionar como otro miembro de la familia de PP2C, ILKAP, para regular indirectamente la señalización de GSK3/ciclina D1 y de este modo modular el eje de señalización de PI3K/Akt en cascada abajo de pAkt.

[0309] Se ha observado que diversos genes (PTEN, CDKN1B, PPM1H, PTPN11, PPM1A, PPM1J) identificados mediante los cribados descritos en la presente invención muestran una expresión disminuida en líneas celulares de tipo basal y los tumores (véase la tabla 2). Esto es de gran importancia, ya que la expresión de tipo basal se ha asociado negativamente con un resultado negativo en pacientes negativos de HER2.

[0310] Aunque en la descripción anterior de la invención se ilustra con referencia a ciertas realizaciones, no está limitada a las mismas. De hecho diversas modificaciones de la invención adicionalmente a las mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y se encontrarán dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0311]

<110> GENENTECH, INC.

<120> MARCADORES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LA RESISTENCIA TUMORAL AL TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE HER2

<130> SMW/FP6838981

<140> EP

<141> 2008-06-04

<150> EP 08756683.2

<151> 2008-06-04

<150> pct/us2008/065766

<151> 2008-06-04

<150> 60/942,906

<151> 2007-06-08

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)
 <223> /sustituir="Ser"

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)
 <223> /nota="Residuo proporcionado en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de la anotación para dicha posición"

15 <400> 1
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Asp
 1 5 10

20 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 2
 Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

35 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 3
 Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

50 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 4
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
 1 5 10

65 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

```

5   <220>
    <221> VARIANTE
    <222> (5)
    <223> /sustituir="Leu"

10  <220>
    <221> VARIANTE
    <222> (6)
    <223> /sustituir="Glu"

15  <220>
    <221> VARIANTE
    <222> (7)
    <223> /sustituir="Ser"

20  <220>
    <221> misc_feature
    <222> (5)..(7)
    <223> /nota="Residuos proporcionados en la secuencia no tienen preferencia
    con respecto a los de la anotación para dicha posición"

25  <400> 5
    Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
     1           5

30  <210> 6
    <211> 9
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

35  <220>
    <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

    <400> 6
    Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
     1           5

40

```

REIVINDICACIONES

1. Método de predicción de la probabilidad de respuesta de un paciente humano con cáncer de mama diagnosticado con un tumor de mama que expresa HER2 al tratamiento con un inhibidor de HER2, que comprende
 5 determinar, en una muestra de tumor obtenida de dicho sujeto, el nivel de expresión de transcritos de ARN o sus productos de expresión del gen de PTPN11,
 en el que un nivel inferior de la expresión en relación con el nivel de expresión de un gen presente en la misma célula, que se sabe que está regulado por descenso en los pacientes que muestran resistencia al tratamiento con
 10 inhibidor de HER2, o un nivel inferior de expresión en relación con el nivel de expresión del gen de PTPN11 en una célula normal del mismo tipo de célula, indica que el sujeto es probablemente resistente al tratamiento con el inhibidor de HER2.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el diagnóstico incluye la cuantificación del nivel de expresión de HER2, y opcionalmente, en el que el nivel de expresión de HER2 se cuantifica mediante inmunohistoquímica (IHC)
 15 y/o hibridación fluorescente in situ (FISH).
3. Método según la reivindicación 2, en el que el nivel de expresión de HER2 se cuantifica mediante inmunohistoquímica (IHC) y/o hibridación fluorescente in situ (FISH) y el cáncer expresa HER2 por lo menos a un nivel 1+.
 20
4. Método según la reivindicación 3, en el que el cáncer expresa HER2 por lo menos a un nivel 2+ o a un nivel 3+.
5. Método según la reivindicación 1, en el que el cáncer de mama es cáncer de mama metastásico.
- 25 6. Método según la reivindicación 1, en el que se determina el nivel de expresión del transcrito de ARN o el producto de expresión del gen.
7. Método según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de HER2 es un agente que interfiere con la activación o la función de HER2, opcionalmente en el que el inhibidor de HER2 es un anticuerpo contra HER o fragmento de
 30 anticuerpo contra HER, un antagonista de HER2 de molécula pequeña, un inhibidor de tirosina quinasa de HER2, o una molécula antisentido.
8. Método según la reivindicación 7, en el que el inhibidor de HER2 es un anticuerpo contra HER2 que inhibe la separación del ectodominio de HER2, bloquea la activación por ligando de un receptor de HER, inhibe la
 35 dimerización de HER2, o se une al sitio de unión heterodimérica de HER2.
9. Método según la reivindicación 7, en el que el inhibidor de HER2 es un anticuerpo contra HER2 o fragmento de anticuerpo contra HER2 que se une al epítipo 4D5, en el que el anticuerpo contra HER2 o fragmento de anticuerpo
 40 contra HER2 se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en los anticuerpos humanizados huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6 y huMAb4D5-7, y trastuzumab, y fragmentos de los mismos.
10. Método según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo contra HER2 o fragmento de anticuerpo contra HER2 es trastuzumab o un fragmento del mismo.
 45
11. Método según la reivindicación 7, en el que el inhibidor de HER2 es un anticuerpo contra HER2 o fragmento de anticuerpo contra HER2 que bloquea la activación por ligando de un receptor de HER2 de manera más eficaz que trastuzumab.
- 50 12. Método según la reivindicación 11, en el que el anticuerpo contra HER2 o fragmento de anticuerpo contra HER2 se une al epítipo 2C4, opcionalmente en el que el anticuerpo contra HER2 o fragmento de anticuerpo contra HER2 es pertuzumab o un fragmento del mismo.
13. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra del tumor es de una muestra de tejido de cáncer fijado
 55 bañado en cera de dicho paciente o es un tejido de biopsia central.

Medición de la respuesta con Trastuzumab de la línea celular BT474 amplificada por HER2 mediante un ensayo de incorporación de 3H-timidina

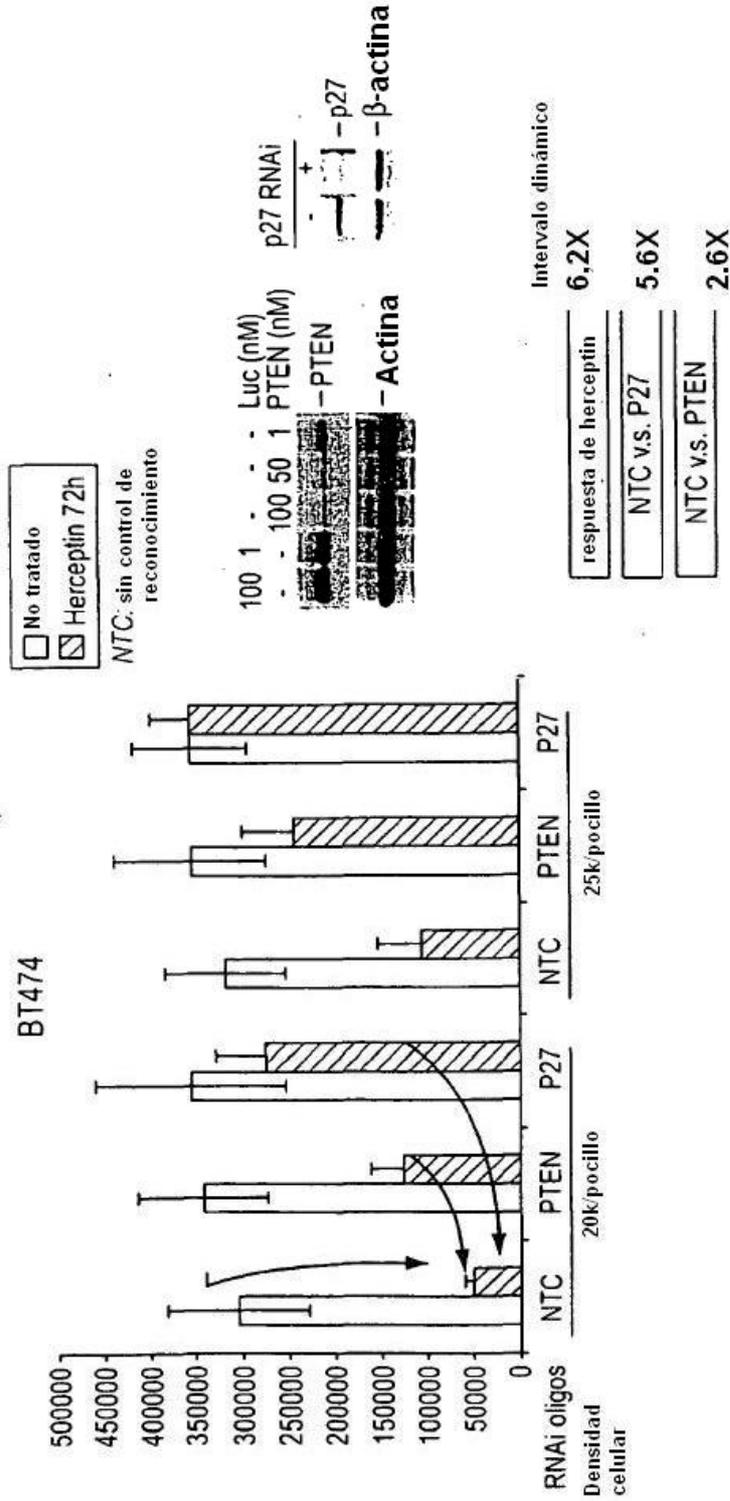


Figura 1

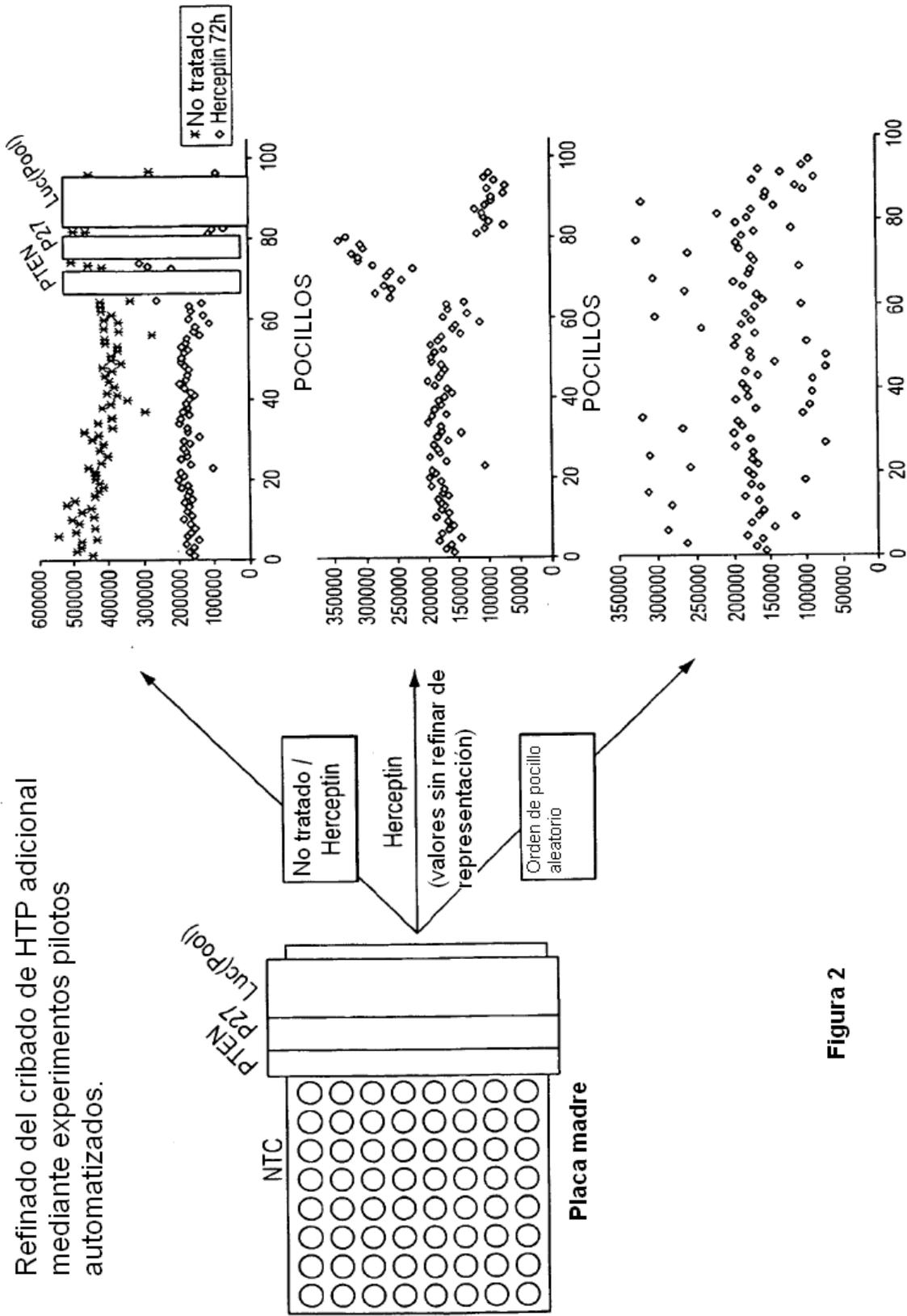


Figura 2

Optimización del coeficiente de ventana -factor Z del cribado

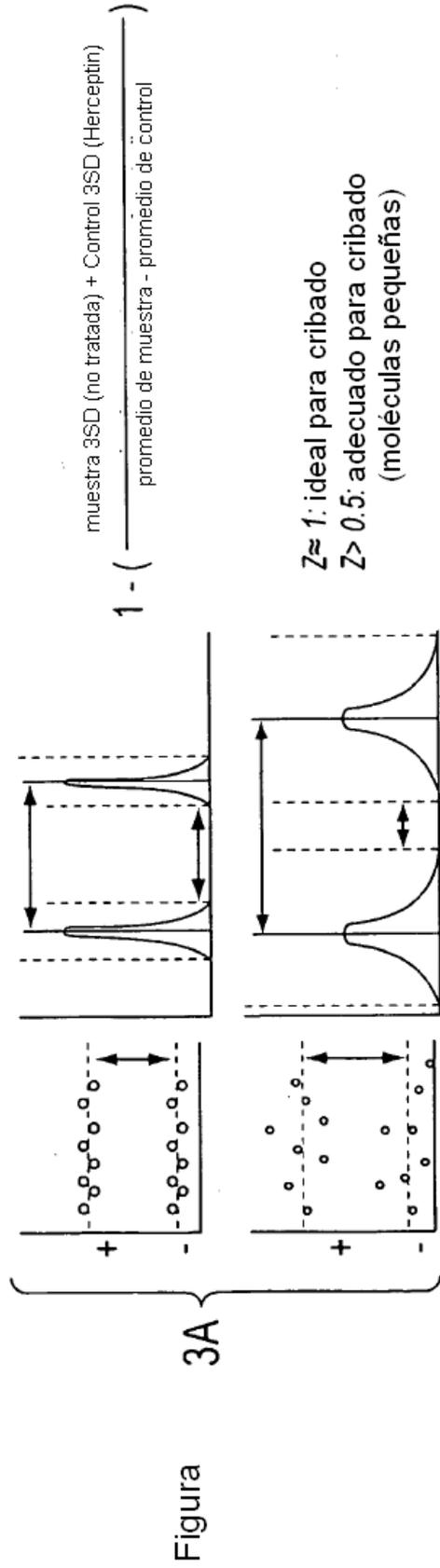


Figura 3A

Figura 3B

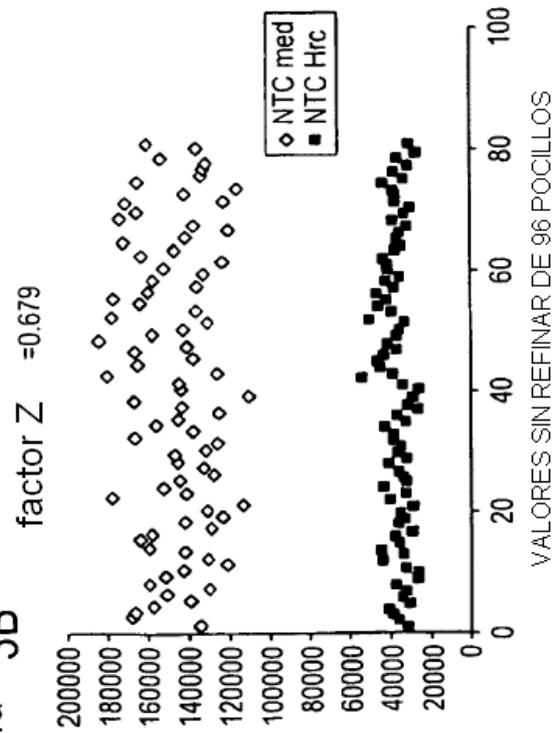
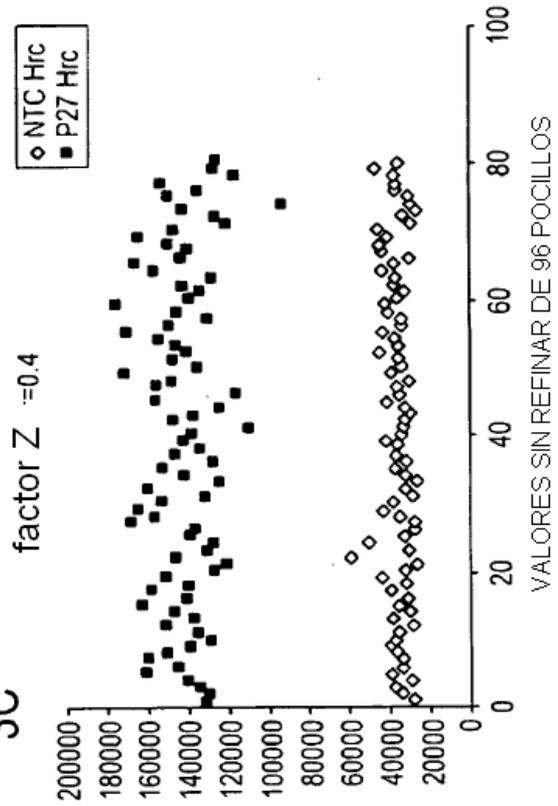


Figura 3C



Resumen del cribado de bibliotecas de fosfatasa

normalización	análisis Li media	z>1.5	pos	neg	Nil	Análisis valores sin refinar
PTEN	3		1	1	3	3
PTPN11	2		2	2	3	3
PPP2R1A	1*		2	3	3	3
KIAA0685	2		2	2	2	2
PPM1H	2		2	2	2	2
SSH3	1		2	2	2	2
MTMR3	1		2	2	1	1
PPP2R2B	0		2	1	1	1
PTENP1	2		1	1	2	2
KIF1B	2		0	0	2	2
MPHOSPH1	2		0	0	2	2

Figura 4A

2 ó 3 resultados de oligos (descarte de resultados mixtos) = 11 (5,5% de la biblioteca)
 2 resultados de oligos (en todos los análisis) = 3 (1,5% de la biblioteca)
 *Promedio de placa no es claro debido a un punto de los datos elevado

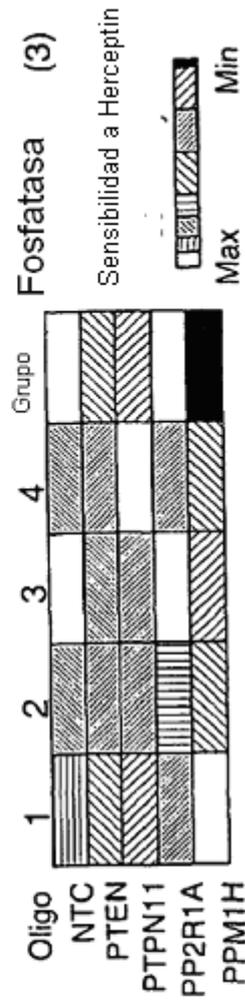


Figura 4B

≥ 3 resultados de oligos + grupo

Análisis estadístico

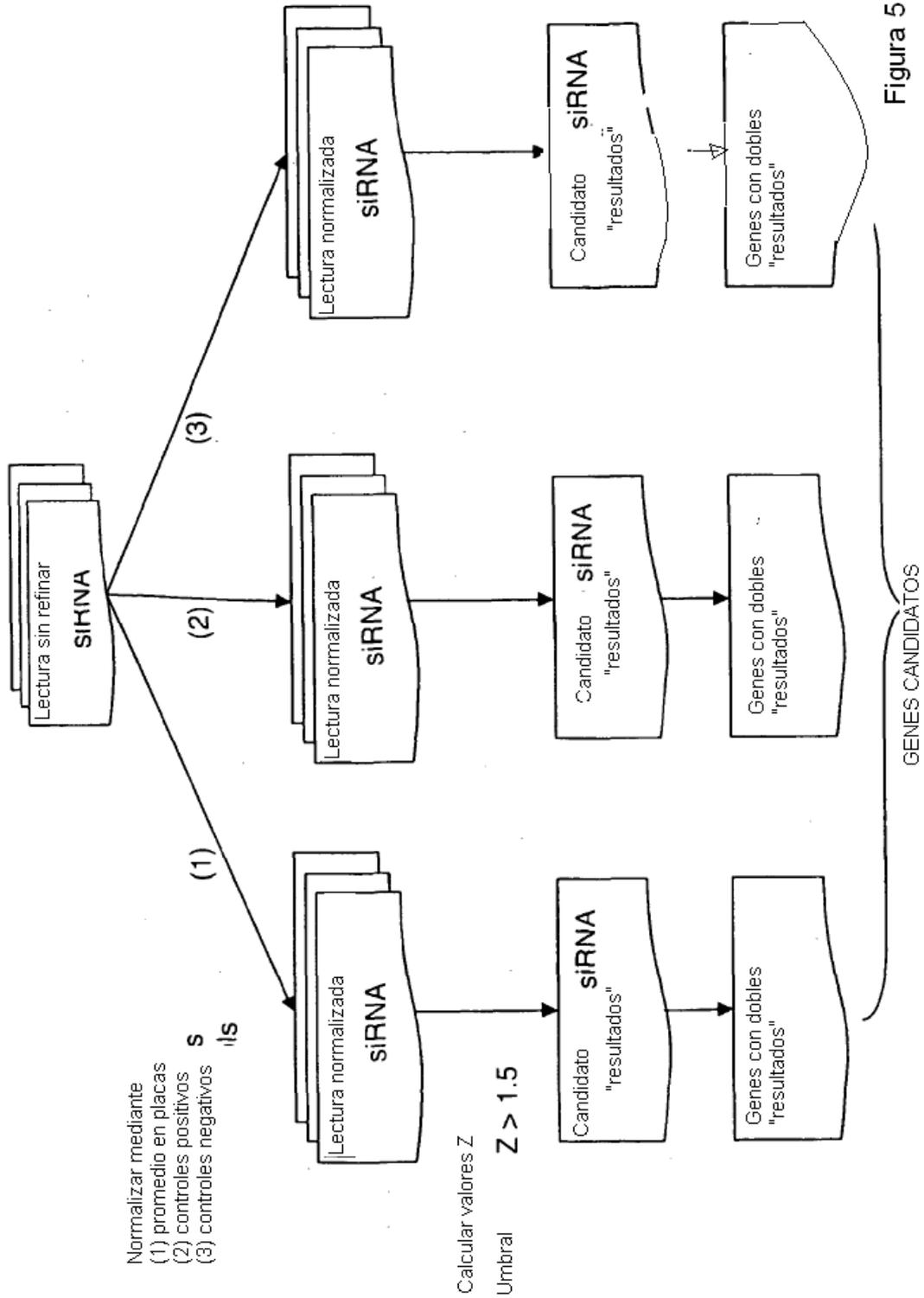


Figura 5

Análisis de datos mediante la representación de los valores sin refinar del cribado mostró P27 es un resultado de 4 oligos

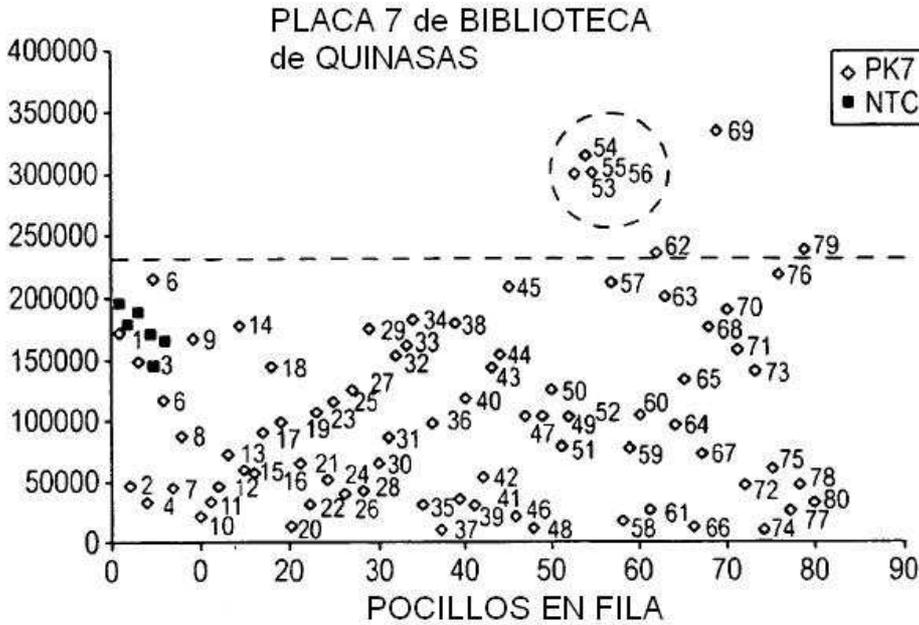


FIGURA 6A

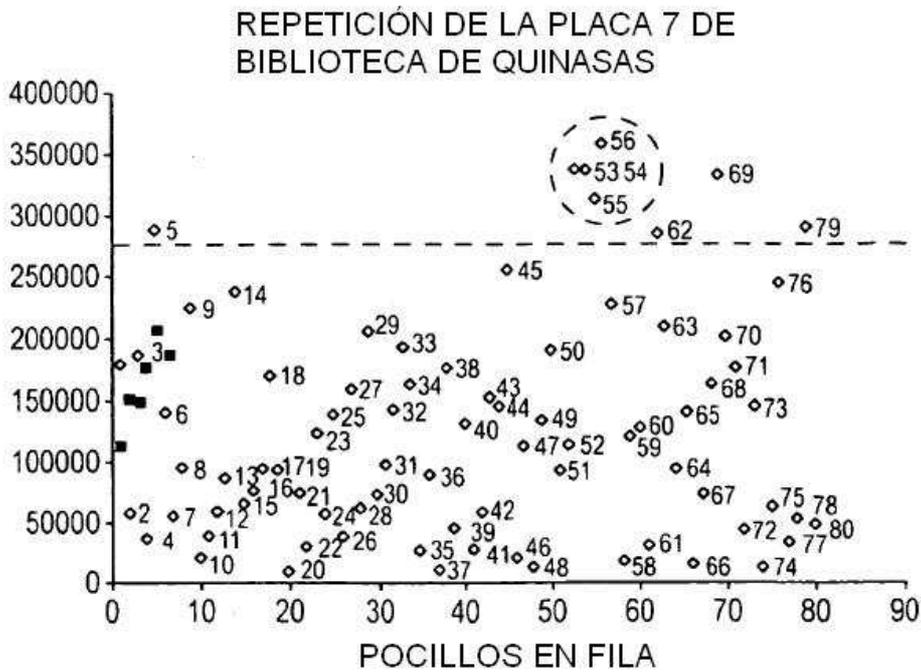


FIGURA 6B

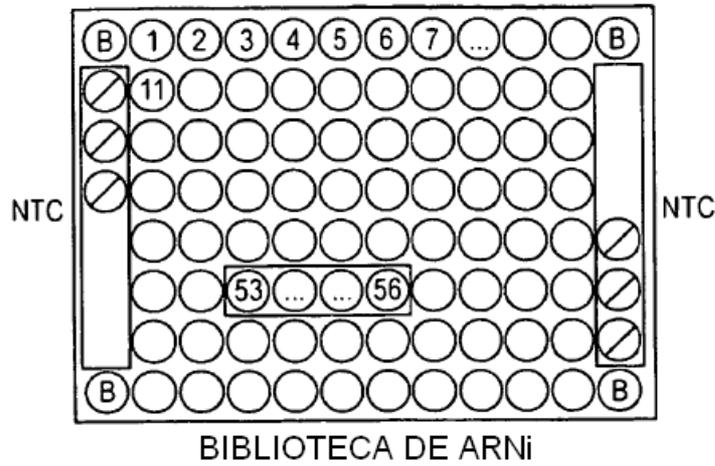
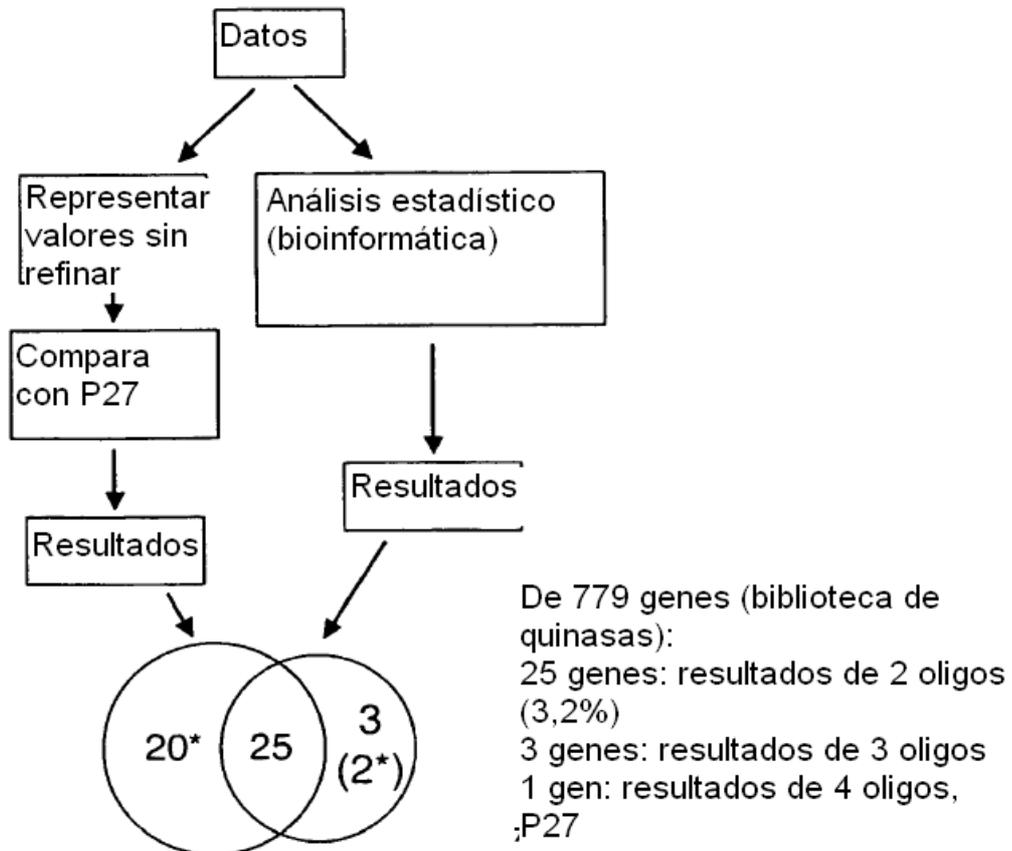


Figura 6C

Análisis combinado de resultados de la biblioteca de quinasas



* resultados de 2 oligos en algunos pero no en todos los análisis normalizados

Figura 7

Resultado del cribado de la biblioteca de quinazinas

funciones conocidas/posibles	ejemplos	resultados
regulación del ciclo celular	CDKs, RhoGTP _{asas} / citoesqueleto	6 (resultados de 2 oligos) 1 (resultados de 3 oligos)
mecanismos de señalización cascada abajo claves	MAPKs, PI 3/4 quinasa	7 (resultados de 2 oligos) 1 (resultados de 3 oligos)
mecanismos menos caracterizados	Mecanismos metabólicos PKC, KAK-STAT, Wnt	5 (resultados de 2 oligos)
Otros	Genes nuevos, mecanismos no relacionados	7 (resultados de 2 oligos) 1 (resultados de 3 oligos)

Figura 8

Desarrollo del cribado secundario

Figura 9A

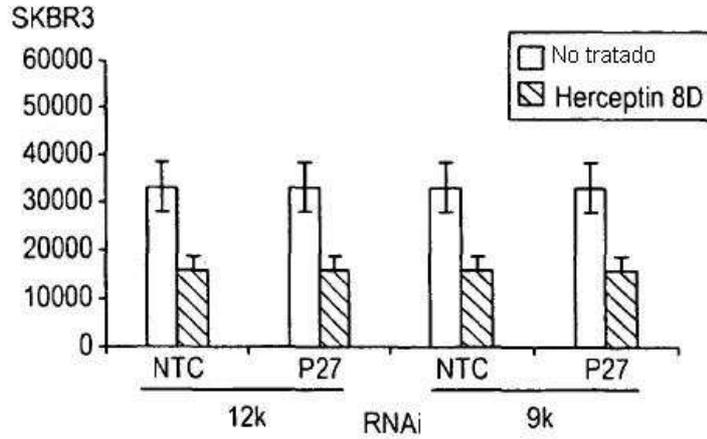


Figura 9B

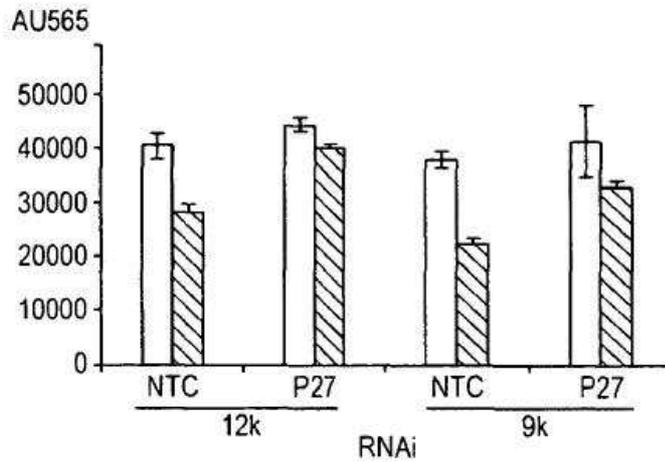
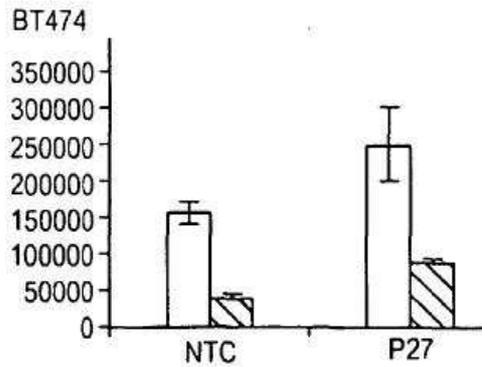
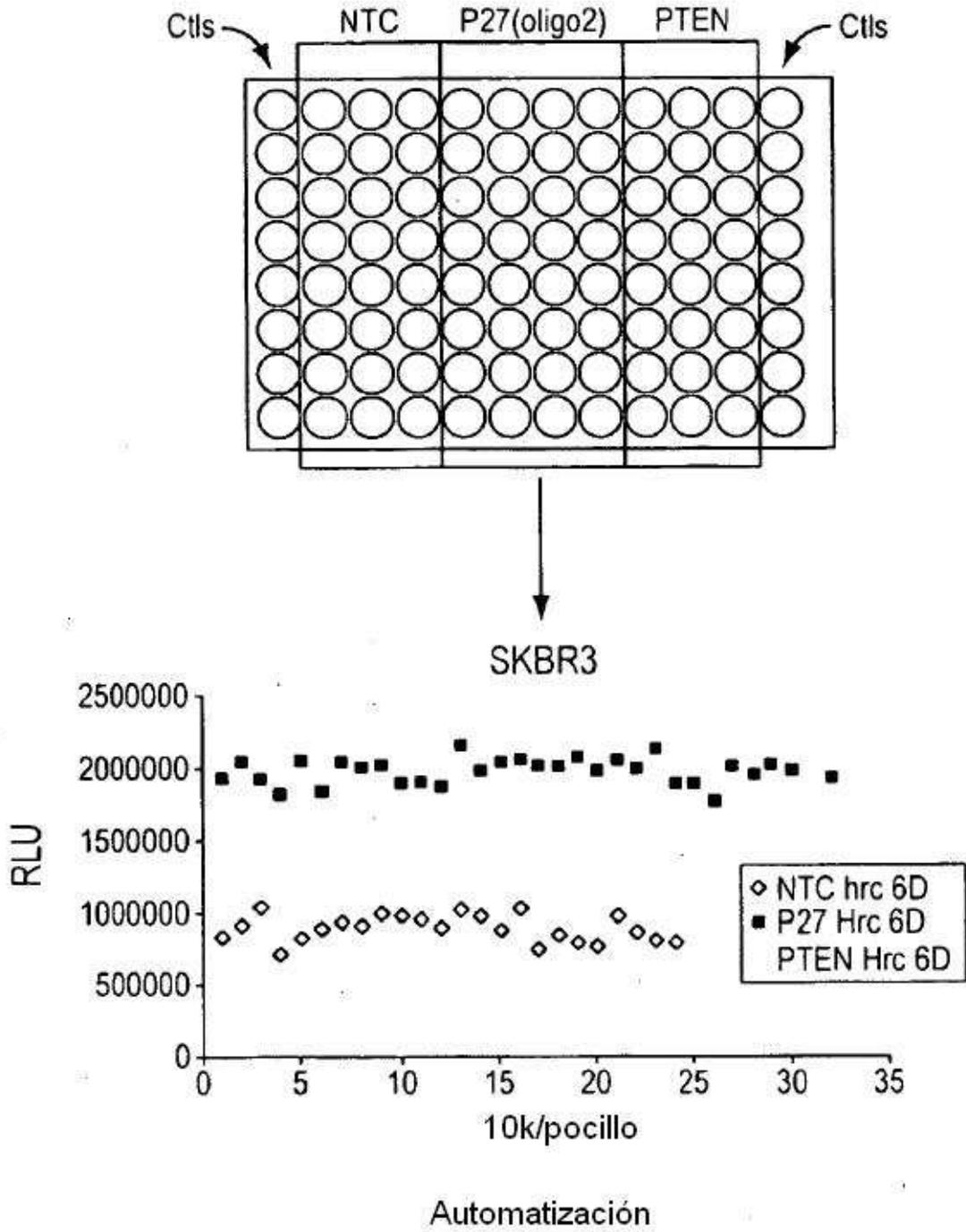


Figura 9C



P27=oligo2



Automatización
Figura 9D

Análisis combinado de los cribados

Gen	1er cribado		Cribado de validación		SKBR3	
	# resultado de oligos	(oligos)	# resultado de oligos	(oligos)	# resultado de oligos	(oligos)
CDK11	2	(2,3)	2	(2,3)	1	(,2)
DKFZP586B16	2	(2,3)	2+P	(2,3)	0	0
DGKI	2	(2,3)	2+P	(2,3)	1	(,2)
DUSP4	2	(1,4)	2	(1,4)	1+P	(,1)
DUSP6	2	(2,4)	2	(2,4)	1	(,1)
DYRK1A	2	(1,4)	4+P	(1,2,3,4)	4+P	(1,2,3,4)
FLJ35107	2	(1,2)	2	(1,2)	1	(,2)
FLT1	3	(1,2,3)	4+P	(1,2,3,4)	2	(2,4)
HIPK3	2	(3,4)	1	(,3)	0	0
HK2	2	(1,4)	3	(1,2,4)	3	(1,2,4)
ITK	2	(1,2)	2	(1,2)	1	(,2)
MOAP1/ITPK1	2	(3,4)	1	(,4)	1	(,3)
KIAA1639	3 (4)	(1,2,3,4?)	3+P	(1,3,4)	2	(1,3)
LATS2	2(3)	(1,3,4?)	3+P	(1,3,4)	0	0
LIM/PDLIM5	2	(1,2)	2+P	(1,2)	0	0
MAPK8/JNK	2	(1,3)	1	(,1)	0	0
MAP4K4	2	(1,2)	2	(1,2)	2	(1,2)
PANK1	2	(1,3)	3	(2,3,4)	1+P	(,1)
PI4K2B	2 (3)	(1,2,4?)	2	(2,4)	1	(,2)
PRKWNK3	2	(2,4)	2+P	(2,4)	0	0
RYK	2	(1,4)	2	(1,4)	0	0
SPEC2	2	(3,4)	2	(3,4)	2+P	(2,4)
Socs5	2	(1,3)	2	(1,3)	4+P	(1,2,3,4)
STK10	2	(1,2)	4+P	(1,2,3,4)	3	(2,3,4)
STK22C	2	(1,4)	3+P	(1,3,4)	2+P	(3,4)
STYK1/NOV*	2	(1,2)	3+P	(1,2,4)	0	0
TXND3	2	(1,3)	2	(1,3)	2	(1,2)
Wee1	2	(1,2)	2	(1,2)	0	0

Figura 10

Figura 11

Resumen del cribado de bibliotecas de fosfatasa

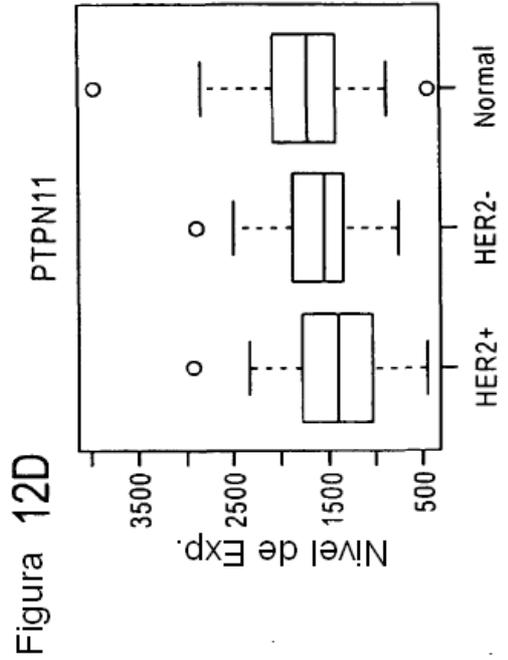
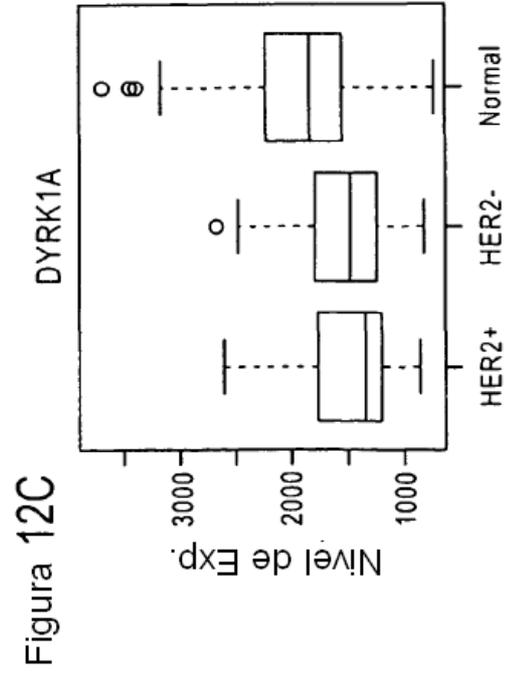
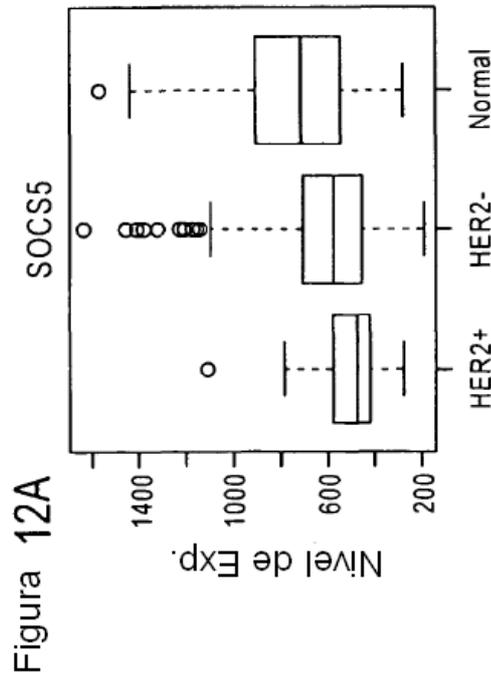
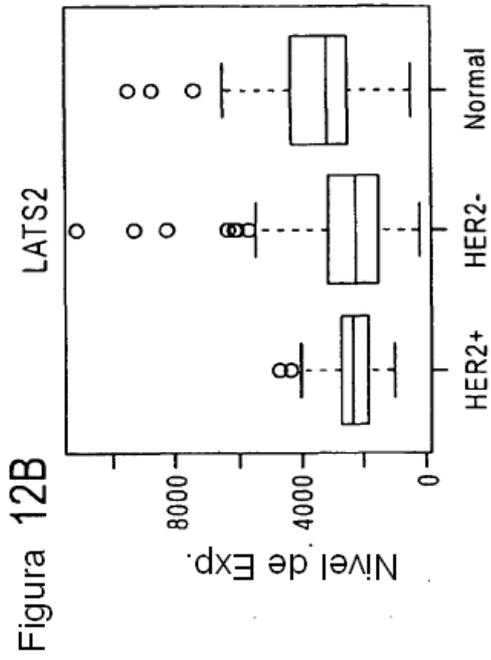
normalización	análisis Li	z>1.5		Análisis valores sin refinar
	media	pos	neg	Nil
PTEN	3	1	1	3
PTPN11	2	2	2	3
PPP2R1A	1*	2	3	3
KIAA0685	2	2	2	2
PPM1H	2	2	2	2
SSH3	1	2	2	2
MTMR3	1	2	2	1
PPP2R2B	0	2	1	1
PTENP1	2	1	1	2
KIF1B	2	0	0	2
MPHOSPH1	2	0	0	2

2 ó 3 resultados de oligos (descarte de resultados mixtos) = 11 (5,5% de la biblioteca)

2 resultados de oligos (en todos los análisis) = 3 (1,5% de la biblioteca)

*Promedio de placa no esclarecido debido a un punto de los datos elevado

Datos de expresión GeneLogic



Resultados principales en base al fenotipo más fuerte y resultado mayor de 2 oligos		
1	PPM1H	3+P fuerte UNQ11299
2	DYRK1A	4+P fuerte UNQ3880
3	STK10	4+P fuerte UNQ4026
4	PTPN11*	2+P UNQ7397

*Se incluyó PTPN11 a pesar de ser sólo un resultado de 2 oligos debido a la relación conocida con la señalización de HER2-PI3K/Akt

Figura 13

Ejemplos de cómo los resultados principales aumentan la proliferación celular en células BT474 tratadas con Herceptin

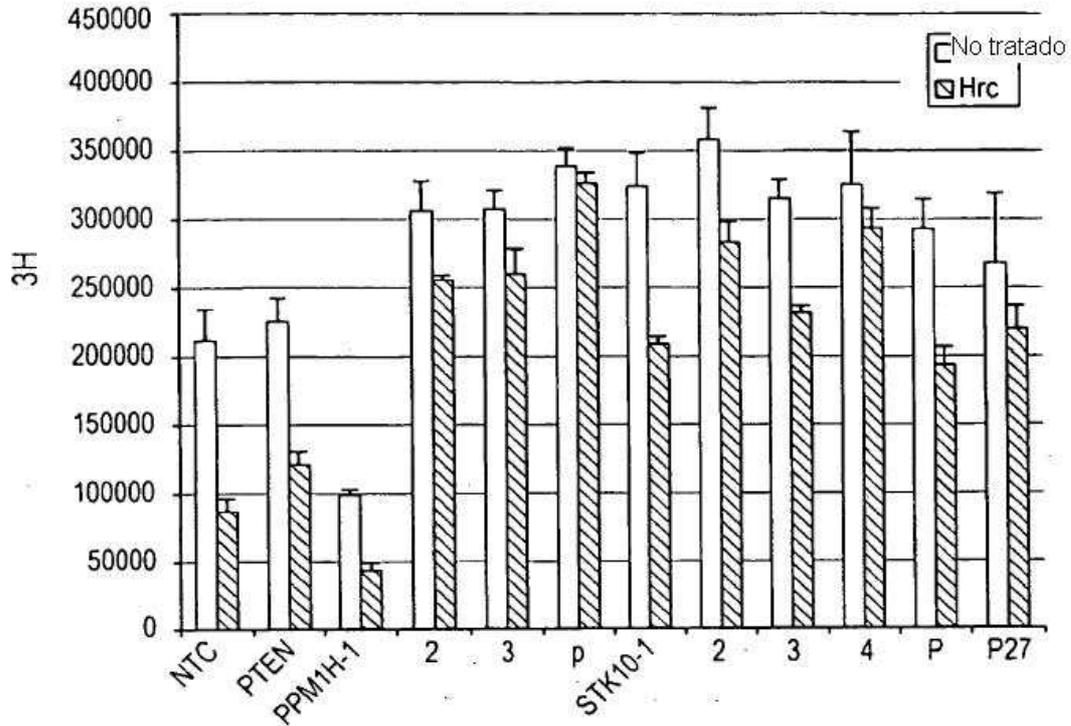


Figura 14A

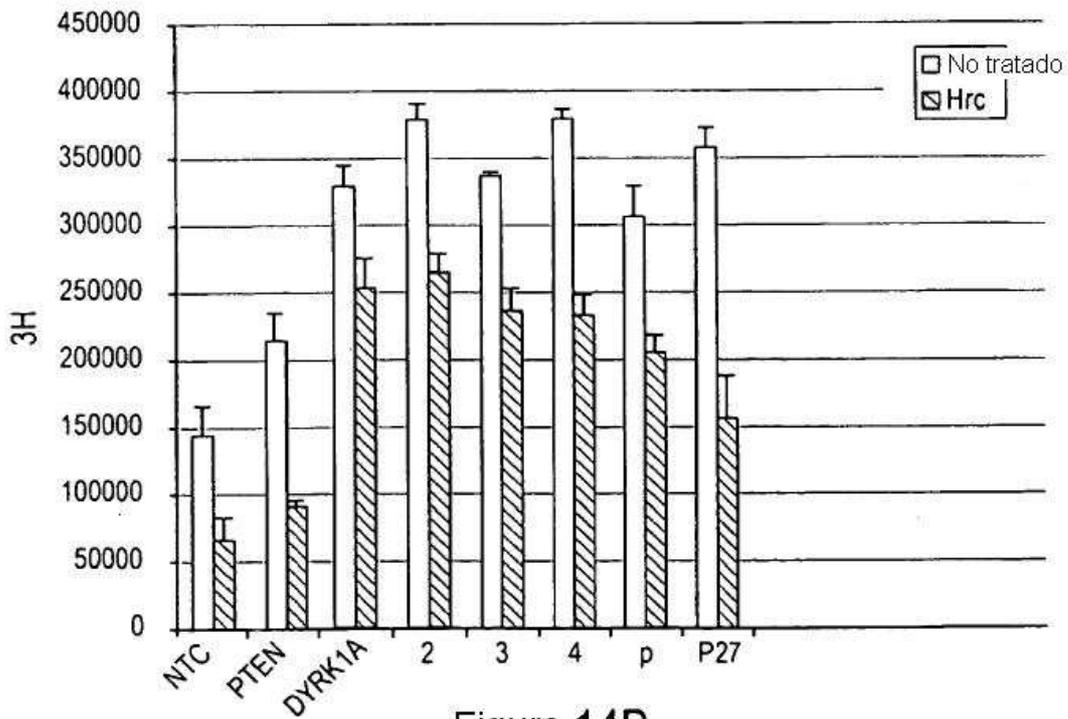


Figura 14B

Ejemplos de cómo los resultados principales aumentan la proliferación celular de células B7474-M1 tratadas con Herceptin

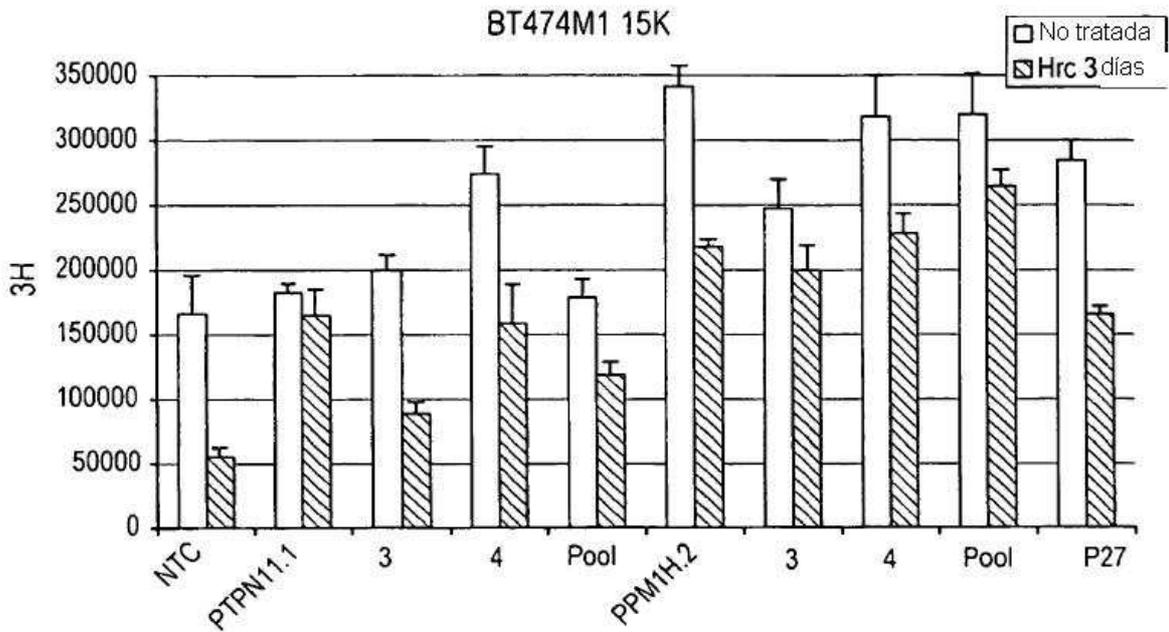


Figura 15A

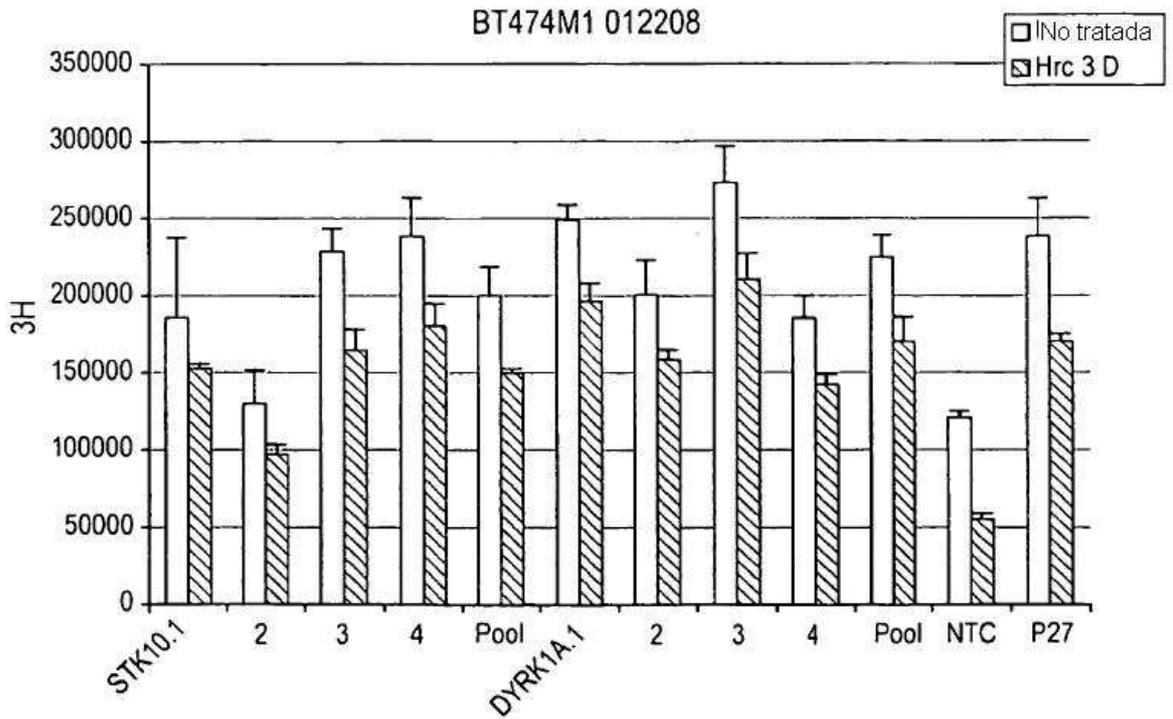


Figura 15B

Proliferación aumentada a 3 días (a) está asociada con el incremento del número de células a los 7 días

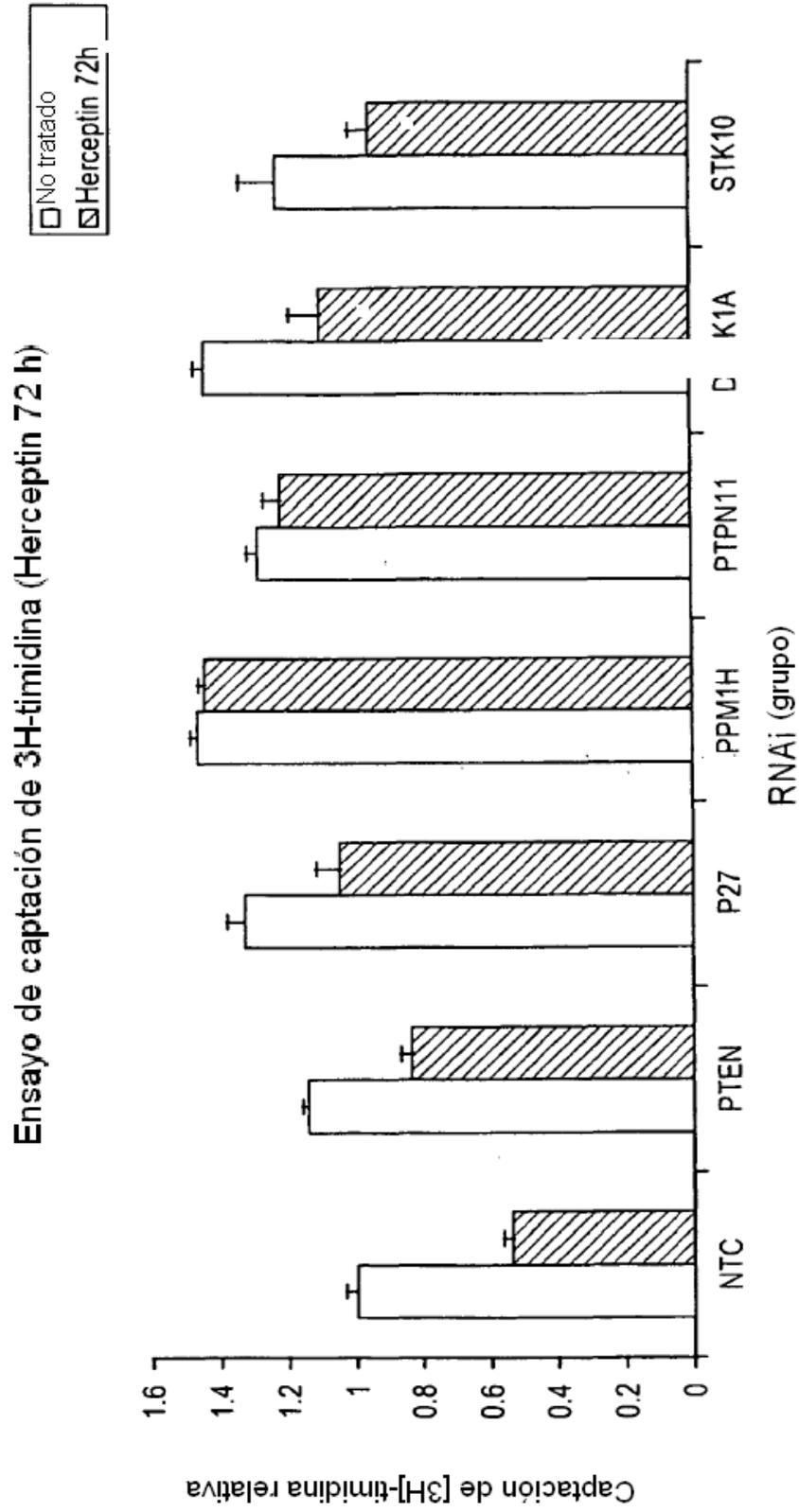


Figura 16A

Ensayo de brillo de títulos de células (Herceptin 7 días)

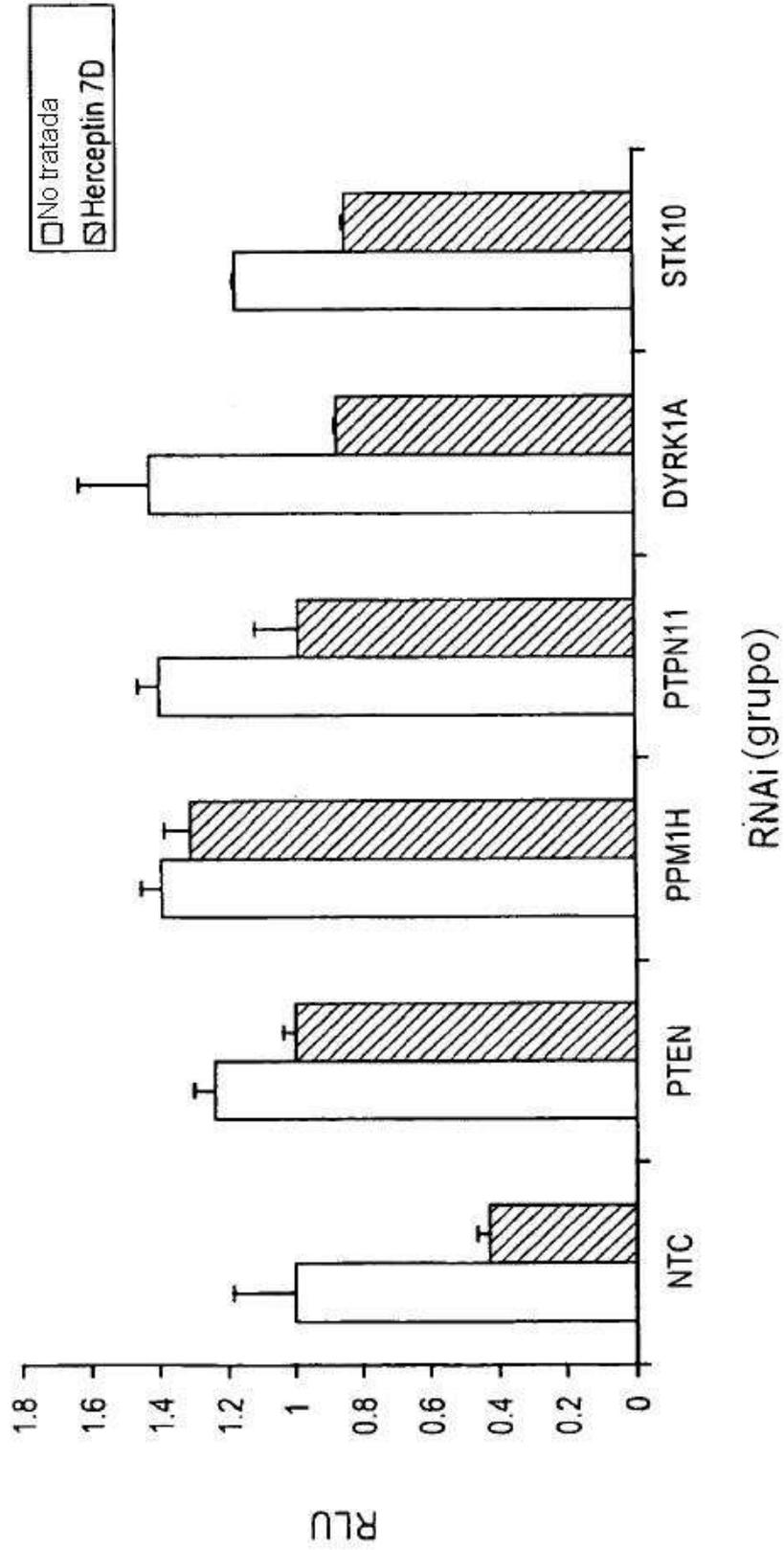


Figura 16B

La eliminación de genes candidatos también atenúa la respuesta de Lapatinib en múltiples líneas celulares (en particular PPM1H)

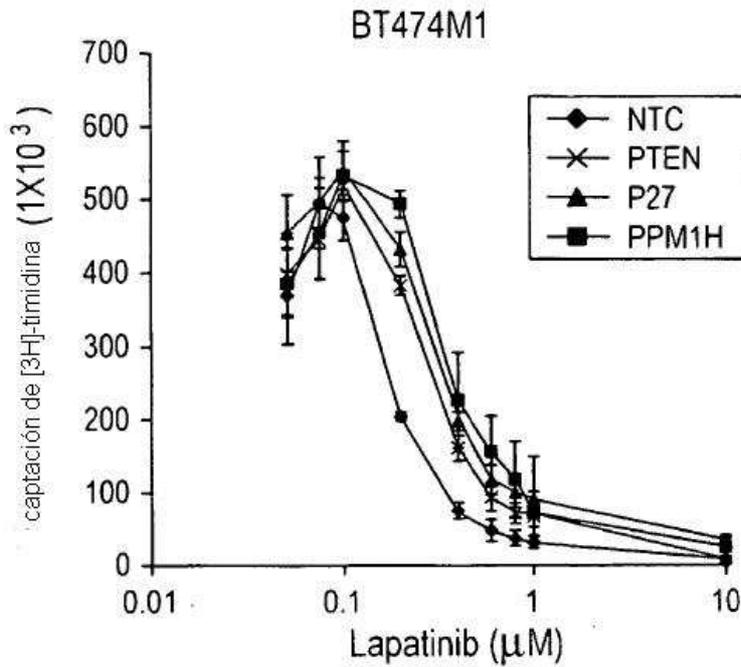


Figura 17A

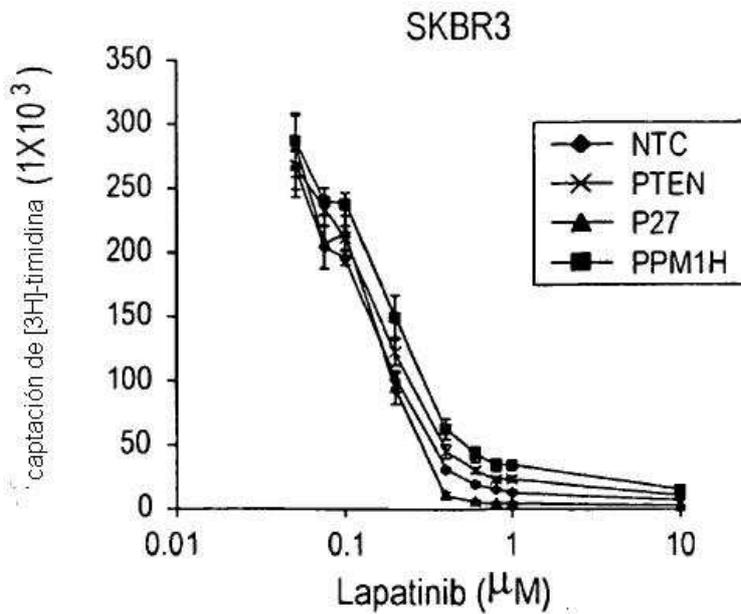


Figura 17B

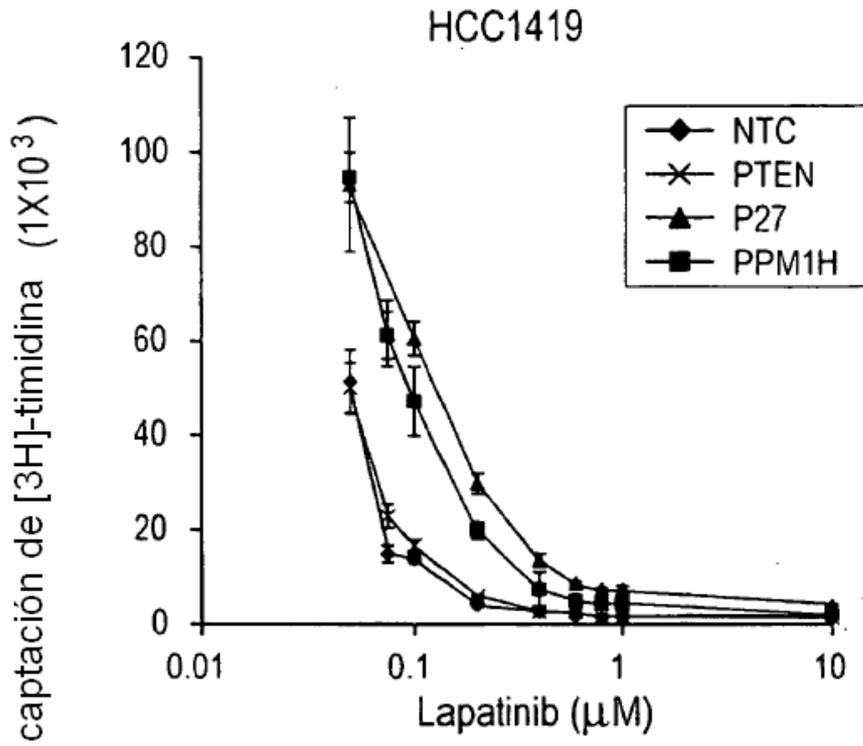


Figura 17C

Resumen	Lineas celulares		
	M1	HCC1419	SKBR3
Genes			
PTEN	+	-	+/-
P27	+	+	-
PPM1H	+	+	+
PTPN11	+	-	N/D
STK10	-/+	+	N/D
DYRK1A	-	-/+	N/D

+, descenso significativo de la respuesta de Lapatinib

+/, descenso moderado de la respuesta de Lapatinib

Figura 17D

PPM1H y PTPN11 regula negativamente el eje de la señalización de HER3/PI3K

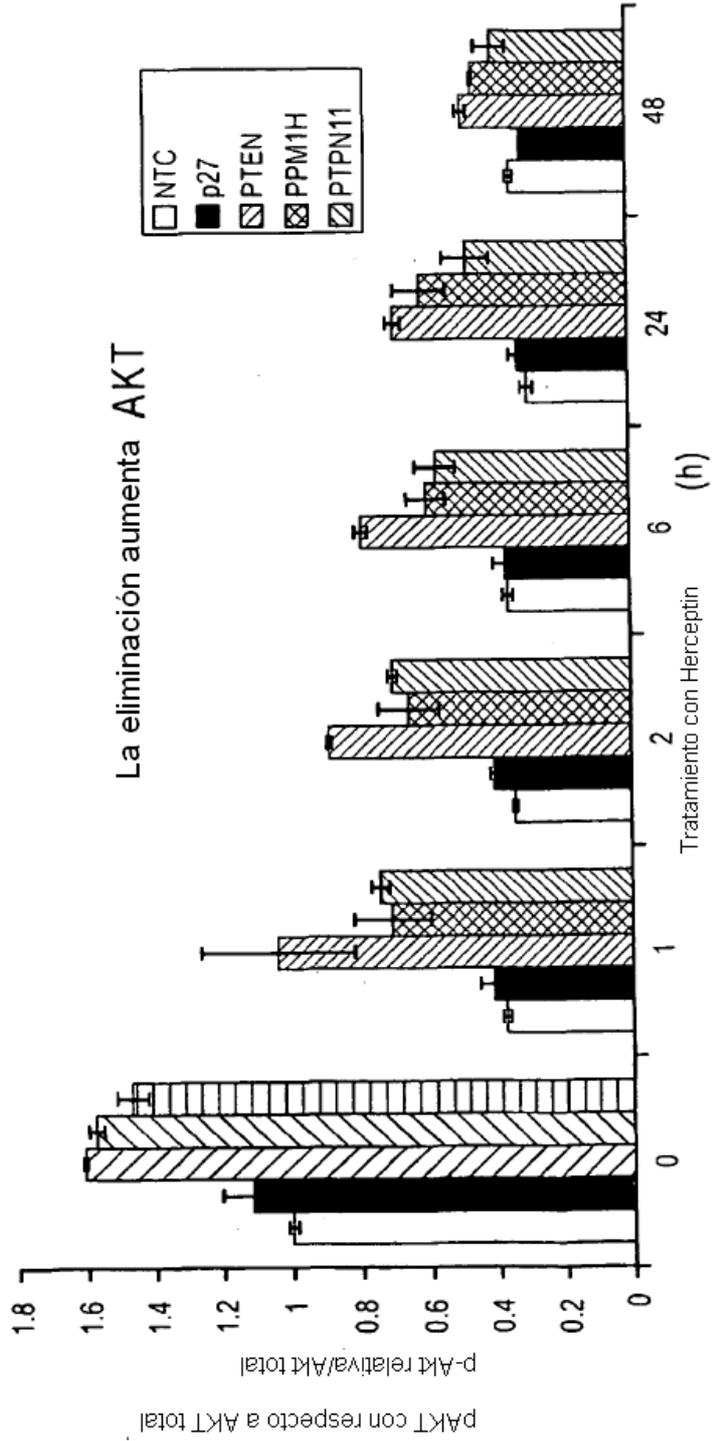


Figura 18

La eliminación de los 4 genes candidatos puede incrementar la fosforilación de Akt

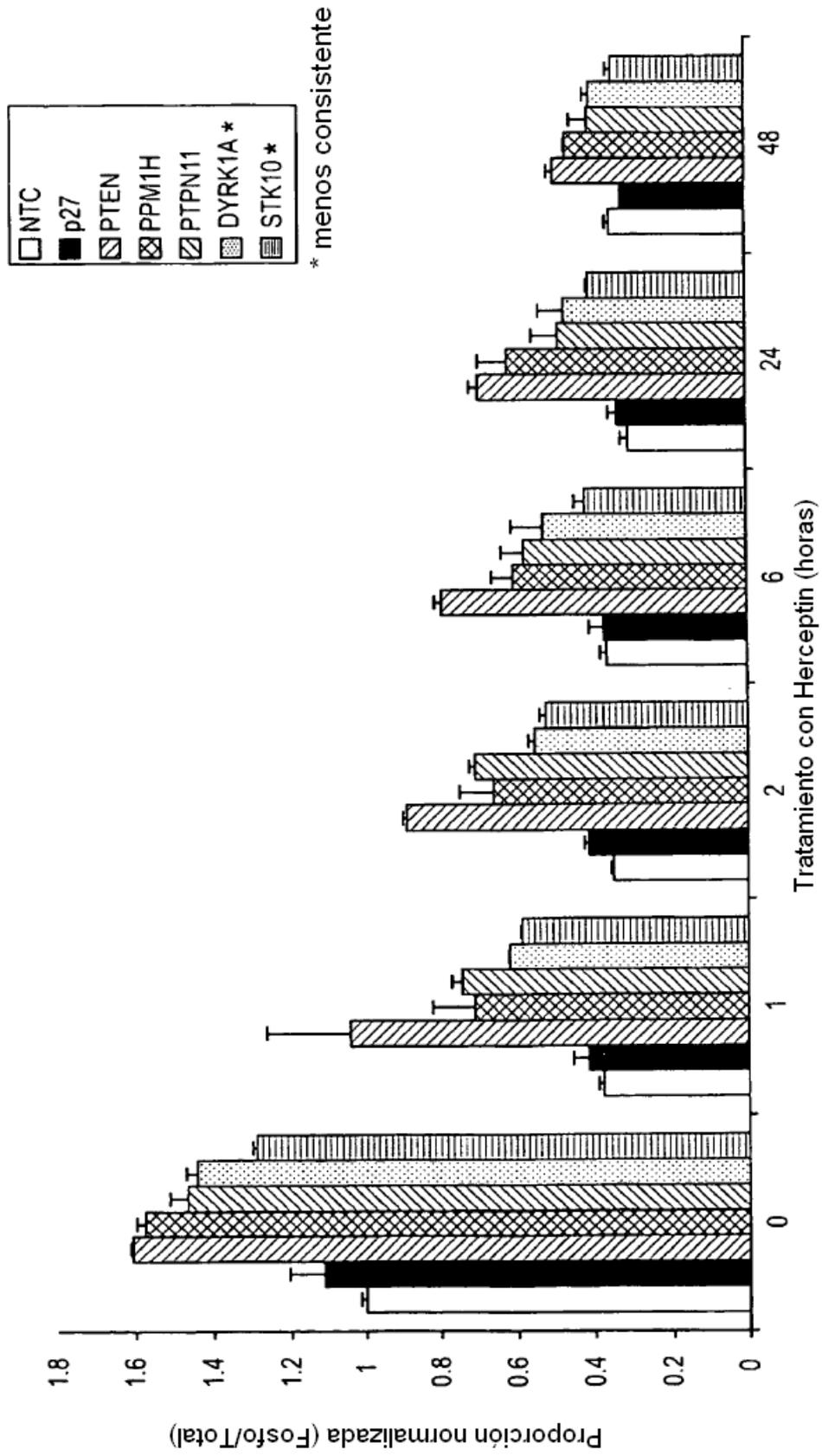


Figura 19

PPM1M y PPM1M1J también atenúan la respuesta de Herceptin in vitro, aunque más débilmente que PPM1H

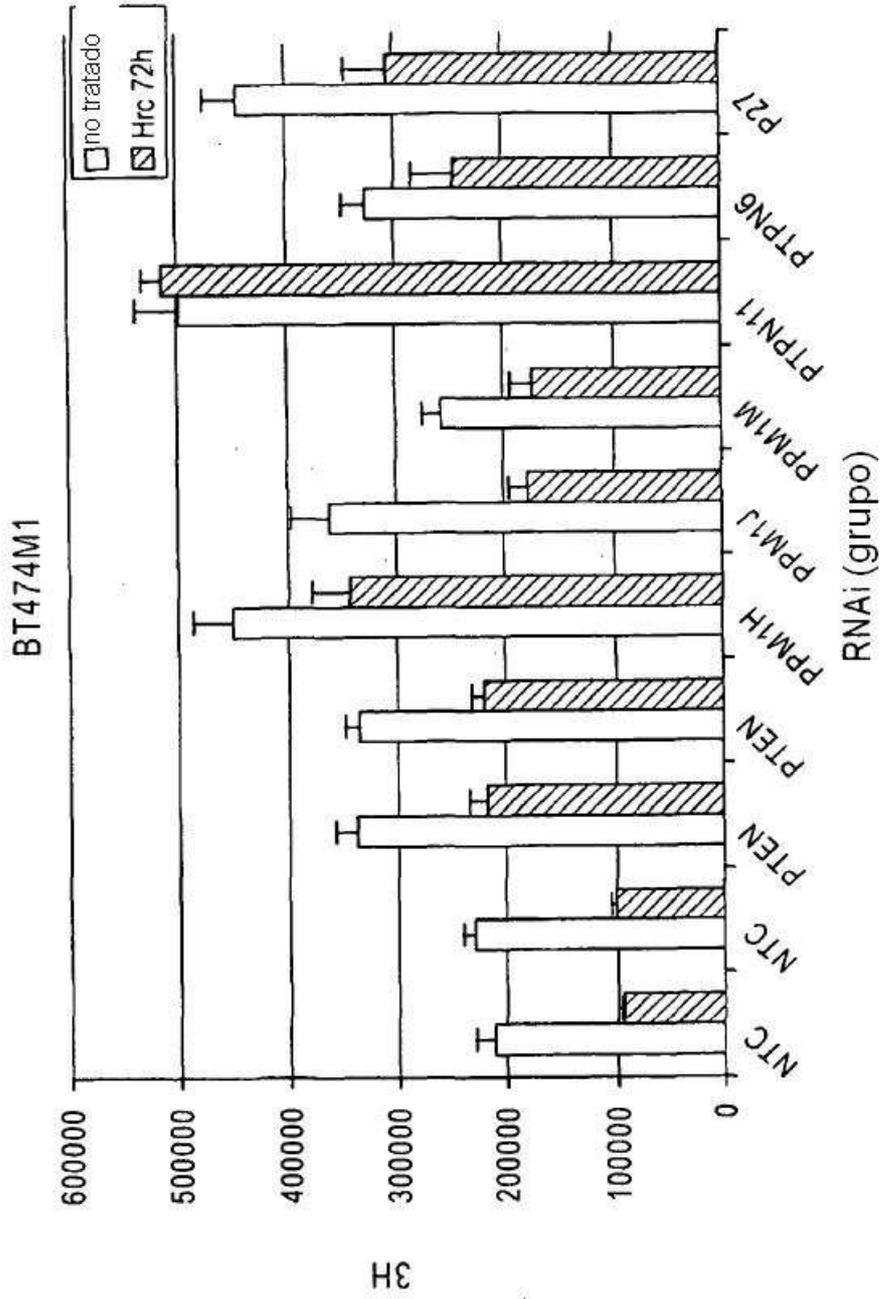


Figura 21

La eliminación de PPM1M también disminuyó la respuesta de Lapatinib in vitro

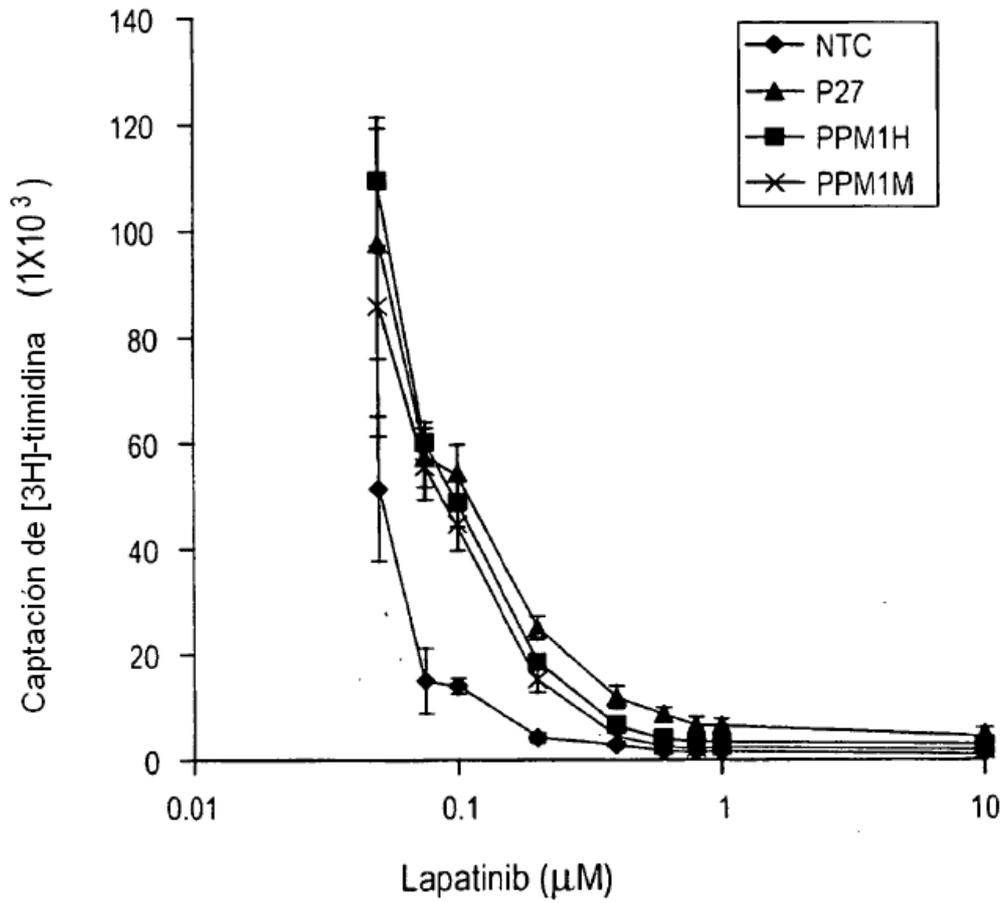


FIG. 22

TABLA 1

gen	#oligos trabajados primario	Validación	SKBR3	número de acceso
CDK11	2	2		NM_015076
DYRK1A	2	4+P	*	NM_001396
LATS2	2-3	3+P		NM_014572
STK10	2	4+P	*	NM_005990
Wee1	2	2		NM_003390
DUSP4	2	2		NM_001394
DUSP6	2	2		NM_001946
HIPK3	2	1		NM_005734
JNK	2	1		NM_002752
MAP4K4	2	2		NM_004834
PTPN11	2-3	3+P	*	NM_002834
Socs5	2	2	**	NM_014011
PPM1H	2-3	3+P	*	NM_051093
DKFZP586B16	2	2+P		NM_015533
DGKI	2	2+P		NM_004717
FLJ35107	2	2		NM_496631
FLT1	3	4+P		NM_002019
HK2	2	3	*	NM_000189
ITK	2	2		NM_005546
MOAP1	2	1		NM_014216
KIAA0685	2	1+P		NM_014678
KIAA1639	3-4	3+P	*	NM_290923
LIM/PDLIM5	2	2+P		NM_006457
PANK1	2	3		NM_138316
PI4K2B	2-3	2		NM_018323
PPP2R1A	2-3	2+P		NM_014225
PRKWINK3	2	2+P		NM_020922
RYK	2	2		NM_002958
SPEC2	2	2		NM_020240
STK22C	2	3+P	*	NM_052841
STYK1	2	3+P		NM_018423
TXND3	2	2	*	NM_016616

* resultados de 2 o más oligos en funciones de líneas celulares de SKBR3

Azul: ciclo celular

Verde: Mecanismo Erk/MARK

Rojo: Modificación después de traducción

Tabla 2

Resumen

Gen	Líneas celulares	Tejido
	Expresión menor en Basal	Expresión menor en Basal
PTEN	Y	Y
CDKN1B	Y	Y
PPM1H	Y	Y
PTPN11	Y	Y
DYRK1A	N	N
STK10	N	N
PPM1A	Y	Y
PPM1B	N	N
ILKAP	N	N
PPM1M	N	N
PPM1J	Y	Y

TABLA 3

	Refseq
CDKN1B	NM_004064
DYRK1A	NM_001396
TNNI3K	NM_015978
DUSP4	NM_001394
ATR	NM_001184
BCR	NM_004327
BMPR1A	NM_004329
CDK11	NM_015076
DKFZP586B1	NM_015533
CDC2L2	NM_024011
DUSP6	NM_001946
STYK1	NM_018423
DGKI	NM_004717
KIAA1639	NM_290923
FLJ35107	NM_496631
LIM	NM_006457
MARK8	NM_002750
FLT1	NM_002019
ITPK1	NM_014216
HK2	NM_000189
ITK	NM_005546
MAP4K4	NM_004834
LATS2	NM_014572
SPEC2	NM_020240
EXOSC10	NM_002685
PRKWINK3	NM_020922
PI4K2B	NM_018323
STK22C	NM_052841
STK10	NM_005990
PANK1	NM_138316
SOCS5	NM_014011
RYK	NM_002958
PDK3	NM_005391
PRKD2	NM_016457
TXNDC3	NM_016616
WEE1	NM_003390
PPM1H	NM_051093
PPP2R1A	NM_014225
PPP2R2B	NM_004576
MTMR3	NM_021090
PTPN11	NM_002834
SSH3	NM_017857