

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 916**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2011 PCT/US2011/050069**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2012 WO12031027**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2011 E 11754597 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2612151**

54 Título: **Biomarcadores y métodos de tratamiento**

30 Prioridad:

**30.06.2011 US 201161503489 P**

**01.06.2011 US 201161492338 P**

**18.05.2011 US 201161487527 P**

**07.12.2010 US 420703 P**

**07.10.2010 US 390995 P**

**05.10.2010 US 389922 P**

**31.08.2010 US 378911 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.11.2017**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)**

**1 DNA Way**

**South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**PATEL, PREMAL;**

**PETERSON, AMY C.;**

**YAUCH, ROBERT L. y**

**ZHA, JIPING**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 641 916 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

Biomarcadores y métodos de tratamiento

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a biomarcadores de cáncer. En particular, la invención se refiere a c-met como biomarcador para la selección de pacientes y pronóstico en cáncer, así como a métodos de tratamiento terapéutico, al uso de kits de diagnóstico y a métodos de determinación de la expresión del biomarcador c-met.

10

**Antecedentes**

El cáncer continúa siendo una de las amenazas más letales para la salud humana. En los Estados Unidos, el cáncer afecta casi a 1,3 millones de nuevos pacientes cada año y, después de la cardiopatía, es la segunda causa principal de muerte, lo que representa aproximadamente 1 de cada 4 muertes. Por ejemplo, el cáncer de mama es la segunda forma más común de cáncer y el segundo cáncer principal mortal entre las mujeres estadounidenses. También se predice que el cáncer puede superar a las enfermedades cardiovasculares como la causa número uno de muerte al cabo de 5 años. Los tumores sólidos son responsables de la mayoría de esas muertes. Aunque ha habido avances significativos en el tratamiento médico de ciertos tipos de cánceres, la tasa de supervivencia global de 5 años para todos los cánceres ha mejorado solo alrededor del 10 % en los últimos 20 años. Los cánceres, o tumores malignos, se metastatizan y crecen rápidamente de una manera incontrolada, dificultando extremadamente la detección en tiempo y su tratamiento.

15

20

A pesar del avance significativo en el tratamiento del cáncer, se están buscando terapias mejoradas.

25

Goetsch *et al.* (2010) *Biomarkers in Medicine* 4, 149-170, describen la expresión o amplificación de c-Met como un marcador pronóstico, estudios que utilizan líneas celulares de cáncer y sugerencias sobre cómo abordar la identificación de biomarcadores de estratificación (predictivos) de c-Met. Smolen *et al.* (2006) *PNAS* 103, 2316-2321 describen que la amplificación de MET puede identificar un subconjunto de cánceres epiteliales y por lo tanto puede definir un grupo de pacientes que es apropiado para ensayos clínicos de terapia dirigida utilizando inhibidores MET. Okuda *et al.* (2008) *Cancer Science* 99, 2280-2285 describen que un subconjunto minoritario de pacientes con amplificación de c-Met puede ser un buen candidato para inhibidores de tirosina quinasa c-Met. Kamiya (2008) "Human c-Met ELISA for the quantitative determination of c-Met in human serum, EDTA-plasma or cell culture media", n.º KT-444, páginas 1-6 describe un kit de ELISA de c-Met humano.

30

35

**Sumario de la invención**

La presente divulgación se refiere a los usos de un antagonista de c-met para tratar de manera eficaz a pacientes con cáncer y a métodos mejorados para diagnosticar enfermedades para su uso en el tratamiento de enfermedades, opcionalmente con un antagonista de c-met. En particular, la divulgación proporciona datos de un ensayo clínico en fase II aleatorizado, del anticuerpo anti-c-met, MetMAB (onartuzumab) en combinación con erlotinib (TARCEVA®), en sujetos con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) de segunda y tercera línea. El biomarcador c-Met se utilizó para identificar una población de pacientes en la que el tratamiento con MetMAB más erlotinib proporcionó un beneficio clínicamente significativo, evaluado por supervivencia sin progresión y supervivencia global, y una población de pacientes en la que el tratamiento con MetMAB más erlotinib aumentó significativamente el riesgo de progresión de cáncer y muerte (en comparación con el tratamiento solo con erlotinib). Este peor resultado subraya la necesidad de seleccionar pacientes que se beneficiarán del tratamiento con el antagonista de c-met (por ejemplo, en combinación con antagonista de EGFR).

40

45

En el ensayo clínico, el tratamiento con MetMAB y erlotinib proporcionó un beneficio clínicamente significativo a los pacientes con CPNM que expresaban altos niveles de biomarcador c-met. Los resultados mostraron que la eficacia, evaluada por supervivencia sin progresión (SSP) y supervivencia global (SG), fue positiva, especialmente cuando se comparó con datos de SSP y SG para el tratamiento solo con erlotinib. La diferencia fue estadísticamente significativa, y la adición de MetMAB a erlotinib casi duplicó la supervivencia sin progresión y la supervivencia global en pacientes con CPNM que expresaron altos niveles de biomarcador c-met. Los datos del ensayo clínico también mostraron que el tratamiento con MetMAB en combinación con erlotinib, aumentó el riesgo de progresión y muerte en pacientes con CPNM que expresaron bajos niveles de biomarcador c-met, en relación con el riesgo de progresión y muerte en pacientes tratados solo con erlotinib. Los resultados mostraron que la eficacia, evaluada por SSP y SG, fue peor en los pacientes tratados con MetMAB y erlotinib en comparación con los datos de SSP y SG para el tratamiento solo con erlotinib. La diferencia fue estadísticamente significativa.

50

55

60

Los datos de los ensayos clínicos también mostraron que la expresión alta (también denominada "elevada") de c-met se asoció fuertemente con un peor pronóstico en pacientes con CPNM tratados con erlotinib. Los pacientes con CPNM que expresaron el biomarcador c-met a un nivel alto tuvieron un mayor riesgo de progresión y aproximadamente el doble de riesgo de muerte en relación con los pacientes con CPNM que expresaron el biomarcador c-met a un nivel bajo. Por lo tanto, la expresión alta de c-met fue un factor pronóstico fuertemente

65

significativo para la progresión y la supervivencia en pacientes con CPNM de segunda o tercera línea tratados con erlotinib.

5 En un aspecto, la invención proporciona métodos para identificar un paciente con cáncer que es susceptible a responder al tratamiento con un antagonista de c-met que comprende la etapa de determinar si el cáncer del paciente tiene una alta cantidad de biomarcador c-met, en el que la expresión de biomarcador c-met indica que el paciente es susceptible a responder al tratamiento con el antagonista de c-met, como se define en las reivindicaciones. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, c-met "elevado" o "alto" se refiere a una cantidad de c-met asociada a la capacidad de respuesta del paciente a un tratamiento.

10 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para determinar el pronóstico de un paciente con cáncer, que comprende la etapa de determinar si el cáncer el paciente tiene una alta cantidad de biomarcador c-met, en el que la expresión del biomarcador c-met indica que el paciente es susceptible a tener una supervivencia global (SG) y/o una supervivencia sin progresión (SSP) aumentada, cuando el paciente es tratado con un antagonista de c-met como se define en las reivindicaciones.

15 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para determinar la expresión del biomarcador c-met, que comprende la etapa de determinar si el cáncer del paciente tiene una alta cantidad de biomarcador de c-met, en el que la expresión del biomarcador c-met es la expresión de proteína y se determina en una muestra del paciente utilizando IHQ, en el que la expresión alta del biomarcador c-met es el 50 % o más de las células tumorales con intensidad de tinción de c-met moderada, intensidad de tinción de c-met moderada/alta combinada o intensidad de tinción de c-met alta, en el que la expresión de c-met se detecta utilizando un anticuerpo c-met, en el que la expresión del biomarcador c-met indica que el paciente es susceptible a tener una SG y/o una SSP aumentada, cuando el paciente es tratado con un antagonista de c-met como se define en las reivindicaciones.

20 En un aspecto, la invención proporciona un método para determinar el pronóstico de un paciente, que comprende determinar la cantidad del biomarcador c-met en una muestra de cáncer del paciente como se define en las reivindicaciones. Una expresión alta del biomarcador c-met puede significar un aumento de SSP y/o SG cuando el paciente es tratado con una combinación de anticuerpo anti-c-met y erlotinib y una expresión baja del biomarcador c-met puede significar una disminución de SSP y/o SG cuando el paciente es tratado con una combinación de anticuerpo anti-c-met y erlotinib.

25 En un aspecto, la divulgación proporciona un método para optimizar la eficacia terapéutica, que comprende determinar la cantidad de expresión del biomarcador c-met en una muestra de cáncer del paciente.

30 En los métodos de la invención que implican una expresión alta del biomarcador c-met, la expresión de la proteína del biomarcador c-met se determina en una muestra del paciente utilizando inmunohistoquímica (IHQ) en la que la puntuación IHQ es 2 o 3. En algunas realizaciones la puntuación IHQ es 2. En algunas realizaciones, la puntuación IHQ es 3. Una expresión alta de biomarcador c-met es el 50 % o más de las células tumorales con intensidad de tinción de c-met moderada, intensidad de tinción de c-met moderada/alta combinada o intensidad de tinción de c-met alta. La intensidad de tinción de expresión de c-met se determina con respecto a la intensidad de tinción de c-met de gránulos de células de control. La línea celular A549 tiene una intensidad de tinción de c-met moderada, y la línea celular H441 tiene una intensidad de tinción de c-met fuerte. La expresión del biomarcador c-met puede ser la expresión de ácido nucleico y se determina de una muestra del paciente utilizando perfil de expresión génica, PCR (como rtPCR), RNA-seq, análisis de micromatriz, SAGE, técnica MassARRAY o FISH. En algunas realizaciones, el paciente cuyo cáncer tiene altas cantidades de biomarcador c-met tiene una mayor probabilidad de aumentar la SSP y/o SG con respecto a un paciente cuyo cáncer no tiene altas cantidades de biomarcador c-met. En algunas realizaciones de cualquiera de las invenciones desveladas en la presente memoria, una expresión alta de biomarcador c-met es un diagnóstico positivo a met (un estado clínico de diagnóstico positivo a met) como se define de acuerdo con la Tabla A de la presente memoria.

35 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para identificar un paciente con cáncer que es menos susceptible a responder al tratamiento con un antagonista de c-met que comprende la etapa de determinar si el cáncer del paciente tiene una baja cantidad de biomarcador c-met, en el que la expresión del biomarcador c-met indica que el paciente es menos susceptible a responder al tratamiento con el antagonista de c-met como se define en la presente memoria. Como se utiliza en la presente memoria, una cantidad "baja" de c-met se refiere a una cantidad de c-met asociada a ausencia de respuesta a un tratamiento, o, en algunas realizaciones, una cantidad de c-met asociada a peor de respuesta a un tratamiento (por ejemplo, disminución del beneficio clínico en comparación con ningún tratamiento). La expresión del biomarcador c-met es una expresión de proteína y se determina en una muestra del paciente utilizando inmunohistoquímica (IHQ) en la que la puntuación IHQ es 1 o 0. En algunas realizaciones, la puntuación IHQ es 1. En algunas realizaciones, la puntuación IHQ es 0. Una expresión baja del biomarcador c-met es una tinción de c-met negativa, menos del 50 % de las células tumorales con intensidad de tinción de c-met baja o baja y moderada combinada, o el 50 % o más de las células tumorales con intensidad de tinción de c-met débil o moderada y débil combinada pero menos del 50 % de las células tumorales con intensidad de tinción moderada o moderada y fuerte combinada. La intensidad de tinción de la expresión de c-met se determina con respecto a la intensidad de tinción de c-met de gránulos de células de control. La línea celular H1155 tiene intensidad de tinción

de c-met negativa y la línea celular HEK-293 tiene intensidad de tinción de c-met baja. En algunas realizaciones de cualquiera de las invenciones desveladas en la presente memoria, una expresión de biomarcador c-met baja es un diagnóstico negativo a met (un estado clínico de diagnóstico negativo a met) como se define de acuerdo con la Tabla A de la presente memoria.

5 De acuerdo con una realización, la invención se refiere a un antagonista de c-met para su uso en métodos para tratar a un paciente con cáncer que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de c-met si se ha encontrado que tiene una cantidad elevada (alta) de c-met (es decir, expresión alta de biomarcador c-met) como se define en las reivindicaciones.

10 En un aspecto, la invención proporciona dicho uso en métodos para tratar a un paciente con cáncer, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de c-met si se ha encontrado que tiene una alta cantidad de un biomarcador de c-met donde se ha encontrado que el cáncer del paciente tiene una alta cantidad de un biomarcador c-met. En algunas realizaciones, el antagonista de c-met es un anticuerpo anti-c-met. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-c-met es MetMAb (onartuzumab). La expresión de la proteína del biomarcador c-met se determina en una muestra del paciente utilizando inmunohistoquímica (IHQ). En algunas realizaciones, la puntuación IHQ es de 2 o 3. En algunas realizaciones, la puntuación IHQ es de 2. En algunas realizaciones, la puntuación IHQ es de 3. Una expresión de biomarcador c-met alta es el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción de c-met moderada, una intensidad de tinción de c-met moderada/alta combinada o una intensidad de tinción de c-met alta. La intensidad de tinción de la expresión de c-met se determina con respecto a la intensidad de tinción de c-met de gránulos de células de control. La línea celular A549 tiene intensidad de tinción c-met moderada y la línea celular H441 tiene intensidad de tinción c-met fuerte. La expresión del biomarcador c-met puede ser la expresión de ácido nucleico y se determina de una muestra del paciente utilizando perfil de expresión génica, PCR (tal como rtPCR), RNA-seq, análisis de micromatriz, SAGE, técnica MassARRAY o FISH. En algunas realizaciones, el paciente tiene (es más susceptible a tener) una SSP y/o SG más alta, en relación con un paciente que no tiene biomarcador c-met alto. En algunas realizaciones de cualquiera de las invenciones desveladas en la presente memoria, una expresión alta de biomarcador c-met es un estado clínico de diagnóstico positivo a met, como se define de acuerdo con la Tabla A de la presente memoria.

30 Además, la divulgación se refiere a métodos para tratar a un paciente con cáncer, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento para el cáncer que no sea un antagonista de c-met, si se ha encontrado que el paciente tiene una baja cantidad de biomarcador c-met (es decir, baja o sustancialmente indetectable).

35 En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para tratar a un paciente con cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento para el cáncer que no sea un antagonista c-met, al paciente en el que ha encontrado que expresa una baja cantidad de biomarcador c-met (es decir, que tiene una baja cantidad de biomarcador c-met) donde se ha encontrado que el cáncer del paciente expresa biomarcador una baja cantidad de c-met. La expresión de la proteína del biomarcador c-met se determina en una muestra del paciente utilizando inmunohistoquímica (IHQ). En algunas realizaciones, la puntuación IHQ es de 1 o 0. En algunas realizaciones, la puntuación IHQ es de 1. En algunas realizaciones, la puntuación IHQ es de 0. Una expresión de biomarcador c-met baja se detecta por la presencia de tinción c-met negativa, menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción c-met débil o débil o moderada combinada o el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción c-met débil o moderada y débil combinada pero menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción moderada o moderada y fuerte combinada. La intensidad de tinción de expresión de c-met se determina con respecto a la intensidad de tinción c-met de gránulos de células de control. La línea celular H1155 tiene tinción c-met negativa y la línea celular HEK-203 tiene intensidad de tinción c-met baja. En algunas realizaciones de cualquiera de las invenciones desveladas en la presente memoria, una expresión baja de biomarcador c-met es un estado clínico de diagnóstico negativo a met, como se define de acuerdo con la Tabla A de la presente memoria.

55 La invención también se refiere a métodos para seleccionar una terapia para un paciente con cáncer, que comprenden determinar la expresión de biomarcador c-met en una muestra del paciente y seleccionar un medicamento para el cáncer en función del nivel de expresión del biomarcador como se define en las reivindicaciones. En una realización, se selecciona al paciente para el tratamiento con un antagonista de c-met (por ejemplo, un anticuerpo anti-c-met) si la muestra de cáncer expresa el biomarcador c-met a un nivel alto. En algunas realizaciones, el cáncer del paciente es tratado utilizando una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de c-met. Por tanto, en algunas realizaciones, se selecciona al paciente para el tratamiento con un antagonista de c-met (por ejemplo, un anticuerpo anti-c-met) si la muestra de cáncer del paciente expresa el biomarcador c-met a un nivel alto, y (después de la selección) el cáncer del paciente es tratado utilizando una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de c-met. En otra realización, se selecciona al paciente para el tratamiento con un medicamento para el cáncer que no sea un antagonista de c-met, si la muestra de cáncer expresa el biomarcador c-met a un nivel bajo (por ejemplo, la muestra de cáncer expresa niveles bajos o sustancialmente indetectables del biomarcador). En algunas realizaciones, el cáncer del paciente es tratado utilizando cantidades terapéuticamente eficaces de un medicamento para el cáncer que no sea un antagonista de c-met. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se selecciona al paciente para el tratamiento con un medicamento para el cáncer que no sea un antagonista de c-met

(por ejemplo, un antagonista de EGFR, por ejemplo, erlotinib) si la muestra de cáncer expresa el biomarcador c-met a un nivel bajo (es decir, bajo o sustancialmente indetectable) y (después de la selección) el cáncer del paciente es tratado utilizando una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de c-met.

- 5 Por otro lado, la divulgación se refiere a métodos para publicitar un medicamento para el cáncer (por ejemplo, un antagonista de c-met), que comprende promocionar, a un público objetivo, el uso del medicamento para el cáncer para tratar a un paciente con cáncer basándose en la expresión del biomarcador c-met. La promoción se puede realizar por cualquier medio disponible. En algunas realizaciones, la promoción es mediante un prospecto anexo a una formulación comercial del antagonista de c-met (tal como un anticuerpo anti-c-met). La promoción también
- 10 puede ser mediante un prospecto anexo a una formulación comercial de un segundo medicamento (cuando el tratamiento es una terapia de combinación con un antagonista de c-met y un segundo medicamento, por ejemplo, un antagonista de EGFR tal como erlotinib). La promoción puede ser por comunicación escrita u oral a un médico o a proveedor de atención sanitaria. En algunas realizaciones, la promoción es mediante un prospecto que ofrece instrucciones sobre cómo recibir terapia con un antagonista de c-met, y en algunas realizaciones, en combinación con un segundo medicamento, tal como un antagonista de EGFR (tal como erlotinib) o, en otras realizaciones, con un anticuerpo anti-VEGF. En algunas realizaciones, después de la promoción se realiza el tratamiento del paciente con el antagonista de c-met con o sin el segundo medicamento (por ejemplo, erlotinib). En algunas realizaciones, después de la promoción se realiza el tratamiento del paciente con el segundo medicamento con o sin tratamiento con un antagonista c-met. En algunas realizaciones, el prospecto indica que el antagonista de c-met es para su uso
- 20 para el tratamiento del paciente, si la muestra de cáncer del paciente expresa una alta cantidad de biomarcador c-met. En algunas realizaciones, el prospecto indica que el antagonista de c-met no es para su uso para el tratamiento del paciente si la muestra de cáncer del paciente expresa una baja cantidad de biomarcador c-met. En algunas realizaciones, una alta cantidad de biomarcador c-met significa una probabilidad de aumentar la SSP y/u SG cuando el paciente es tratado con un antagonista de c-met (o en algunas realizaciones, cuando se trata con un antagonista de c-met en combinación con un antagonista de EGFR). En algunas realizaciones, una baja cantidad de biomarcador c-met significa una probabilidad de disminuir la SSP y/u SG cuando el paciente es tratado con un antagonista de c-met (o en algunas realizaciones, cuando se trata con un antagonista c-met en combinación con un antagonista EGFR). En algunas realizaciones, la SSP y/u SG disminuyen con respecto a un paciente que no se ha tratado con el antagonista de c-met (o en algunas realizaciones, tratado con el antagonista de c-met en combinación con el antagonista de EGFR). En algunas realizaciones, la promoción es mediante un prospecto que ofrece instrucciones sobre cómo recibir terapia con un anticuerpo anti-c-met en combinación con un antagonista de EGFR. En algunas realizaciones, después de la promoción se realiza el tratamiento del paciente con el anticuerpo anti-c-met con o sin el segundo medicamento.
- 35 En algunos aspectos, la divulgación presenta métodos para enseñar a un paciente con cáncer (tal como CPNM) que expresa altos niveles de biomarcador c-met, proporcionando instrucciones sobre cómo recibir tratamiento con un antagonista de c-met (por ejemplo, un anticuerpo anti-c-met) y en algunas realizaciones, tratamiento con un segundo medicamento (tal como un antagonista de EGFR, por ejemplo erlotinib), por ejemplo, para aumentar la supervivencia del paciente, para disminuir el riesgo de recurrencia del cáncer del paciente y/o para aumentar la probabilidad de supervivencia del paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende administrar al paciente que padece CPNM, un anticuerpo anti-c-met (por ejemplo, MetMAb) administrado en combinación con un antagonista de EGFR, tal como erlotinib. En algunas realizaciones el método comprende adicionalmente proporcionar instrucciones sobre cómo recibir tratamiento con al menos un agente quimioterapéutico. En determinadas realizaciones el paciente es tratado como enseña el método de enseñanza. En algunas realizaciones, el prospecto indica que el antagonista de
- 45 c-met es para su uso para el tratamiento del paciente si la muestra de cáncer del paciente expresa una alta cantidad de biomarcador c-met. En algunas realizaciones, las instrucciones indican que el antagonista de c-met no es para su uso para el tratamiento del paciente si en la muestra de cáncer del paciente se expresa una baja cantidad de biomarcador c-met, en el que una baja cantidad de biomarcador c-met significa disminución de la SSP y SG cuando el paciente es tratado con el antagonista de c-met (o en algunas realizaciones, se trata con antagonista de c-met en combinación con antagonista de EGFR). En algunas realizaciones, la SSP y/u SG disminuyen con respecto a un paciente que no se trata con antagonista de c-met (o en algunas realizaciones, cuando se trata con un antagonista de c-met en combinación con un antagonista de EGFR).

55 La divulgación también proporciona métodos comerciales, que comprenden la comercialización de un antagonista de c-met, (por ejemplo, un anticuerpo anti-c-met) para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, CPNM) en un paciente humano, o en el que el cáncer del paciente expresó una alta (elevada) expresión de biomarcador c-met, por ejemplo, para aumentar la supervivencia, disminuir la probabilidad de recurrencia del cáncer del paciente, y/o aumentar la probabilidad de supervivencia del paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende administrar, a un paciente con cáncer, un anticuerpo anti-c-met (por ejemplo, MetMAb), y en algunas realizaciones, un segundo medicamento (por ejemplo, un antagonista de EGFR, tal como erlotinib). En algunas realizaciones, después de la comercialización se realiza el tratamiento del paciente con el antagonista de c-met (tal como un anticuerpo anti-c-met) y en algunas realizaciones, el tratamiento con el anticuerpo anti-c-met y/o el antagonista de EGFR. En algunos aspectos, la invención presenta un método para enseñar a un paciente con cáncer (tal como CPNM) que expresa niveles bajos (es decir, bajos o sustancialmente indetectables) de biomarcador c-met, proporcionando instrucciones sobre cómo recibir tratamiento con un medicamento para el cáncer que no es un antagonista de c-met. En determinadas realizaciones el paciente es tratado como se enseña en el método de enseñanza.

65

En un aspecto, la invención proporciona un antagonista de c-met para su uso para el tratamiento de un paciente con cáncer, en el que el paciente expresa una alta cantidad de biomarcador c-met como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el cáncer del paciente expresa una alta cantidad de biomarcador c-met.

5 En un aspecto, la invención proporciona el uso *in vitro* de un ensayo de inmunohistoquímica, IHQ, para c-met, con intención de identificar a un paciente con cáncer que sea adecuado para recibir tratamiento con un antagonista de c-met, en el que el paciente expresa una alta cantidad de biomarcador c-met. En algunas realizaciones, el cáncer del paciente expresa una alta cantidad de biomarcador c-met.

10 En un aspecto, la invención se refiere a kits de diagnóstico que comprenden uno o más reactivos para determinar la expresión de un biomarcador c-met en una muestra procedente de un paciente con cáncer (por ejemplo, CPNM). El kit de diagnóstico es adecuado para su uso con cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, la detección de una alta cantidad de biomarcador c-met significa un aumento de la SSP y/u SG aumentadas cuando el paciente es tratado con un antagonista de c-met. En algunas realizaciones, la detección de una baja cantidad de biomarcador c-met significa una disminución de la SSP y/u SG cuando el paciente es tratado con el antagonista de c-met. En algunas realizaciones, el kit comprende adicionalmente instrucciones para su uso para seleccionar un medicamento basado en c-met para tratar a un paciente con CPNM.

15 En un aspecto, la invención proporciona el uso de un kit de diagnóstico para identificar a un paciente con cáncer, adecuado para el tratamiento con un antagonista de c-met, en el que el paciente expresa una alta cantidad de biomarcador c-met, como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el cáncer del paciente expresa una alta cantidad de biomarcador c-met.

20 La invención también se refiere a artículos de fabricación que comprenden, envasados conjuntamente, un antagonista de c-met en un vehículo farmacéuticamente aceptable y un prospecto que indica que el antagonista de c-met es para el tratamiento de un paciente con cáncer en función de la expresión del biomarcador c-met. Los métodos de tratamiento incluyen cualquiera de los métodos de tratamiento desvelados en la presente memoria. En algunas realizaciones, el prospecto indica que el antagonista de c-met debe utilizarse para tratar al paciente si la muestra de cáncer del paciente expresa una alta cantidad de biomarcador c-met. En algunas realizaciones, la SSP y/u SG probablemente aumentan con respecto a un paciente que no se ha tratado con el antagonista de c-met (o en algunas realizaciones, se ha tratado con un antagonista de c-met en combinación con un antagonista de EGFR). En algunas realizaciones, el prospecto indica que el antagonista de c-met no debe utilizarse para tratar al paciente si la muestra de cáncer del paciente expresa baja cantidad de biomarcador c-met. En algunas realizaciones, baja cantidad de c-met significa disminución de la SSP y SG cuando el paciente ha sido tratado con antagonista de c-met (o en algunas realizaciones, se ha tratado con antagonista de c-met en combinación con antagonista de EGFR). En algunas realizaciones, la SSP y/u SG están probablemente disminuidas con respecto a un paciente que no se ha tratado con antagonista c-met (o en algunas realizaciones, se ha tratado con antagonista de c-met en combinación con antagonista de EGFR).

25 En un aspecto relacionado, la invención se refiere a métodos para fabricar un artículo de fabricación que comprende combinar en un envase una composición farmacéutica que comprende un medicamento para el cáncer y un prospecto que indica que la composición farmacéutica es para el tratamiento de un paciente con cáncer, que se basa en la expresión del biomarcador c-met. Los métodos de tratamiento incluyen cualquiera de los métodos de tratamiento desvelados en la presente memoria. En algunas realizaciones, el prospecto indica que el antagonista de c-met es para su uso en el tratamiento del paciente si la muestra de cáncer del paciente expresa una alta cantidad de biomarcador c-met. En algunas realizaciones, el prospecto indica que el antagonista de c-met no debe utilizarse para el tratamiento del paciente si la muestra de cáncer de paciente expresa una baja cantidad de biomarcador c-met. En algunas realizaciones, baja cantidad de biomarcador c-met significa probabilidad aumentada de disminución de SSP y SG cuando el paciente es tratado con el antagonista de c-met (o en algunas realizaciones, se trata con antagonista de c-met en combinación con antagonista de EGFR). En algunas realizaciones, la SSP y/u SG disminuyen con respecto a un paciente que no se ha tratado con el antagonista de c-met (o en algunas realizaciones, se ha tratado con antagonista de c-met en combinación con el antagonista de EGFR).

30 En determinadas realizaciones de cualquiera de las invenciones descritas en la presente memoria, el cáncer puede ser cáncer de pulmón no microcítico (incluyendo, por ejemplo, carcinoma de células escamosas (CCE, *squamous cell carcinoma*)), cáncer de células renales, cáncer pancreático, carcinoma gástrico, cáncer de vejiga, cáncer esofágico, mesotelioma, melanoma, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama triple negativo), cáncer tiroideo, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, osteosarcoma, cáncer de próstata o glioblastoma. En algunas realizaciones, el cáncer es CPNM. En algunas realizaciones, el CPNM es cáncer de pulmón no microcítico de segunda línea o de tercera línea localmente avanzado o metastásico. En algunas realizaciones, el CPNM es adenocarcinoma. En algunas realizaciones, el CPNM es carcinoma de células escamosas. En la presente memoria se describen otros cánceres a modo de ejemplo. En algunas realizaciones, el CPNM es CPNM de segunda línea o de tercera línea localmente avanzado o metastásico después de un fracaso de al menos un régimen de quimioterapia previo.

35 En determinadas realizaciones, el paciente no recibió más de dos tratamientos previos para la Fase IIIB/IV. En

algunas realizaciones, el paciente no recibió más de 30 días de exposición a un agente en investigación o comercializado que puede actuar mediante inhibición de EGFR, o a una toxicidad conocida relacionada con EGFR que dé lugar a modificaciones de la dosis. Como inhibidores de EGFR se incluyen (pero sin limitación) gefitinib, erlotinib y cetuximab. En algunas realizaciones, el paciente no recibió quimioterapia, bioterapia, radioterapia o fármaco en investigación en los días previos a la aleatorización (excepto que, opcionalmente, puedan utilizarse inhibidores de quinasa en las dos semanas previas a la aleatorización siempre que se resuelva adecuadamente cualquier toxicidad relacionada con el fármaco). En algunas realizaciones, el paciente no es un paciente con metástasis del SNC no tratada y/o activa (que progresa o requiere anticonvulsivos o corticosteroides para el control sintomático). En algunas realizaciones, se ha mostrado que una muestra del paciente con cáncer tiene EGFR de tipo silvestre (*wildtype*). En algunas realizaciones, no se ha mostrado que una muestra del paciente con cáncer tiene EGFR mutado. En los ejemplos se describen otros criterios de exclusión de pacientes y las presentes invenciones contemplan el uso de una o más de las exclusiones descritas en los mismos.

Los antagonistas de c-met, por ejemplo, adecuados para su uso en cualquiera de las invenciones descritas en la presente memoria, son conocidos en la técnica y algunos se describen adicionalmente en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met es un anticuerpo antagonista anti-c-met. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-c-met comprende (a) una HVR1 que comprende la secuencia GYTFSTSYWLH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR2 que comprende la secuencia GMIDPNSDTRFNPFKD (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR3-HC que comprende la secuencia ATYRSYVTPLDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR1-LC que comprende la secuencia KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR2-LC que comprende la secuencia WASTRES (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR3-LC que comprende la secuencia QQYYAYPWT (SEQ ID NO: 6). En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-c-met es monovalente y comprende (a) un primer polipéptido que comprende una cadena pesada, comprendiendo dicho polipéptido la secuencia de SEQ ID NO: 11; (b) un segundo polipéptido que comprende una cadena ligera, comprendiendo el polipéptido la secuencia de SEQ ID NO: 12 y un tercer polipéptido que comprende una secuencia Fc, comprendiendo el polipéptido la secuencia de SEQ ID NO: 13, en el que el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera están presentes como un complejo y forman un solo brazo de unión a antígeno, en el que el primer y segundo polipéptidos de Fc están presentes en un complejo y forman una región Fc que aumenta la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno. En determinadas realizaciones, el anticuerpo c-met es MetMAB (denominado indistintamente "onartuzumab"). En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met es uno cualquiera o más de crizotinib, tivantinib, carbozantinib, MGCD-265, ficlatuzumab, TAK-701 humanizado, rilotumumab, foretinib, h224G11, DN-30, MK-2461, E7050, MK-8033, PF-4217903, AMG208, JNJ-38877605, EMD1204831, INC-280, LY-2801653, SGX-126, RP1040, LY2801653, BAY-853474 y/o LA480. En la presente memoria se describen otros antagonistas de c-met que son adecuados para su uso en las presentes invenciones.

Los medicamentos para el cáncer se pueden utilizar solos o en combinación con otros medicamentos para el cáncer. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utiliza un antagonista de c-met (por ejemplo, un anticuerpo anti-c-met) en combinación con un antagonista de EGFR (por ejemplo, erlotinib). En determinadas realizaciones, erlotinib se administra a una dosis de 150 mg, cada día de un ciclo de tres semanas. En determinadas realizaciones, erlotinib se administra a una dosis de 100 mg, cada día de un ciclo de tres semanas. En determinadas realizaciones, erlotinib se administra a una dosis de 50 mg, cada día a un ciclo de tres semanas. Un protocolo a modo de ejemplo es administrar a un paciente con CPNM (a) un anticuerpo anti-c-met (tal como MetMAB) a una dosis de aproximadamente 15 mg/kg cada tres semanas; y (b) erlotinib (N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina) a una dosis de 150 mg, cada día de un ciclo de tres semanas. En otras realizaciones, se utiliza un antagonista de c-met (por ejemplo, anticuerpo anti-c-met) en combinación con un anticuerpo anti-VEGF y quimioterapia (por ejemplo, un taxano). Un protocolo a modo de ejemplo es administrar, a un paciente con cáncer de mama metastásico triple negativo, un anticuerpo anti-c-met (por ejemplo, MetMAB), administrado a una dosis de 10 mg/kg el Día 1 y el Día 15 de un ciclo de 28 días, un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo, bevacizumab) administrado a una dosis de 10 mg/kg el Día 1 y Día 15 del ciclo de 28 días y paclitaxel administrado a una dosis de 90 mg/m<sup>2</sup> por infusión IV el Día 1, el Día 8 y el Día 15 del ciclo de 28 días. Otro protocolo a modo de ejemplo es administrar, a un paciente con cáncer de mama metastásico triple negativo, un anticuerpo anti-c-met (por ejemplo, MetMAB) administrado a una dosis de 10 mg/kg el Día 1 y el Día 15 de un ciclo de 28 días y paclitaxel administrado a una dosis de 90 mg/m<sup>2</sup> por infusión IV el Día 1, Día 8 y Día 15 del ciclo de 28 días. En determinadas realizaciones, MetMAB se administra a una dosis de aproximadamente 15 mg/kg cada tres semanas, o a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg cada dos semanas. En algunas realizaciones, se utiliza crizotinib en combinación con un antagonista de EGFR (en algunas realizaciones, erlotinib). En algunas realizaciones, se utiliza carbozantinib en combinación con un antagonista de EGFR (en algunas realizaciones, erlotinib). En algunas realizaciones, se utiliza foretinib en combinación con un antagonista de EGFR (en algunas realizaciones, erlotinib). En algunas realizaciones, se utiliza tivantinib en combinación con un antagonista de EGFR (en algunas realizaciones, erlotinib). En algunas realizaciones, se utiliza MGCD-265 en combinación con un antagonista de EGFR (en algunas realizaciones, erlotinib). En algunas realizaciones, se utiliza rilotumumab en combinación con un antagonista de EGFR (en algunas realizaciones, erlotinib). En algunas realizaciones, se utiliza ficlatuzumab en combinación con un antagonista de EGFR (en algunas realizaciones, erlotinib). En algunas realizaciones, se utiliza el anticuerpo anti HGF humanizado TAK-701 en combinación con un antagonista de EGFR (en algunas realizaciones, erlotinib). En la presente memoria se describen otros medicamentos para el cáncer.

En la presente memoria se desvela e ilustra la detección del biomarcador c-met. En algunas realizaciones de cualquiera de las invenciones descritas en la presente memoria, una expresión alta de un biomarcador c-met en un cáncer de un paciente es una expresión alta de la proteína y, en realizaciones adicionales, se determina utilizando IHQ. En algunas realizaciones, la puntuación IHQ es de 2 o 3. En algunas realizaciones, la puntuación IHQ es de 3.

5 En algunas realizaciones, la puntuación IHQ es de 2. En algunas realizaciones, biomarcador c-met alto es (significa) que el 50 % o más de las células tumorales tiene intensidad de tinción c-met moderada, intensidad de tinción c-met moderada/alta combinada o intensidad de tinción c-met alta. En algunas realizaciones, biomarcador c-met alto es el 50 % o más de las células tumorales con intensidad de tinción c-met moderada o alta. En algunas realizaciones, expresión alta de un biomarcador c-met es expresión alta de ARNm (y en algunas realizaciones, se detecta

10 utilizando RT-PCR cualitativa o hibridación *in situ*). En algunas realizaciones, la expresión alta de un biomarcador c-met es la amplificación del gen *c-met* (y en algunas realizaciones, se detecta utilizando FISH). En otras realizaciones, se utiliza perfil de expresión de genes, PCR (tal como rtPCR), RNA-seq, análisis de micromatriz, SAGE, técnica MassARRAY o se utiliza FISH para detectar el biomarcador c-met. En algunas realizaciones, la SSP y/u SG están probablemente aumentadas (es decir, hay una probabilidad de que la SSP y/u SG estén aumentadas)

15 en relación con un paciente que no se ha tratado con el antagonista de c-met (o en algunas realizaciones, tratado con antagonista de c-met en combinación con antagonista de EGFR). En algunas realizaciones de cualquiera de las invenciones desveladas en la presente memoria, una expresión alta de biomarcador c-met es un estado clínico de diagnóstico met positivo, como se define de acuerdo con la Tabla A de la presente memoria.

20 En algunas realizaciones de cualquiera de las invenciones descritas en la presente memoria, expresión baja de un biomarcador c-met en un paciente con cáncer es expresión baja de proteína y se determina utilizando IHQ. En algunas realizaciones, la puntuación IHQ es de 1. En algunas realizaciones, la puntuación IHQ es de 0. En algunas realizaciones, la puntuación IHQ es de 0 o 1. En algunas realizaciones, biomarcador c-met bajo es negativo a tinción c-met, menos de 50 % de las células tumorales tienen intensidad de tinción c-met débil o débil y moderada

25 combinada, o el 50 % o más de las células tumorales con intensidad de tinción c-met débil o débil y moderada combinada, pero menos del 50 % de las células tumorales con intensidad de tinción c-met moderada o moderada y fuerte combinada. En algunas realizaciones, biomarcador c-met bajo significa mayor probabilidad de disminuir la SSP y SG cuando el paciente es tratado con el antagonista de c-met (o en algunas realizaciones, se trata con antagonista de c-met en combinación con antagonista de EGFR). En algunas realizaciones, la SSP y/u SG están

30 probablemente disminuidas (es decir, hay una probabilidad de disminución de SSP y/u SG) con respecto a un paciente que no se ha tratado con el antagonista de c-met (o en algunas realizaciones, se ha tratado con antagonista de c-met en combinación con antagonista de EGFR). En algunas realizaciones de cualquiera de las invenciones desveladas en la presente memoria, una expresión baja de biomarcador c-met es un estado clínico de diagnóstico met negativo, como se define de acuerdo con la Tabla A de la presente memoria.

35 Opcionalmente, en una muestra de un paciente pueden detectarse otros biomarcadores. En algunas realizaciones, se ha encontrado que el cáncer del paciente expresa EGFR de tipo silvestre (en algunas realizaciones, expresa adicionalmente amplificación del gen *c-met*, y en otras realizaciones adicionales, no expresa amplificación del gen *c-met*). En determinadas realizaciones, se ha encontrado que el cáncer del paciente expresa un biomarcador

40 seleccionado de *kras* y EGFR. En algunas realizaciones, se ha encontrado que el cáncer del paciente expresa *kras* mutado. En algunas realizaciones, se ha encontrado que el cáncer del paciente expresa *kras* de tipo silvestre. En algunas realizaciones, se ha encontrado que el cáncer del paciente expresa EGFR mutado. En algunas realizaciones, se ha encontrado que el cáncer del paciente expresa una translocación quinasa del linfoma anaplásico (ALK). En algunas realizaciones, la translocación de ALK es una

45 translocación EML4-ALK. En algunas realizaciones, se ha encontrado que el cáncer el paciente expresa c-met mutado. En algunas realizaciones, se ha encontrado que el cáncer del paciente expresa c-met de tipo silvestre.

En la presente memoria se desvelan otras realizaciones con respecto a la determinación de la expresión del biomarcador (por ejemplo, biomarcador c-met).

50 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para evaluar acontecimientos adversos en un paciente asociado al tratamiento de un cáncer que expresa una alta cantidad de biomarcador c-met, en el que el tratamiento es con un antagonista de c-met (por ejemplo) MetMAb (onartuzumab) y el método comprende las etapas de monitorizar el número y/o la gravedad de uno o más acontecimientos adversos. En la presente memoria se desvelan

55 ejemplos de acontecimientos adversos.

### Breve descripción de las figuras

60 La patente o archivo de solicitud contiene al menos un dibujo a color. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) a color serán proporcionadas por la Oficina después de solicitarlo y efectuar el pago de las tarifas necesarias.

La Figura 1 muestra un ejemplo de un análisis de IHQ de gránulos de células de control.

La Figura 2 muestra un ejemplo de análisis de IHQ de muestras de tumor de CPNM.

65 La Figura 3 muestra un análisis de tratamiento de pacientes con Met alto, con Erlotinib + placebo (línea continua) frente a Erlotinib + MetMAb (línea discontinua).

La Figura 4 muestra un análisis de tratamiento de pacientes con Met bajo, con Erlotinib + placebo (línea continua) frente a Erlotinib + MetMAB (línea discontinua).

La Figura 5 muestra un análisis de tratamiento de todos los pacientes con Erlotinib + placebo (línea continua) frente a Erlotinib + MetMAB (línea discontinua).

5 La Figura 6 muestra la SSP examinada por subgrupos.

La Figura 7 muestra la SG examinada por subgrupos.

La Figura 8 muestra un análisis de pronóstico por expresión de Met en pacientes tratados con erlotinib + placebo. Met bajo = línea discontinua; Met alto = línea continua

La Figura 9 muestra un análisis por subgrupos de SSP en pacientes con Met alto.

10 La Figura 10 muestra un análisis por subgrupos de SG en pacientes con Met alto.

La Figura 11 muestra un análisis por subgrupos de SSP en pacientes con Met bajo.

La Figura 12 muestra un análisis por subgrupos de SG en pacientes con Met bajo.

La Figura 13 muestra un análisis final de tratamiento de pacientes con diagnóstico Met positivo con Erlotinib + placebo (línea continua) frente a Erlotinib + MetMAB (línea discontinua).

15 La Figura 14 muestra un análisis final de tratamiento de pacientes con diagnóstico Met negativo con Erlotinib + placebo (línea continua) frente a Erlotinib + MetMAB (línea discontinua).

La Figura 15 muestra un análisis final de tratamiento de todos los pacientes con Erlotinib + placebo (línea continua) frente a Erlotinib + MetMAB (línea discontinua).

La Figura 16 muestra la SG examinada por subgrupos.

20 La Figura 17 muestra un análisis final de SG en pacientes con diagnóstico Met negativo.

La Figura 18 muestra un análisis de SG en determinadas subpoblaciones de pacientes.

La Figura 19 muestra que la expresión de Met se asoció con mal resultado en pacientes tratados con Erlotinib + placebo.

La Figura 20 muestra la relación de niveles de ARNm de *MET* con una puntuación clínica por IHQ de met.

25 La Figura 21 muestra el efecto del tratamiento de MetMAB en combinación con erlotinib evaluado en pacientes definido utilizando un límite de expresión de Met menos riguroso y límites de expresión Met más rigurosos. Todas las razones de riesgos se estimaron a partir de análisis no estratificados.

## 30 Descripción detallada de realizaciones de la invención

### I. Definiciones

35 En la presente memoria, un "paciente" es un paciente humano. El paciente puede ser un "paciente con cáncer", es decir, uno que padece o que está en riesgo de padecer uno o más síntomas de cáncer. Además, el paciente puede ser un paciente previamente tratado de cáncer. El paciente puede ser un "paciente con cáncer de pulmón no microcítico, CPNM", es decir, uno que padece o que está en riesgo de padecer uno o más síntomas de CPNM. Además, el paciente puede ser un paciente con CPNM previamente tratado.

40 La expresión "c-met" o "Met", como se utiliza en la presente memoria, se refiere, a menos que se indique de otra manera, a cualquier polipéptido c-met nativo o variante (ya sea nativo o sintético). La expresión "c-met de tipo silvestre" se refiere en general a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína c-met de origen natural. La expresión "secuencia de c-met de tipo silvestre" se refiere en general a una secuencia de aminoácidos encontrada en una proteína c-met de origen natural.

45 Un "anticuerpo anti-c-met" es un anticuerpo que se une a c-met con suficiente afinidad y especificidad. El anticuerpo seleccionado normalmente tendrá una afinidad de unión suficientemente fuerte por c-met, por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a c-met humano con un valor  $K_d$  de entre 100 nM-1 pM. Las afinidades de los anticuerpos pueden definirse mediante un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (tal como el ensayo BIAcore descrito en la Publicación de Solicitud PCT N.º WO2005/012359); un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); y ensayos de competición (por ejemplo RIA), por ejemplo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-c-met puede utilizarse como un agente terapéutico en el direccionamiento e interferencia con enfermedades o afecciones en las que está implicada la actividad de c-met. Además, el anticuerpo puede someterse a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como un agente terapéutico. Dichos ensayos se conocen en la técnica y dependen del antígeno diana y del uso que se desee dar al anticuerpo.

55 Un "antagonista de c-met" (denominado indistintamente "inhibidor de c-met") es un agente que interfiere con la activación o función de c-met. Como ejemplos de inhibidores de c-met se incluyen anticuerpos c-met; anticuerpos HGF; antagonistas c-met de molécula pequeña; inhibidores de c-met tirosina quinasa; moléculas de ARN antisentido e inhibidor (por ejemplo, ARNhc) (véase, por ejemplo, el documento WO2004/87207). Preferentemente, el inhibidor de c-met es un anticuerpo o una molécula pequeña que se une a c-met. En una realización particular, un inhibidor de c-met tiene una afinidad de unión (constante de disociación) por c-met de aproximadamente 1.000 nM o menor. En otra realización, un inhibidor de c-met tiene una afinidad de unión por c-met de aproximadamente 100 nM o menor. En otra realización, un inhibidor de c-met tiene una afinidad de unión por c-met de aproximadamente 50 nM o menor. En una realización particular, un inhibidor de c-met está unido mediante enlace covalente a c-met. En una realización particular, un inhibidor de c-met inhibe la señalización de c-met con un valor CI50 de 1.000 nM o menor. En otra realización, un inhibidor de c-met inhibe la señalización de c-met con un valor CI50 de 500 nM o menor. En

otra realización, un inhibidor de c-met inhibe la señalización de c-met con un valor CI50 de 50 nM o menor.

La "activación de c-met" se refiere a la activación, o fosforilación, del receptor de c-met. En general, la activación de c-met da como resultado la transducción de señal (por ejemplo, que está causada por un dominio quinasa intracelular de un receptor de c-met que fosforila restos de tirosina en c-met o un polipéptido sustrato). La activación de c-met puede estar mediada por la unión del ligando de c-met (HGF) con un receptor de c-met de interés. La unión de HGF con c-met puede activar un dominio quinasa de c-met y por lo tanto dar como resultado la fosforilación de restos de tirosina en c-met y/o la fosforilación de restos de tirosina en uno o más polipéptidos sustrato adicionales.

Una "población" de sujetos se refiere a un grupo de sujetos con cáncer, tal como en un ensayo clínico, o como observan los oncólogos siguiendo la aprobación de la FDA para una indicación particular, tal como una terapia para el cáncer de mama.

La frase "no posee expresión de biomarcador sustancial" o "sustancialmente sin expresión de biomarcador", con respecto a un biomarcador, como se utiliza en la presente memoria, significa que el biomarcador no presenta un nivel de expresión que esté por encima del nivel de fondo, es decir, de significado estadístico. La frase "escasa o ninguna expresión de biomarcador" con respecto a un biomarcador, como se utiliza en la presente memoria, significa que el biomarcador no presenta una cantidad de expresión biológicamente significativa. Como se entiende en la técnica, una cantidad de expresión puede determinarse cuantitativa o cualitativamente, siempre que pueda realizarse una comparación entre una muestra de biomarcador y un homólogo de referencia. La expresión puede medirse o detectarse de acuerdo con cualquier ensayo o técnica conocido en la materia, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la presente memoria (tal como IHQ).

La expresión "amplificación génica" se refiere a un proceso mediante el cual se forman múltiples copias de un gen o de un fragmento génico en una célula o línea celular particular.

Para los métodos de la invención, la expresión "enseñar" a un paciente, significa proporcionar instrucciones para una terapia, medicación, tratamiento, regímenes de tratamiento aplicables, y similar, mediante cualquier medio, pero preferentemente por escrito, tal como en forma de un prospecto u otro material promocional escrito.

Para los métodos de la invención, el término "promoción" significa ofrecer, anunciar, vender, o describir un fármaco particular, una combinación de fármacos, o una modalidad de tratamiento, mediante cualquier medio, incluido por escrito, tal como en forma de prospecto. En la presente memoria, promoción se refiere a una promoción de uno o más agentes terapéuticos, tales como un anticuerpo anti-c-met y/o erlotinib, para una indicación, tal como un tratamiento para CPNM, el que dicha promoción está autorizada por la Food and Drug Administration (FDA) ya que se ha demostrado que está asociada con una eficacia terapéutica estadísticamente significativa y una seguridad aceptable en una población de sujetos.

El término "comercialización" se utiliza en la presente memoria para describir la promoción, venta o distribución de un producto (por ejemplo, fármaco). La comercialización incluye especialmente el envasado, la publicidad y cualquier actividad comercial con el fin de comercializar un producto.

Para los fines de la presente memoria, un paciente con cáncer "previamente tratado" ha recibido terapia anterior para el cáncer.

El cáncer "refractario" avanza incluso a través de un agente antitumoral, tal como un agente quimioterapéutico, que se administra al paciente con cáncer.

Un "medicamento para el cáncer" es un fármaco eficaz para el tratamiento del cáncer. Como ejemplos de medicamentos para el cáncer se incluyen los agentes quimioterapéuticos y regímenes de quimioterapia indicados más adelante; antagonistas de c-met, incluyendo anticuerpos anti-c-met, tales como MetMAB.

El término "biomarcador" o "marcador" como se utiliza en la presente memoria se refiere en general a una molécula, incluyendo un gen, ARNm, una proteína, una estructura de hidrato de carbono, o un glucolípido, cuya expresión en o sobre un tejido o una célula o secretado puede detectarse por métodos conocidos (o métodos desvelados en la presente memoria) y es predictivo o puede utilizarse para predecir (o ayudar en la predicción de) la respuesta de una célula, tejido o paciente a los regímenes de tratamiento. El biomarcador de particular interés en la presente memoria es c-met. En algunas realizaciones, el biomarcador c-met no incluye la amplificación del gen c-met (por ejemplo, un promedio en una población de células de 3 o más, 4 o más, 5 o más copias del gen c-met, o más, tal como un promedio de 8 o más, o 10 o más copias del gen c-met).

Por "muestra del paciente" se entiende un conjunto de células similares obtenidas de un paciente con cáncer. La fuente de muestra de tejido o célula puede ser tejido sólido como de una muestra de un órgano o tejido reciente, congelada y/o conservada o una biopsia o aspirado; sangre o cualquiera de los constituyentes de la sangre; líquidos corporales tales como líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células de cualquier tiempo de gestación o desarrollo del sujeto. La muestra de tejido puede contener compuestos que no están naturalmente entremezclados con el tejido en la naturaleza, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones,

fijantes, nutrientes, antibióticos o similares. Como ejemplos de muestras tumorales en la presente memoria se incluyen, pero sin limitación, biopsias de tumor, células tumorales en circulación, suero o plasma, proteínas plasmáticas en circulación, líquido ascítico, cultivos de células primarias o líneas celulares procedentes de tumores o que presentan propiedades similares a tumores, así como muestras de tumor conservadas, tal como muestras de tumor fijadas en formalina, incluidas en parafina o muestras de tumor congeladas. En una realización la muestra comprende una muestra de tumor CPNM (por ejemplo, de subtipo escamoso o no escamoso).

Una “respuesta eficaz” de un paciente o una “receptividad” de un paciente a un tratamiento con un medicamento y expresiones similares, se refieren al beneficio clínico o terapéutico conferido a un paciente con riesgo de padecer, o que padece, un cáncer (por ejemplo, CPNM) después de la administración del medicamento para el cáncer. Dicho beneficio incluye cualquiera de uno o más de: ampliación de la supervivencia (incluyendo supervivencia global y supervivencia sin progresión); dando como resultado una respuesta objetiva (incluyendo una respuesta completa o una respuesta parcial); o mejora de los signos o síntomas de cáncer, etc. En una realización, el biomarcador (por ejemplo, expresión de c-met, por ejemplo, determinada utilizando IHQ) se utiliza para identificar al paciente que se espera que tenga una mayor supervivencia sin progresión (SSP) cuando se trata con un medicamento (por ejemplo, anticuerpo anti-c-met), con respecto a un paciente que no expresa el biomarcador al mismo nivel. En una realización, el biomarcador se utiliza para identificar al paciente que se espera que tenga una SSP reducida cuando se trata con un medicamento, con respecto a un paciente tratado con el medicamento que no expresa el biomarcador al mismo nivel, o con respecto a un paciente que no se trata con el medicamento que no expresa el biomarcador al mismo nivel. En una realización, el biomarcador se utiliza para identificar al paciente que se espera que tenga una mayor supervivencia global (SG) cuando se trata con un medicamento, con respecto a un paciente que no expresa el biomarcador al mismo nivel. En una realización, el biomarcador se utiliza para identificar al paciente que se espera que tenga una supervivencia global (SG) reducida, con respecto a un paciente que se trata con el medicamento que no expresa el biomarcador al mismo nivel, o con respecto a un paciente que no se trata con el medicamento que no expresa el biomarcador al mismo nivel. La frecuencia del biomarcador(es) en la presente memoria predice de un modo eficaz, o predice con alta sensibilidad, dicha respuesta eficaz.

“Supervivencia” se refiere a que el paciente sigue vivo, e incluye supervivencia global así como supervivencia sin progresión.

“Supervivencia global” se refiere a que el paciente sigue vivo durante un periodo de tiempo definido, tal como 1 año, 5 años, etc. desde el momento del diagnóstico o tratamiento.

“Supervivencia sin progresión” se refiere a que el paciente sigue vivo, sin que el cáncer avance o empeore.

Por “supervivencia prolongada” se entiende aumentar la supervivencia global o sin progresión en un paciente tratado con respecto a uno no tratado (es decir, con respecto a un paciente no tratado con el medicamento), o con respecto a un paciente que no expresa un biomarcador al nivel previsto y/o con respecto a un paciente tratado con un agente antitumoral autorizado (tal como un régimen de quimioterapia de erlotinib).

Una “respuesta objetiva” se refiere a una respuesta medible, incluyendo una respuesta completa (RC) o una respuesta parcial (RP).

Por “respuesta completa” o “RC” se entiende la desaparición de todas las señales de cáncer en respuesta al tratamiento. Esto no siempre significa que el cáncer se haya curado.

Una “respuesta parcial” o “RP” se refiere a una disminución en el tamaño de uno o más tumores o lesiones, o en el grado del cáncer en el organismo, en respuesta al tratamiento.

La “cantidad” o “nivel” de un biomarcador asociado a un beneficio clínico aumentado para un paciente con cáncer (por ejemplo CPNM) se refiere a un nivel detectable en una muestra biológica en la que el nivel del biomarcador está asociado a un beneficio clínico aumentado para el paciente. Este puede medirse por métodos conocidos por el experto en la materia y también desvelados en la presente invención. El nivel de expresión o cantidad de biomarcador evaluado puede utilizarse para determinar la respuesta al tratamiento. En algunas realizaciones, la cantidad o nivel de biomarcador se determina utilizando IHQ (por ejemplo, de una muestra de tumor de un paciente). En algunas realizaciones, la cantidad o nivel de un biomarcador c-met asociado a un beneficio clínico aumentado en un paciente con cáncer es una puntuación IHQ de 2, una puntuación IHQ de 3 o una puntuación IHQ de 2 o 3. En algunas realizaciones, la cantidad o nivel de un biomarcador c-met asociado a un beneficio clínico aumentado en un paciente con cáncer es el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción de c-met moderada, una intensidad de tinción de c-met moderada/alta combinada o una intensidad de tinción de c-met alta. En algunas realizaciones, la cantidad o nivel de un biomarcador c-met asociada a un beneficio clínico aumentado en un paciente con cáncer es el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción de c-met moderada o alta.

La “cantidad” o “nivel” de un biomarcador asociado a un beneficio clínico disminuido con respecto a un paciente con cáncer (por ejemplo CPNM) se refiere a la ausencia de biomarcador detectable o a un nivel detectable bajo en una muestra biológica, en el que el nivel del biomarcador está asociado a un beneficio clínico disminuido para el

paciente. Este puede medirse por métodos conocidos por el experto en la materia y también desvelados en la presente invención. El nivel de expresión o cantidad de biomarcador evaluado puede utilizarse para determinar la respuesta al tratamiento. En algunas realizaciones, la cantidad o nivel de biomarcador se determina utilizando IHQ (por ejemplo, de una muestra de tumor de un paciente). En algunas realizaciones, la cantidad o nivel de un biomarcador c-met asociado a un beneficio clínico disminuido en un paciente con cáncer es una puntuación IHQ de 0, una puntuación IHQ de 1 o una puntuación IHQ de 0 o 1. En algunas realizaciones, una cantidad o un nivel de biomarcador asociado a un beneficio clínico disminuido en un paciente con cáncer es una tinción de c-met negativa, menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción de c-met débil o moderada y débil combinada, o el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción de c-met débil o débil y moderada pero menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción de c-met moderada o moderada y fuerte combinada.

La frase "nivel de expresión" se refiere, en general, a la cantidad de un polinucleótido, un ARNm, o un producto de aminoácido o de proteína en una muestra biológica. "Expresión" generalmente se refiere al proceso mediante el cual la información codificada por un gen se convierte en estructuras presentes y operativas en la célula. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, la "expresión" de un gen puede referirse a la transcripción en un polinucleótido, a la traducción en una proteína o incluso a la modificación postraduccional de la proteína. Los fragmentos del polinucleótido transcrito, de la proteína traducida, o de la proteína postraduccionalmente modificada, se tendrán también en cuenta según se exprese si se originan de un transcrito generado por corte y empalme alternativo o de un transcrito degradado, o de un procesamiento postraduccional de la proteína, por ejemplo, por proteólisis. En algunas realizaciones, "nivel de expresión" se refiere a la cantidad de una proteína en una muestra biológica determinada utilizando IHQ.

La frase, "basándose en la expresión de", cuando se utiliza en la presente memoria, significa que la información sobre el nivel de expresión de uno o más biomarcadores de la presente memoria, se utiliza para comunicar una decisión de tratamiento, una información proporcionada en un prospecto, o una orientación comercial/promocional, etc. En el caso de un nivel de expresión alto del biomarcador, los pacientes pueden tratarse con un medicamento para el cáncer (por ejemplo CPNM) tal como un antagonista de c-met (por ejemplo, un anticuerpo anti-c-met, por ejemplo MetMAB). En el caso de un nivel de expresión reducido del biomarcador, los pacientes pueden tratarse con un medicamento para el cáncer que no sea un antagonista de c-met (por ejemplo, un anticuerpo anti-c-met, por ejemplo MetMAB).

"Tratamiento" se refiere a un tratamiento tanto terapéutico como profiláctico o a medidas preventivas. Los pacientes que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen un tumor benigno, precanceroso o no metastásico, así como aquellos en los que va a prevenirse la aparición o reaparición del cáncer.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno en un mamífero. En el caso de cánceres, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico puede reducir el número de células cancerosas, reducir el tamaño del tumor primario; inhibir (es decir, ralentizar a algún grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar a algún grado y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, a algún grado, el crecimiento tumoral; y/o mitigar a algún grado uno o más de los síntomas asociados al trastorno. Hasta el grado en el que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, este puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia contra el cáncer, la eficacia *in vivo* puede medirse, por ejemplo, evaluando la duración de la supervivencia, el tiempo de progresión de la enfermedad (TP), la velocidad de respuesta (VR), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida. Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a, o describen, la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. En esta definición se incluyen los cánceres benignos y malignos. Por "cáncer de fase temprana" o "tumor de fase temprana" se entiende un cáncer que no es invasivo o metastásico o que está clasificado como un cáncer de fase 0, I o II. Como ejemplos de cánceres se incluyen, pero sin limitación, 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 los islotes), mesotelioma, schwannoma (incluyendo neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o neoplasias linfoides. Como ejemplos más particulares de dichos cánceres se incluyen, cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer epitelial de células escamosas), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón microcítico (CPM), cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, 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 vulvar, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores del tracto biliar, así como cáncer de cabeza y cuello. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama metastásico triple negativo, incluyendo cualquier adenocarcinoma de la mama triple negativo (ER-, PR-, HER2-) histológicamente confirmado, con enfermedad localmente recurrente o metastásica (en la que la enfermedad localmente recurrente no puede tratarse con resección con intento curativo).

Un cáncer o muestra biológica que “presenta expresión de c-met” es uno que, en un ensayo de diagnóstico, expresa (incluyendo sobreexpresa) un receptor de c-met.

5 Un cáncer o muestra biológica, que “presenta amplificación de c-met” es uno que, en un ensayo de diagnóstico, tiene el gen c-met amplificado. En algunas realizaciones, el gen *c-met* amplificado es un promedio (en una población de células) mayor que, o igual a, 5 o más copias del gen *c-met*, o un promedio de ocho o más copias de un gen *c-met*, o más.

10 Un cáncer o muestra biológica que “no presenta amplificación de c-met” es uno que, en un ensayo de diagnóstico, no tiene el gen c-met amplificado. En algunas realizaciones, una muestra que no presenta amplificación de c-met es una muestra que tiene un promedio menor de 4 copias del gen *c-met*.

15 Por “EGFR” se entiende el receptor del Factor del Crecimiento Epidérmico, un polipéptido de tirosina quinasa receptora que se describe en Ullrich *et al*, Nature (1984) 309: 418425, de manera alternativa, referido como producto génico c-erbB y Her-1, así como sus variantes, tales como EGFRvIII. Las variantes de EGFR también incluyen variantes de 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), Pao *et al* (PNAS 2004, 101: 13306).

20 Un “antagonista de EGFR” (indistintamente denominado “inhibidor de EGFR”) es un agente que interfiere con la activación o función de EGFR. Como ejemplos de inhibidores de EGFR se incluyen anticuerpos contra EGFR; anticuerpos contra ligandos de EGFR; agonistas de EGFR de molécula pequeña; inhibidores de EGFR tirosina quinasa; moléculas de ARN antisentido e inhibidor (por ejemplo, ARNhc) (véase, por ejemplo, el documento WO2004/87207). Preferentemente, el inhibidor de EGFR es un anticuerpo o una molécula pequeña que se une a EGFR. En algunas realizaciones, el inhibidor de EGFR es un fármaco dirigido a EGFR. En una realización particular, un inhibidor de EGFR tiene una afinidad de unión (constante de disociación) por EGFR de aproximadamente 1.000 nM o menor. En otra realización, un inhibidor de EGFR tiene una afinidad de unión por EGFR de aproximadamente 100 nM o menor. En otra realización, un inhibidor de EGFR tiene una afinidad de unión por EGFR de aproximadamente 50 nM o menor. En una realización particular, un inhibidor de EGFR está unido por enlace covalente con EGFR. En una realización particular, un inhibidor de EGFR inhibe la señalización de EGFR con un valor CI50 de 1.000 nM o menor. En otra realización, un inhibidor de EGFR inhibe la señalización de EGFR con un valor CI50 de 500 nM o menor. En otra realización, un inhibidor de EGFR inhibe la señalización de EGFR con un valor CI50 de 50 nM o menor. En determinadas realizaciones, el antagonista de EGFR reduce o inhibe, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más, el nivel de expresión o actividad biológica de EGFR.

35 La “activación de EGFR” se refiere a activación, o fosforilación, de EGFR. En general, la activación de EGFR da como resultado la transducción de señal (por ejemplo, la causada por un dominio quinasa intracelular de los restos de tirosina que fosforilan el receptor EGFR en un EGFR o un polipéptido sustrato). La activación de EGFR puede estar mediada por la unión con el ligando EGFR a un dímero de EGFR que comprende EGFR. La unión de ligando EGFR con dímero EGFR puede activar un dominio quinasa de uno o más de los EGFR en el dímero y por lo tanto dar como resultado la fosforilación de los restos de tirosina en uno o más de los restos EGFR y/o fosforilación de restos de tirosina en un uno o más polipéptidos de sustrato adicionales.

45 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “fármaco dirigido a EGFR” se refiere a un agente terapéutico que se une a EGFR e inhibe su activación. Como ejemplos de dichos agentes se incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Como ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR se incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, la Patente de Estados Unidos N.º 4.943.533, Mendelsohn *et al*.) y sus variantes, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano rediseñado (H225) (véase, el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo dirigido a EGFR completamente humano (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (Patente de Estados Unidos N.º 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR como se describen la Patente de Estados Unidos N.º 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF (véase el documento WO98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto *et al*. Eur. J. Cancer 32A: 636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compite tanto con EGF como con 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 puede conjugarse con un agente citotóxico, generando por tanto un inmunoconjugado (véase, por ejemplo, el documento EP659.439A2, Merck Patent GmbH). Como ejemplos de moléculas pequeñas que se unen a EGFR se incluyen ZD1839 o Gefitinib (IRESSA; Astra Zeneca); CP-358774 o Erlotinib (TARCEVA™; Genentech/OSI); y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen); EMD-7200.

60 La técnica de la “reacción en cadena de la polimerasa” o “PCR” como se utiliza en la presente memoria se refiere en general a un procedimiento en el que se amplifican cantidades minúsculas de un segmento específico de ácido nucleico, ARN y/o ADN, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 4.683.195 presentada el 28 de julio de 1987. En general, la información de secuencia desde los extremos de la región de interés o más allá requiere estar disponible, de tal manera que puedan diseñarse cebadores oligonucleotídicos; estos cebadores serán idénticos o similares en secuencia a cadenas opuestas del molde a amplificar. Los nucleótidos terminales 5’ de los cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR puede utilizarse para amplificar secuencias

específicas de ARN, secuencias específicas de ADN a partir de ADN genómico total, y secuencias de ADNc transcritas a partir de ARN celular total, de bacteriófagos o de plásmidos, etc. Véase, en líneas generales, Mullis *et al.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989). Como se utiliza en la presente memoria, la PCR se considera que es un ejemplo, pero no el único, de un método de

- 5 reacción de polimerasa de ácido nucleico para amplificar una muestra de ensayo de ácido nucleico, que comprende el uso de un ácido nucleico conocido (ADN o ARN) como un cebador y utiliza una polimerasa de ácido nucleico para amplificar o generar un segmento específico de ácido nucleico, o amplificar o generar un segmento específico de ácido nucleico que es complementario a un ácido nucleico particular.
- 10 La “reacción en cadena de polimerasa en tiempo real cuantitativa” o “qRT-PCR” se refiere a una forma de PCR en la que la cantidad de producto de la PCR se mide en cada etapa en una reacción PCR. Esta técnica se ha descrito en diversas publicaciones, entre las que se incluyen, Cronin *et al.*, Am. J. Pathol. 164(1):35-42 (2004); y Ma *et al.*, Cancer Cell 5:607-616 (2004).
- 15 El término “micromatriz” se refiere a una disposición ordenada de elementos matriz que pueden hibridarse, preferentemente sondas polinucleotídicas, en un sustrato.

El término “polinucleótido”, cuando se utiliza en plural o singular, se refiere en general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por tanto, por

20 ejemplo, los polinucleótidos como se define en la presente memoria incluyen, sin limitación, ADN mono y bicatenario, ADN incluyendo regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario y ARN incluyendo regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más normalmente, bicatenarias o incluyen regiones mono o bicatenarias. Además, el término “polinucleótido”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como

25 ADN. En dichas regiones las cadenas pueden ser de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir todas las de una o más de las moléculas, pero más normalmente implican solo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región triple helicoidal a menudo es un oligonucleótido. El término “polinucleótido” incluye específicamente los ADNc. El término incluye los ADN (incluyendo los ADNc) y los ARN que contienen una o más bases modificadas. Por tanto, los ADN o ARN con estructuras modificadas, por razones de

30 estabilidad, u otras razones, son “polinucleótidos” tal como se entiende en la presente memoria. Por otro lado, los ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritriadas, se incluyen en el término “polinucleótidos”, tal como se define en la presente memoria. En general, el término “polinucleótido” incluye todas las formas química, enzimática y/o metabólicamente modificadas de polinucleótidos no modificados, así como las formas químicas de ARN y ADN características de virus y células, incluyendo células

35 simples y complejas.

El término “oligonucleótido” se refiere a un polinucleótido relativamente corto, incluyendo, sin limitación, desoxirribonucleótidos monocatenarios, ribonucleótidos mono o bicatenarios, híbridos de ARN:ADN y ADN bicatenarios. Los oligonucleótidos, tales como oligonucleótidos sonda de ADN monocatenario, a menudo se

40 sintetizan mediante métodos químicos, por ejemplo, utilizando sintetizadores de oligonucleótidos automatizados que están disponibles en el comercio. Sin embargo, los oligonucleótidos pueden crearse mediante diversos otros métodos, incluyendo técnicas mediadas por ADN recombinante *in vitro* y por expresión de los ADN en células y organismos.

45 Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Como ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelanina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una

50 camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®); acetilcamptotecina; escopolectina y 9-aminocampotecina); 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; espongiatrina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de

55 mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enedina (por ejemplo, calicamicina, especialmente calicamicina gamma11 y calicamicina omega1 (véase, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor oral de

60 alfa-4 integrina; dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enedina cromoproteína relacionados), 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 de liposomas de clorhidrato de

65

doxorubicina (DOXIL®), doxorubicina liposómica TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposómica pegilada (CAELYX®), y desoxidoxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), y 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, doxilfluridina, encitabina, floxuridina; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defosfamina; demecolcina; diaziquna; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido, nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; yonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK® polisacárido complejo (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas diseñadas genéticamente de paclitaxel albúmina (ABRAXANE™) y docetaxel (TAXOTERE®); clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vincas, que impiden la polimerización de tubulina a partir de la formación de microtúbulos, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®) y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, incluyendo bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (ARELIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo del nucleósido citosina 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor 1 de topoisomerasa (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosomas (por ejemplo PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersen sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR (véase definición más adelante); inhibidores de tirosina quinasa (véase definición más adelante); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinada con 5-FU y leucovorina.

En la presente memoria, como agentes quimioterapéuticos se incluyen "agentes antihormonales" o "agentes terapéuticos endocrinos" que actúan regulando, reduciendo, bloqueando o inhibiendo los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer. Pueden ser las propias hormonas, incluyendo, pero sin limitación: antiestrógenos con perfil agonista/antagonista mixto, incluyendo, tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, ceoxifeno y moduladores selectivos de receptores de estrógeno (SERM) tales como SERM3; antiestrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®) y EM800 (dichos agentes pueden bloquear la dimerización de receptores de estrógenos (RE), inhibir la unión al ADN, aumentar la renovación del RE y/o suprimir niveles de RE); inhibidores de aromatasa, incluyendo inhibidores esteroideos de aromatasa, tales como formestano y exemestano (AROMASIN®), e inhibidores no esteroideos de aromatasa tales como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de aromatasa incluyendo vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol y 4(5)-imidazoles; agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante, incluyendo leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, buserelina y triptorelina; esteroides sexuales incluyendo progestinas tales como acetato de megestrol y acetato medroxiprogesterona, estrógenos tales como dietilestilbestrol y premarina y andrógenos/retinoides tales como fluoximesterona, ácido todo transretinoico y fenretinida; onapristona; antiprogesteronas; reguladores negativos de receptores de estrógenos (RRE); anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

Como ejemplos específicos de agentes quimioterapéuticos o regímenes de quimioterapia en la presente memoria se incluyen: agentes alquilantes (por ejemplo, clorambucilo, bendamustina o ciclofosfamida); análogos de nucleósidos o antimetabolitos (por ejemplo fludarabina), fludarabina y ciclofosfamida (FC); prednisona o prednisolona; terapia de combinación que contiene aqulitor, incluyendo ciclofosfamida, vincristina, prednisolona (CHOP), o ciclofosfamida, vincristina, prednisolona (CVP), etc.

65

Un “público objetivo” es un grupo de personas o una institución a la cual, o a quien se promociona o intenta promocionar, un medicamento en particular, tal como comercializándolo o publicitándolo, especialmente para usos, tratamientos o indicaciones particulares, tales como pacientes individuales, poblaciones de pacientes, lectores de periódicos, bibliografía y revistas de medicina, telespectadores o internautas, personas que escuchan la radio o internet, médicos, compañías farmacológicas, etc.

Un “prospecto” se utiliza para hacer referencia a instrucciones normalmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las pautas, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, otros productos terapéuticos a combinar con el producto envasado y/o advertencias en lo que respecta al uso de dichos productos terapéuticos, etc.

El término “anticuerpo” se utiliza en la presente memoria en su más amplio sentido e incluye diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad de unión antigénica deseada.

Un “fragmento de anticuerpo” se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al cual se une el anticuerpo intacto. Como ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un anticuerpo “madurado por afinidad” se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR, *hipervariable regions*), en comparación con un anticuerpo parental que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejoría en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

Un “anticuerpo que se une al mismo epítipo” como un anticuerpo de referencia, se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia con su antígeno en un ensayo de competición al 50 % o más, y a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo con su antígeno en un ensayo de competición al 50 % o más.

La expresión anticuerpo “quimérico” se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera procede de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera procede de una fuente o especie diferente.

La “clase” de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena más pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y diversas de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente.

La expresión “agente citotóxico”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una sustancia que inhibe o impide una función celular y/o causa la muerte o destrucción celular. Como agentes citotóxicos se incluyen, pero sin limitación, isótopos radioactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> e isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorrubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas, de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos desvelados más adelante.

Las “funciones efectoras” se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo de anticuerpo. Como ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos se incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA); fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

La expresión “región Fc” en la presente memoria, se utiliza para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una parte de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no presente. A menos que se especifique de otra manera en la presente memoria, la numeración de los restos de aminoácidos en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración de EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Un “armazón” o “FR, por las siglas *framework*”, se refiere a restos de dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable generalmente consta de cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias de la HVR y las secuencias FR, generalmente aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Las expresiones “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo completo”, se utilizan en la presente memoria indistintamente para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a la de una estructura de anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en la presente memoria.

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o que procede una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos.

Un anticuerpo “humanizado” se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende restos de aminoácidos de HVR no humanas y restos de aminoácidos de FR humanos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, las CDR) se corresponden con las de un anticuerpo no humano, y todos o sustancialmente todos los FR se corresponden con los de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una parte de una región constante de anticuerpo procedente de un anticuerpo humano. Una “forma humanizada” de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

La expresión “región hipervariable” o “HVR”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos (“bucles hipervariables”). Generalmente, los anticuerpos nativos de cuatro cadenas comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Las HVR generalmente comprenden restos de aminoácidos desde los bucles hipervariables y/o desde las “regiones determinantes de complementariedad” (CDR), estando éstas últimas implicadas en el reconocimiento antigénico y/o siendo las de mayor variabilidad de secuencia. Aparecen bucles hipervariables a modo de ejemplo en los restos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3). (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Aparecen CDR a modo de ejemplo (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) en los restos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3. (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Exceptuando la CDR1 en VH, las CDR generalmente comprenden los restos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden “restos determinantes de especificidad” o “SDR”, que son restos que están en contacto con el antígeno. Los SDR están incluidos en regiones de las CDR denominadas abreviadas CDR, o a-CDR. Aparecen a-CDR a modo de ejemplo (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) en los restos de aminoácidos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3. (Véase Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13: 1619-1633 (2008)). A menos que se indique de otra manera, en la presente memoria, los restos de HVR y otros restos en el dominio variable (por ejemplo, restos FR) se numeran según Kabat *et al.*, citados anteriormente. En una realización, el anticuerpo c-met de la presente memoria comprende las HVR de las SEQ ID NO: 1-6.

Un “inmunoconjugado” es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, incluyendo, pero sin limitación, un agente citotóxico.

La expresión “anticuerpo monoclonal”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población que son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, contienen mutaciones de origen natural o surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando generalmente dichas variantes presentes en cantidades minoritarias. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un solo determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe considerarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente invención, pueden crearse mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, el método del hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación en fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todos los locus, o parte de los mismos, de la inmunoglobulina humana, describiéndose en la presente memoria dichos métodos y otros métodos a modo de ejemplo para crear anticuerpos monoclonales.

Un “anticuerpo no marcado (*naked*)” se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con una fracción heteróloga

(por ejemplo, una fracción citotóxica) o radiomarcador. El anticuerpo no marcado puede estar presente en una formulación farmacéutica.

5 Los “anticuerpos nativos” se refieren a moléculas de inmunoglobulina de origen natural de diversa estructura. Por ejemplo, anticuerpos IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestos por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por puentes disulfuro. Desde el extremo N al extremo C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De manera similar, desde el extremo N al extremo C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominada dominio ligero variable o dominio variable de cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL, *constant light*). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en función de la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

15 La expresión “formulación farmacéutica” se refiere a una preparación estéril que está en una forma tal que permite que la actividad biológica del medicamento sea eficaz y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para el sujeto a quien se va a administrar la formulación.

Una formulación “estéril” es aséptica o carece de cualquier microorganismo vivo y de sus esporas.

20 Un “kit” es cualquier fabricación (por ejemplo, un envase o recipiente) que comprende al menos un reactivo, por ejemplo, un medicamento para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, CPNM o cáncer de mama triple negativo), o un reactivo (por ejemplo, anticuerpo) para detectar específicamente una proteína o un gen biomarcador de la invención. La fabricación se promociona, distribuye y comercializa, preferentemente, como una unidad para llevar a cabo los métodos de la presente invención.

25 Un “transportador farmacéuticamente aceptable” se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un transportador farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, un excipiente, un estabilizador o un conservante.

30 La expresión “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia, se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje de identidad de secuencia máximo y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos, el alineamiento puede realizarse de las diversas maneras que se encuentran dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, utilizando un programa informático disponible al público tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquiera de los algoritmos necesarios para conseguir un alineamiento máximo sobre toda la longitud de las secuencias a comparar. Sin embargo, para los fines de la presente memoria, los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue autorizado por Genentech, Inc., y el código fuente se ha archivado con la documentación de usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde se registró con el N.º de registro Copyright TXU510087 de Estados Unidos. El programa ALIGN-2 está disponible al público en Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse del código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecieron mediante el programa ALIGN-2 y no varían.

50 En las situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para efectuar comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A determinada, con o contra una secuencia de aminoácidos B determinada (que como alternativa pueden expresarse como una secuencia de aminoácidos A determinada que tiene o que comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con, o contra una secuencia de aminoácidos B determinada) se calcula de la siguiente manera:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

55 siendo X el número de restos de aminoácidos marcado como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de ese programa de A y B, y siendo Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se indique específicamente de otra manera, todos los valores de % identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en la presente memoria se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

## II. Medicamentos para el cáncer

En un aspecto, la invención se refiere a la selección de pacientes que pueden tratarse con medicamentos para el cáncer en función de la expresión de uno o más de los biomarcadores desvelados en la presente memoria. Como ejemplos de medicamentos para el cáncer se incluyen, pero sin limitación:

- antagonistas de c-met, incluyendo anticuerpos anti-c-met.
- agentes quimioterapéuticos y regímenes de quimioterapia.
- otros medicamentos o combinaciones de los mismos en desarrollo, o aprobados, para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, CPNM.

En una realización, el medicamento es un anticuerpo, por ejemplo, dirigido contra c-met, o que se une a c-met. El anticuerpo de la presente memoria incluye: anticuerpos monoclonales, incluyendo anticuerpos quiméricos humanizados o humanos. En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un Fv, Fab, Fab', un anticuerpo con un brazo, scFv, un diacuerpo, o un fragmento F(ab')<sub>2</sub>. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 intacto u otra clase o isotipo de anticuerpo, como se define en la presente memoria. En una realización, el anticuerpo es monovalente. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo con un brazo (es decir, el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera forman un solo brazo de unión a antígeno) que comprende una región Fc, en el que la región Fc comprende un primer y un segundo polipéptido Fc, en el que el primer y segundo polipéptido Fc están presentes en un complejo y forman una región Fc que aumenta la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno. El anticuerpo de un brazo puede ser monovalente.

En una realización, el antagonista de c-met es un anticuerpo anti-c-met. En otra realización, el anticuerpo anti-c-met es MetMAb (onartuzumab) o una versión biosimilar del mismo. MetMAb se desvela, por ejemplo, en el documento WO2006/015371; Jin et al, Cancer Res (2008) 68: 4360. En otra realización, el anticuerpo anti-c-met comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una o más de (a) una HVR1 que comprende la secuencia GYTFTSYWLH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR2 que comprende la secuencia GMIDPSNSDTRFNPFKD (SEQ ID NO: 2); y/o (c) una HVR3-HC que comprende la secuencia ATYRSYVTPLDY (SEQ ID NO: 3). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una o más de (a) una HVR1-LC que comprende la secuencia KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID NO: 4); una HVR2-LC que comprende la secuencia WASTRES (SEQ ID NO: 5); y/o (c) una HVR3-LC que comprende la secuencia QQYYAYPWT (SEQ ID NO: 6). En algunas realizaciones el anticuerpo anti-c-met comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende (a) una HVR1 que comprende la secuencia GYTFTSYWLH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR2 que comprende la secuencia GMIDPSNSDTRFNPFKD (SEQ ID NO: 2); y (c) una HVR3-HC que comprende la secuencia ATYRSYVTPLDY (SEQ ID NO: 3) y un dominio variable de cadena ligera que comprende (a) una HVR1-LC que comprende la secuencia KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID NO: 4); una HVR2-LC que comprende la secuencia WASTRES (SEQ ID NO: 5); y (c) una HVR3-LC que comprende la secuencia QQYYAYPWT (SEQ ID NO: 6).

En cualquiera de las realizaciones anteriores, por ejemplo, un anticuerpo anti-c-met puede estar humanizado. En una realización, un anticuerpo anti-c-met comprende las HVR como en cualquiera de las realizaciones anteriores y comprende adicionalmente un armazón aceptor humano, por ejemplo, un armazón de inmunoglobulina humana o un armazón consenso humano.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-c-met comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En determinadas realizaciones, una secuencia VH que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-c-met que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a c-met humano. En determinadas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, alterado, insertado y/o delecionado en SEQ ID NO: 7. En determinadas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en los armazones, FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-c-met comprende la secuencia VH en SEQ ID NO: 7, incluyendo modificaciones postraduccionales de esa secuencia.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-c-met, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En determinadas realizaciones, una secuencia VL que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-c-met que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a c-met. En determinadas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se ha sustituido, alterado, insertado y/o delecionado en SEQ ID NO: 8. En determinadas realizaciones, las sustituciones, inserciones

o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en los armazones, FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-c-met comprende la secuencia VL en SEQ ID NO: 8, incluyendo modificaciones postraduccionales de esa secuencia.

5 En otra realización más, el anticuerpo anti-c-met comprende una región VL que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una región VH que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En otra realización adicional, el anticuerpo anti-c-met comprende una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1; una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2; una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3; una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4; una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5; y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6.

15 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-c-met, en el que el anticuerpo comprende una VH como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente, y una VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente.

20 En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-c-met proporcionado en la presente memoria. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo como o que puede estar inhibido competitivamente por un anticuerpo anti-c-met que comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 7 y una secuencia VL de SEQ ID NO: 8.

25 En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti-c-met de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo monovalente, quimérico, humanizado o humano. En una realización, un anticuerpo anti-c-met es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento con un brazo, Fv, Fab, Fab', scFv, un diacuerpo o un fragmento F(ab')<sub>2</sub>. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4 intacto u otra clase o isotipo de anticuerpo, como se define en la presente memoria. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende las HVR o comprende las regiones VH y VL descritas anteriormente.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-c-met es monovalente, y comprende (a) un primer polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNSDTRFNPNFKDRFTISADTSK NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:7), secuencia CH1 y un primer polipéptido Fc; (b) un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia:

40 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDF  
TLTISSLQPEDFATYYCQQYYAIPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 8), y la secuencia CL1; y (c) un tercer polipéptido que comprende un segundo polipéptido Fc, en el que el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera están presentes como un complejo y forman un solo brazo de unión a antígeno, en el que el primer y segundo polipéptido Fc están presentes en un complejo y forman una región Fc que aumenta la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el primer polipéptido comprende la secuencia Fc

CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  
DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:

9)

y el segundo polipéptido comprende la secuencia Fc

CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL  
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
 10).

En otras realizaciones, el anticuerpo anti-c-met es monovalente y comprende (a) un primer polipéptido que comprende una cadena pesada, comprendiendo dicho polipéptido la secuencia:

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNS  
 DTRFNPFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGT  
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF  
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC  
 PPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS  
 FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11); (b)

(b) un segundo polipéptido que comprende una cadena ligera, comprendiendo el polipéptido la secuencia

10 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWAST  
 RESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIKRTVAA  
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD  
 STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12); and

un tercer polipéptido que comprende una secuencia Fc, comprendiendo el polipéptido la secuencia

15 DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  
 TPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ  
 ID NO: 13),

20 en el que el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera están presentes como un complejo y forman un solo brazo de unión a antígeno, en el que el primer y segundo polipéptido Fc están presentes en un complejo y forman una región Fc que aumenta la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno.

25 Otros anticuerpos anti-c-met adecuados para su uso en los métodos de la invención se describen en la presente memoria y se conocen en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos anti-c-met desvelados en el documento WO05/016382 (incluyendo, pero sin limitación, los anticuerpos 13.3.2, 9.1.2, 8.70.2, 8.90.3); anticuerpos anti-c-met producidos por la línea celular de hibridoma depositada en la ICLC (*Interlab Cell Line Collection*) con el número PD 03001 en la CBA en Genoa, o que reconoce un epítipo en el dominio extracelular de la cadena  $\beta$  del receptor de HGF, y dicho epítipo es el mismo que reconoce el anticuerpo monoclonal); anticuerpos anti-c-met desvelados en el

documento WO2007/126799 (incluyendo, pero sin limitación, 04536, 05087, 05088, 05091, 05092, 04687, 05097, 05098, 05100, 05101, 04541, 05093, 05094, 04537, 05102, 05105, 04696, 04682); anticuerpos anti-c-met desvelados en el documento WO2009/007427 (incluyendo, pero sin limitación, un anticuerpo depositado en la CNCM, Instituto Pasteur, Paris, Francia, el 14 de marzo de 2007 con el número I-3731, el 14 de marzo de 2008 con el número I-3732, el 6 de julio de 2007 con el número I-3786, el 14 de marzo de 2007 con el número I-3724; un anticuerpo anti-c-met desvelado en el documento 20110129481; un anticuerpo anti-c-met desvelado en el documento US2011014176; un anticuerpo anti-c-met desvelado en el documento WO2009/134776; un anticuerpo anti-c-met desvelado en el documento WO2010/059654; un anticuerpo anti-c-met desvelado en el documento WO2011020925 (incluyendo, pero sin limitación, un anticuerpo secretado de un hibridoma depositado en la CNCM, Instituto Pasteur, Paris, Francia, el 12 de marzo de 2008 con el número I-3949 y el hibridoma depositado en 14 de enero de 2010 con el número I-4273).

En un aspecto, el anticuerpo anti-c-met comprende al menos una característica que promueve la heterodimerización, minimizando al mismo tiempo la homodimerización, de las secuencias Fc dentro del fragmento de anticuerpo. Dicha característica o características mejoran el rendimiento y/o la pureza y/o la homogeneidad de las poblaciones de inmunoglobulina. En una realización, el anticuerpo comprende mutaciones en Fc que constituyen "botones" y "ojales" como se describe en el documento WO2005/063816. Por ejemplo, una mutación de ojal puede ser una o más de T366A, L368A y/o Y407V en un polipéptido Fc y una mutación de hueco puede ser T366W.

En algunas realizaciones, el antagonista de c-met es un anticuerpo anti factor de crecimiento hepatocítico (HGF, *hepatocyte growth factor*), por ejemplo, el anticuerpo anti HGF humanizado TAK701, rilotumumab, Ficlatusumab, y/o el anticuerpo humanizado 2B8 descrito en el documento WO2007/143090. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti HGF es el anticuerpo anti HGF descrito en el documento US7718174B2.

En algunas realizaciones, el antagonista de c-met es un inhibidor de c-met de molécula pequeña. En algunas realizaciones, el inhibidor de c-met de molécula pequeña es un inhibidor selectivo de c-met de molécula pequeña.

En una realización, el antagonista de c-met se une al dominio extracelular de c-met. En algunas realizaciones, el antagonista de c-met se une al dominio de c-met quinasa. En algunas realizaciones, el antagonista de c-met compite por la unión con c-met con el factor de crecimiento hepatocítico (HGF). En algunas realizaciones, el antagonista de c-met se une a HGF. En algunas realizaciones, el antagonista de c-met inhibe la proliferación celular, por ejemplo, proliferación celular inducida por HGF de la línea celular EBC-1, H441 y/o KP4. En algunas realizaciones, la proliferación celular se inhibe con una Ki de 600 nM o menor (más fuerte), 500 nM o menor, 400 nM o menor, 300 nM o menor o más fuerte. En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met inhibe la señalización de c-met (por ejemplo, fosfo-c-met, fosfo-AKT, fosfo-MAPK) cuando las células EBC-1 se tratan con un antagonista de c-met en presencia de suero bovino fetal al 10 %. En algunas realizaciones, la señalización de c-met se inhibe con una Ki de 600 nM o menor (más fuerte), 500 nM o menor, 400 nM o menor, 300 nM o menor (más fuerte). En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met trata (puede tratar) un carcinoma de células escamosas. En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met trata (puede tratar) CPNM que expresa k-ras de tipo silvestre.

En determinadas realizaciones, el inhibidor de c-met no es una molécula pequeña competitiva no ATP. En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met inhibe la proliferación celular, por ejemplo, proliferación celular inducida por HGF de la línea celular EBC-1, H441 y/o KP4. En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met inhibe la señalización de c-met (por ejemplo, fosfo-c-met y rutas de señalización de c-met aguas abajo, por ejemplo, fosfo-AKT, fosfo-MAPK) cuando las células EBC-1 se tratan con un antagonista de c-met en presencia de suero bovino fetal al 10 %. En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met no inhibe la proliferación celular de las líneas celulares MDA-MB-231 y HT29 (en presencia o en ausencia de HGF exógeno). En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met no inhibe la proliferación celular de las líneas celulares MDA-MB-231 y HT29 en presencia de suero bovino fetal al 10 %. En la técnica se conocen bien métodos para evaluar la proliferación celular, y algunos de ellos se describen en los documentos WO2009/111691; WO2006/015371; y en Jin *et al*, Cancer Res (2008) 68: 4360. En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met trata (puede tratar) un carcinoma de células escamosas. En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met trata (puede tratar) CPNM que expresa k-ras de tipo silvestre. En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met no es Tivantinib (ARQ-197). En una realización particular, un antagonista de c-met inhibe la señalización de c-met con una CI50 de 1.000 nM o menor (es decir, más fuerte). En otra realización, un antagonista de c-met inhibe la señalización de c-met con una CI50 de 400 nm o menor, 500 nM o menor, 600 nm o menor, 700 nm o menor. En otra realización, un antagonista de c-met inhibe la señalización de c-met con una CI50 de 50 nM o menor. En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met no es crizotinib. En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met no es foretinib. En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met no es ficlatusumab.

En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met es uno cualquiera de: SGX-523, Crizotinib (PF-02341066; 3-[(1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etoxi]-5-(1-piperidin-4-ilpirazol-4-il)piridin-2-amina; CAS n.º 877399-52-5); JNJ-38877605 (CAS n.º 943540-75-8), BMS-698769, FA-665752 (Pfizer), SU5416, INC-280 (Incyte; SU11274 (Sugen; [(3Z)-N-(3-clorofenil)-3-((3,5-dimetil-4-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-1H-pirrol-2-il)metil)-N-metil-2-oxoindolin-5-sulfonamida; CAS n.º 658084-23-2]), Foretinib (GSK1363089), XL880 (CAS n.º 849217-64-7; XL880 es un inhibidor de met y VEGFR2 y KDR); MGCD-265 (Methylgene; MGCD-265 se dirige a c-MET, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3,

Ron y a receptores de Tie-2; CAS n.º 875337-44-3), Tivantinib (ARQ 197; (-)-(3R,4R)-3-(5,6-dihidro-4H-pirrolo[3,2,1-il]quinolin-1-il)-4-(1H-indol-3-il)pirrolidin-2,5-diona; véase Munci *et al*, Mol Cancer Ter 9 de junio 2010; 1544; CAS n.º 905854-02-6), LY-2801653 (Lilly), LY2875358 (Lilly), MP-470, Rilotumumab (AMG 102, anticuerpo monoclonal anti-HGF), anticuerpo 223C4 o anticuerpo 223C4 humanizado (documento WO2009/007427), L2G7 humanizado (TAK701 humanizado; anticuerpo monoclonal anti HGF humanizado); EMD 1214063 (Merck Sorono), EMD 1204831 (Merck Serono), NK4, Carbozantinib (XL-184, CAS n.º 849217-68-1; carbozantinib es un inhibidor dual de met y VEGFR2), MP-470 (SuperGen; es un nuevo inhibidor de c-KIT, MET, PDGFR, Flt3 y AXL), Comp-1, Ficlaturumab (AV-299; anticuerpo monoclonal anti HGF), E7050 (Cas n.º 1196681-49-8; E7050 es un inhibidor dual de c-met y VEGFR2 (Esai); MK-2461 (Merck; N-((2R)-1,4-dioxan-2-ilmetil)-N-metil-N'-[3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-5-oxo-5H-benzo[4,5]ciclohepta[1,2-b]piridin-7-il]sulfamida; CAS n.º 917879-39-1); MK8066 (Merck), PF4217903 (Pfizer), AMG208 (Amgen), SGX-126, RP1040, LY2801653, AMG458, EMD637830, BAY-853474, DP-3590. En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met es uno cualquiera o más de crizotinib, tivantinib, carbozantinib, MGCD-265, ficlatuzumab, TAK-701 humanizado, rilotumumab, foretinib, h224G11, DN-30, MK-2461, E7050, MK-8033, PF-4217903, AMG208, JNJ-38877605, EMD1204831, INC-280, LY-2801653, SGX-126, RP1040, LY2801653, BAY-853474 y/o LA480. En determinadas realizaciones, el antagonista de c-met es uno cualquiera o más de crizotinib, tivantinib, carbozantinib, MGCD-265, ficlatuzumab, TAK-701 humanizado, rilotumumab y/o foretinib.

Los antagonistas de EGFR incluyen anticuerpos, tal como el anticuerpo monoclonal humanizado conocido como nimotuzumab (YM Biosciences), ABX-EGF completamente humano (panitumumab, Abgenix Inc.) así como cualquiera de los anticuerpos completamente humanos conocidos como E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6. 3 y E7.6. 3 y descritos en el documento US 6.235.883; MDX-447 (Medarex Inc). Pertuzumab (2C4) es un anticuerpo humanizado que se une directamente a HER2 pero que interfiere con la dimerización de HER2-EGFR, inhibiendo por tanto la señalización de EGFR. Otros ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, la Patente de Estados Unidos N.º 4.943. 533, Mendelsohn *et al.*) y sus variantes, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano rediseñado (H225) (véase el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo completamente humano dirigido a EGFR (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (Patente de Estados Unidos N.º 5.212.290); anticuerpos quiméricos y humanizados que se unen a EGFR como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF (véase el documento WO98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto *et al.* Eur. J. Cancer 32A: 636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compite tanto con EGF como con 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 puede conjugarse con un agente citotóxico, generando de este modo un inmunoc conjugado (véase, por ejemplo, el documento EP659.439A2, Merck Patent GmbH).

Los anticuerpos anti EGFR que son útiles en los métodos de la invención, incluyen cualquier anticuerpo que se una con suficiente afinidad y especificidad a EGFR y que pueda reducir o inhibir la actividad de EGFR. El anticuerpo seleccionado tendrá normalmente una afinidad de unión suficientemente fuerte por EGFR, por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a c-met humano con un valor Kd de entre 100 nM y 1 pM. Las afinidades de los anticuerpos pueden determinarse mediante un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (tal como el ensayo BIAcore como se describe en la Publicación de Solicitud PCT N.º WO2005/012359); un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); y ensayos de competición (por ejemplo RIA), por ejemplo. Preferentemente, el anticuerpo anti EGFR de la invención puede utilizarse como un agente terapéutico en el direccionamiento e interferencia con enfermedades o afecciones en las que está implicada la actividad de EGFR/ligando de EGFR. Además, el anticuerpo puede someterse a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como un agente terapéutico. Dichos ensayos se conocen en la técnica y dependen del antígeno diana y del uso al cual está destinado para el anticuerpo.

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a EGFR y a c-met. En otro ejemplo, un anticuerpo biespecífico a modo de ejemplo puede unirse a dos epítopos diferentes de la misma proteína, por ejemplo, la proteína c-met. Como alternativa, un brazo de c-met o de EGFR puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para focalizar mecanismos de defensa celulares contra las células que expresan c-met o EGFR. Los anticuerpos biespecíficos también pueden utilizarse para localizar agentes citotóxicos en células que expresan EGFR o c-met. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a EGFR o a c-met y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o un hapteno de isótopo radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>). En una realización, el anticuerpo biespecífico es cualquiera de los anticuerpos MET-EGFR biespecíficos desvelados en el documento US20100254989A.

Los antagonistas de EGFR también incluyen moléculas pequeñas, tales como los compuestos descritos en los documentos US5616582, US5457105, US5475001, US5654307, US5679683, US6084095, US6265410,

US6455534, US6521620, US6596726, US6713484, US5770599, US6140332, US5866572, US6399602, US6344459, US6602863, US6391874, WO9814451, WO9850038, WO9909016, WO9924037, WO9935146, WO0132651 US6344455, US5760041, US6002008, US5747498. Como antagonistas particulares de EGFR de molécula pequeña se incluyen OSI-774 (CP-358774, erlotinib, OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-, diclorhidrato, Pfizer Inc.); Iressa® (ZD1839, gefitinib, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenilamino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-N2-(1-metil-piperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidin-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletil)amino]-1H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletil)amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butanamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida); lapatinib (Tykerb, GlaxoSmithKline); ZD6474 (Zactima, AstraZeneca); CUDC-101 (Curis); canertinib (CI-1033); AEE788 (6-[4-[(4-etil-1-piperazinil)metil]fenil]-N-[(1R)-1-feniletil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina, documento WO2003013541, Novartis) y PKI166 4-[4-[(1R)-1-feniletil]amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol, documento WO9702266 Novartis).

En una realización, el anticuerpo, por ejemplo, el anticuerpo utilizado en los métodos de la presente memoria, pueden incorporar cualquiera de las características, independientemente o en combinación, como se describe en las siguientes Secciones 1-6:

## 1. Fragmentos de anticuerpo

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, y scFv, un anticuerpo con un brazo, y otros fragmentos descritos más adelante. Para una revisión sobre determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* Nat. Med. 9: 129-134 (2003). Para una revisión sobre fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), págs. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las Patentes de Estados Unidos 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> que comprenden restos de epítopo de unión al receptor de recuperación y que tienen semivida *in vivo* aumentada, véase la Patente de Estados Unidos N.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, los documentos EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, Nat. Med. 9: 129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. UTILIZA 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y los tetracuerpos también se describen en Hudson *et al.*, Nat. Med. 9: 129-134 (2003).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden toda o una parte del dominio variable de cadena pesada o toda o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo humano de un solo dominio (Domantins, Inc., Waltham, MA; Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 6.248.516 B1).

Los anticuerpos con un brazo (es decir, el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera forman un solo brazo de unión a antígeno) se desvelan, por ejemplo, en el documento WO2005/063816; Martens *et al.*, Clin Cancer Res (2006), 12: 6144. Para el tratamiento de afecciones patológicas que requieren una función antagonista, y en el que la bivalencia de un anticuerpo produce un efecto agonista no deseable, el rasgo monovalente de un anticuerpo con un brazo (es decir, un anticuerpo que comprende un solo brazo de unión a antígeno) produce y/o garantiza una función antagonista después de la unión del anticuerpo con una molécula diana. Además, el anticuerpo de un brazo que comprende una región Fc, se caracteriza por atributos farmacocinéticos superiores (tal como una semivida potenciada y/o una tasa de eliminación reducida *in vivo*) en comparación con las formas Fab que tienen características de unión a antígeno similares/sustancialmente idénticas, haciendo que esto sea un inconveniente importante en el uso de anticuerpos Fab monovalentes convencionales. Las técnicas para fabricar anticuerpos con un brazo incluyen, pero sin limitación, modificación por ingeniería genética de "botón en ojal" (*knob in hole*) (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.731.168). MetMAB es un ejemplo de un anticuerpo con un brazo. [¿se añaden otros formatos monovalentes de un brazo? ¿Genmab?]

Los fragmentos de anticuerpo también pueden fabricarse mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como la producción por células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en la presente memoria.

## 2. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria es un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567; y en Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. UTILIZA, 81:6851-6855 (1984)), se describen determinados anticuerpos quiméricos. En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable procedente de un ratón, una rata, un hámster, un conejo o un primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo,

un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de “clase invertida” en el que la clase o subclase del anticuerpo parental se ha cambiado. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

5 En determinadas realizaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en seres humanos, conservando al mismo tiempo la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano parental. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o partes de las mismas) proceden de un anticuerpo no humano y los FR (o partes de los mismos) proceden de secuencias de anticuerpos humanos. Opcionalmente un anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una parte de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos restos FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen por restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del cual proceden los restos de la HVR), por ejemplo para reestablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

15 Se revisan anticuerpos humanizados y métodos para prepararlos, por ejemplo, en Almagro y Franson, *Frost. Biosci.* 13: 1619-1633 (2008), y también se describen, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. UTILIZA* 86: 10029-10033 (1989); Patentes de Estados Unidos N.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (que describen injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28: 489-498 (1991) (que describen el “acondicionamiento de la superficie”, “*resurfacing*”); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36: 43-60 (2005) (que describen el “intercambio de FR”, “*shuffling*”); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36: 61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83: 252-260 (2000) (que describen la estrategia de “selección guiada” para el intercambio de FR).

25 Las regiones armazón (*framework*) humanas que pueden utilizarse para la humanización incluyen, pero sin limitación: regiones armazón seleccionadas utilizando el método de “mejor ajuste” (véase, por ejemplo, Sims *et al.* *J. Immunol.* 151: 2296 (1993)); regiones armazón procedentes de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. UTILIZA*, 89: 4285 (1992); y Presta *et al.* *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)); regiones armazón maduras humanas (somáticamente mutadas) o regiones armazón de la línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones armazón procedentes de bibliotecas de exploración de FR (véase, por ejemplo, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684 (1997) y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 22611-22618 (1996)).

### 3. Anticuerpos humanos

35 En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse utilizando diversas técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) y en Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20: 450-459 (2008).

40 Los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición antigénica. Dichos animales contienen normalmente toda o una parte de los locus de inmunoglobulina humana, que reemplazan los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes extracromosómicamente o integrados al azar en los cromosomas de los animales. En dichos ratones transgénicos, generalmente el locus de inmunoglobulina endógena se ha inactivado. Para una revisión sobre métodos para la obtención de anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23: 1117-1125 (2005). Véanse también, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de Estados Unidos n.º 5.770.429 que describe la tecnología HUMAB®; la patente de Estados Unidos n.º 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de los anticuerpos intactos generadas por dichos animales pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, combinándose con una región constante humana diferente.

55 Los anticuerpos humanos también pueden fabricarse mediante métodos basados en hibridoma. Para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromioma humano y de ratón. (Véase, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Los anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridoma con linfocitos B humanos también se describen en Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. UTILIZA*, 103: 3557-3562 (2006). Otros métodos incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4): 265-268 (2006) (que describen hibridomas de humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3): 927-937 (2005) y en Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3): 185-91 (2005).

65

También pueden generarse anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación en fagos procedentes de ser humano. Dichas secuencias de dominio variable pueden después combinarse con un dominio constante humano deseado. Más adelante se describen técnicas de selección de anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de anticuerpos.

5

#### 4. Anticuerpos procedentes de bibliotecas

Los anticuerpos de la invención pueden aislarse explorando bibliotecas combinatorias para anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, en la técnica se conocen diversos métodos para la generación de bibliotecas de presentación en fagos y exploración de dichas bibliotecas para anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos métodos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y adicionalmente se describen, por ejemplo, en McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248: 161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. UTILIZA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

10

15

20

25

30

En determinados métodos de presentación en fagos, los repertorios de genes VH y VL se clonan por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan al azar en fagotecas, que después se exploran para fagos de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Normalmente los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o como fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan al inmunógeno anticuerpos de alta afinidad sin tener que construir hibridomas. Como alternativa, el repertorio virgen puede clonarse (por ejemplo, de ser humano) para proporcionar una sola fuente de anticuerpos a una amplia serie de no autoantígenos y también de autoantígenos sin ninguna inmunización como describen Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Por último, también pueden crearse bibliotecas vírgenes clonando sintéticamente segmentos de genes V no reordenados de células madre y utilizando cebadores de PCR que contienen secuencias al azar para codificar las regiones CDR3 altamente variables y obtener la reordenación *in vitro*, como describen Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen fagotecas de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de Estados Unidos n.º 5.750.373 y publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

35

En la presente memoria, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de bibliotecas de anticuerpos humanos, se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos.

#### 5. Anticuerpos multiespecíficos

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinadas realizaciones, una de las especificidades de unión es por c-met y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de c-met. Los anticuerpos biespecíficos también pueden utilizarse para localizar agentes citotóxicos contra células que expresan c-met. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpo.

40

45

Las técnicas para la fabricación de anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero sin limitación, coexpresión recombinante de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983), documento WO 93/08829 y Trauneker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), y modificación por ingeniería genética de "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también pueden generarse modificando por ingeniería genética efectos de conducción electrostática para crear moléculas heterodiméricas de anticuerpo Fc (documento WO 2009/089004A1); por entrecruzamiento de dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.676.980 y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)); utilizando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); utilizando la tecnología de "diacuerpo" para la fabricación de fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. UTILIZA*, 90: 6444-6448 (1993)); y utilizando dímeros de Fv monocatenario (sFv) (véase, por ejemplo Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

50

55

60

En la presente memoria también se incluyen anticuerpos modificados por ingeniería genética con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos Octopus" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

65

El anticuerpo o fragmento de la presente memoria también incluye un "Fab de acción doble" o "FAD", que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a c-met así como a otro antígeno diferente, tal como EGFR (véase, por ejemplo, el documento US 2008/0069820).

## 5 **6. Variantes de anticuerpo**

En determinadas realizaciones, se contemplan variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica al anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones, y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución puede realizarse para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

En determinadas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las HVR y los FR. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y explorarse los productos para una actividad deseada, por ejemplo, unión antigénica conservada/mejorada, inmunogenicidad disminuida o CCDA o CDC mejoradas.

Un tipo de variante sustitucional implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para un estudio posterior tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, aumento de afinidad, reducción de inmunogenicidad) con respecto al anticuerpo parental y/o tendrán determinadas propiedades biológicas sustancialmente conservadas del anticuerpo parental. Una variante sustitucional a modo de ejemplo es un anticuerpo madurado por afinidad, que puede generarse convenientemente, por ejemplo, utilizando técnicas de maduración por afinidad basadas en presentación en fagos tales como las descritas en la presente memoria. En resumen, uno o más restos de HVR se mutan y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se exploran con respecto a una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminal cuya longitud varía de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos sencillos o múltiples. Como ejemplos de inserciones terminales se incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión, en el extremo N o C del anticuerpo, con una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria se altera para aumentar o disminuir el grado al cual se glucosila el anticuerpo. La adición o deleción de sitios de glucosilación en un anticuerpo pueden realizarse convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que se creen o retiren uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el hidrato de carbono unido a la misma puede alterarse. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero comprenden normalmente un oligosacárido ramificado, biantenarico que está generalmente unido por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* TIBTECH 15: 26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos hidratos de carbono, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, en un anticuerpo de la invención pueden realizarse modificaciones del oligosacárido para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En una realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de hidrato de carbono que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser del 1 % al 80 %, del 1 % al 65 %, del 5 % al 65 % o del 20 % al 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas híbridas y con alto contenido de manosa) medida por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/077546.. Asn297 se refiere al resto de asparagina localizado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración Eu de restos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede localizarse aproximadamente  $\pm 3$  aminoácidos aguas arriba o aguas abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia minoritarias en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función de CCDA mejorada. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosiladas" o "con deficiencia de fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US

2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al.* J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Como ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados se incluyen células Lec13 CHO deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); solicitud de patente de Estados Unidos n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente el Ejemplo 11), y líneas celulares inactivadas (*knockout*), tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO inactivadas (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al.* Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 94(4): 680-688 (2006) y el documento WO2003/085107).

Las variantes de anticuerpo se proporcionan adicionalmente con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en los que el oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo se bisecta con GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener fucosilación reducida y/o función de CCDA mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); en la patente de Estados Unidos n.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y en el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

En determinadas realizaciones, en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente memoria pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En determinadas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, aunque no todas, las funciones efectoras, lo que hacen que sea un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante a pesar de que determinadas funciones efectoras (tales como CDC y CCDA) son innecesarias o perjudiciales.

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de restos 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 en la región Fc (patente de Estados Unidos n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc denominado "DANA", con sustitución de los restos 265 y 297 en alanina (patente de Estados Unidos n.º 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a FcR (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312 y Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).)

En determinadas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácido que mejoran la CCDA, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de restos).

En algunas realizaciones, se realizan alteraciones en la región Fc que dan como resultado una unión a C1q alterada (es decir mejorada o disminuida) y/o una citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.194.551, en el documento WO 99/51642 y en Idusogie *et al.* J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

En el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*), se describen anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24: 249 (1994)). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en su interior que mejoran la unión de la región Fc con FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los restos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, Ila sustitución del resto 434 de la región Fc (patente de Estados Unidos n.º 7.371.826).

Véase también Duncan y Winter, Nature 322: 738-40 (1988); la patente de Estados Unidos n.º 5.648.260; la patente de Estados Unidos n.º 5.624.821; y el documento WO 94/29351 en lo que respecta a otros ejemplos de variantes de región Fc.

En determinadas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos con cisteínas modificados por ingeniería genética, por ejemplo, "tioMAbs", en los que uno o más restos de un anticuerpo se sustituyen por restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo aquellos restos con cisteína, los grupos tiol reactivos se colocan de este modo en sitios accesibles del anticuerpo y

pueden utilizarse para conjugar el anticuerpo con otros residuos, tales como residuos farmacológicos o residuos enlazador-fármaco, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en la presente memoria. En determinadas realizaciones, cualquiera de uno o más de los siguientes restos puede sustituirse con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración de EU) de la cadena pesada y S400 (numeración de EU) de la región Fc de cadena pesada. Pueden generarse anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 7.521.541.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria puede modificarse adicionalmente para que contenga residuos no proteicos adicionales que son conocidos en la técnica y se dispone de ellos con facilidad. Los residuos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero sin limitación, polímeros solubles en agua. Como ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua se incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros al azar) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de prolipropilen óxido/etilen óxido, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, estos pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización puede determinarse basándose en aspectos que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, de si el derivado de anticuerpo se utilizará en una terapia en condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y fracciones no proteicas que pueden calentarse selectivamente por exposición a radiación. En una realización, la fracción no proteica es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. UTILIZA 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero sin limitación, longitudes de onda que no perjudiquen a las células normales, pero que calienten las fracciones no proteicas a una temperatura a la cual se destruyan las células cercanas a la fracción no proteica del anticuerpo.

En una realización, el medicamento es un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo (tal como un anticuerpo c-met) conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes quimioterapéuticos o fármacos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas de proteínas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas), o isótopos radiactivos.

En una realización, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo y fármaco (CAF) en el que un anticuerpo se conjuga con uno o más fármacos, incluyendo, pero sin limitación, un maitansinoide (véanse las patentes de Estados Unidos n.º 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina, tal como fracciones de fármaco monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véanse las patentes de Estados Unidos n.º 5.635.483 y 5.780.588, y 7.498.298); una dolastatina; una calicamicina o un derivado de la misma (véanse las patentes de Estados Unidos n.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296; Hinman *et al.*, Cancer Res. 53: 3336-3342 (1993); y Lode *et al.*, Cancer Res. 58: 2925-2928 (1998)); una antraciclina, tal como daunomicina o doxorubicina (véase Kratz *et al.*, Current Med. Chem. 13: 477-523 (2006); Jeffrey *et al.*, Bioorganic & Med. Chem. Letters 16: 358-362 (2006); Torgov *et al.*, Bioconj. Chem. 16: 717-721 (2005); Nagy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. UTILIZA 97: 829-834 (2000); Dubowchik *et al.*, Bioorg. & Med. Chem. Letters 12: 1529-1532 (2002); King *et al.*, J. Med. Chem. 45: 4336-4343 (2002); y la patente de Estados Unidos n.º 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano, tal como, docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno y CC1065.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo, como se describe en la presente memoria, conjugado con una toxina enzimáticamente activa o con un fragmento de la misma, incluyendo, pero sin limitación, la cadena A de la toxina diftérica, fragmentos activos de no unión de la toxina diftérica, la cadena A exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de dianthin, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo, como se describe en la presente memoria, conjugado con un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Se dispone de diversos isótopos radiactivos para la producción de radioconjugados. Como ejemplos se incluyen At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se utiliza para la detección, este puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, tc99m o I123, o un marcador en spin para la formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, IMR), tales como, de nuevo yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico pueden prepararse utilizando varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como as N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexan-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazono (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de un agente quelante para la conjugación de radionucleótidos con anticuerpos. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse un enlazador ácido lábil, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador dimetilo o un enlazador que contenga disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Res. 52: 127-131 (1992); patente de Estados Unidos n.º 5.208.020).

Los inmunconjugados o CAF de la presente memoria, contemplan expresamente, pero sin limitación, dichos conjugados preparados con reactivos reticulantes que incluyen, pero sin limitación, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se encuentran disponibles en el comercio (por ejemplo, en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

### III. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

En un aspecto, la invención proporciona métodos para identificar a un paciente con cáncer que sea susceptible de responder al tratamiento con un antagonista de c-met, que comprende la etapa de determinar si el cáncer del paciente tiene una alta cantidad de biomarcador c-met, en el que la expresión del biomarcador c-met indica que el paciente es susceptible a responder al tratamiento con el antagonista de c-met.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para determinar el pronóstico de un paciente con cáncer, que comprende la etapa de determinar si el cáncer del paciente tiene una alta cantidad de biomarcador c-met, en el que la expresión del biomarcador c-met indica que el paciente es susceptible a aumentar la supervivencia global (SG) y/o la supervivencia sin progresión (SSP) cuando el paciente es tratado con un antagonista de c-met.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para determinar la expresión del biomarcador c-met, que comprende la etapa de determinar si un cáncer de un paciente tiene una alta cantidad de biomarcador c-met, en el que la expresión del biomarcador c-met es la expresión de proteínas y se determina en una muestra del paciente utilizando IHQ, en el que una expresión alta del biomarcador c-met es el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción de c-met moderada, una intensidad de tinción de c-met moderada/alta combinada o una intensidad de tinción de c-met alta, en el que la expresión de c-met se detecta utilizando un anticuerpo c-met, en el que la expresión del biomarcador c-met indica que el paciente es susceptible a aumentar la SG y/o la SSP cuando el paciente es tratado con un antagonista de c-met.

En un aspecto, la invención de la presente memoria se refiere a un método para seleccionar una terapia para un paciente con cáncer (por ejemplo, CPNM), que comprende determinar la expresión de un biomarcador c-met en una muestra del paciente, y seleccionar un medicamento para el cáncer basándose en el nivel de expresión del biomarcador. En una realización, un nivel alto del biomarcador, o biomarcadores, dará como resultado la selección de un antagonista de c-met, tal como un anticuerpo c-met para su uso en el tratamiento del paciente. En otra realización, en la que el biomarcador, o biomarcadores, están presentes a un nivel bajo (es decir, un nivel bajo o sustancialmente indetectable), se seleccionará al paciente para el tratamiento con un medicamento para el cáncer distinto de un antagonista de c-met. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de cáncer del paciente (por ejemplo, CPNM).

En un aspecto, la invención proporciona un método de optimización de la eficacia terapéutica, que comprende determinar la expresión del biomarcador c-met en una muestra de cáncer de un paciente. En algunas realizaciones, la detección de biomarcador c-met alto significa una SSP y/o SG aumentada cuando el paciente es tratado con un antagonista de c-met. En algunas realizaciones, la detección de biomarcador c-met bajo significa una SSP y/o SG disminuida cuando el paciente es tratado con el antagonista de c-met. En algunas realizaciones, el cáncer es CPNM.

En un aspecto, la invención proporciona un método para determinar el pronóstico de un paciente, que comprende determinar el nivel del biomarcador c-met en una muestra de cáncer del paciente. En algunas realizaciones, biomarcador c-met alto significa una probabilidad de SSP y/o SG disminuida en comparación con un paciente cuyo cáncer tiene un nivel de biomarcador c-met bajo. En algunas realizaciones, una expresión alta de biomarcador c-met significa una SSP y/o SG aumentada cuando el paciente es tratado con el antagonista de c-met. En algunas realizaciones, una expresión baja del biomarcador c-met significa una SSP y/o SG disminuida cuando el paciente es tratado con el antagonista de c-met. En algunas realizaciones, el cáncer es CPNM, y expresión alta de biomarcador c-met significa SSP y/o SG aumentada cuando el paciente es tratado con un antagonista de c-met en combinación con un antagonista de EGFR. En algunas realizaciones, el cáncer es CPNM, y una expresión baja de biomarcador c-

met significa una SSP y/o SG disminuida cuando el paciente es tratado con un antagonista de c-met en combinación con un antagonista de EGFR.

5 En un aspecto, la cantidad de biomarcador c-met se determina utilizando un método que comprende: (a) realizar análisis IHQ de una muestra (tal como de una muestra de cáncer de paciente) con un anticuerpo anti-c-met; y b) determinar la expresión de un biomarcador c-met en la muestra. En algunas realizaciones, la intensidad de tinción IHQ de c-met se determina con respecto a un valor de referencia. En algunas realizaciones, la expresión del biomarcador c-met se determina utilizando un esquema de puntuación de la intensidad de tinción de c-met como se desvela en la presente memoria, por ejemplo, en la Tabla A en la Sección III.7 más adelante. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente clasificar a los pacientes basándose en una puntuación IHQ.

15 En un aspecto, la cantidad de expresión de biomarcador c-met se determina utilizando un método que comprende la etapa de determinar la expresión de biomarcador c-met en la muestra (tal como una muestra de cáncer del paciente), en el que la muestra del paciente ha sido sometida a análisis IHQ utilizando un anticuerpo anti-c-met. En algunas realizaciones, la intensidad de tinción IHQ de c-met se determina con respecto a un valor de referencia. En algunas realizaciones, la expresión de biomarcador c-met se determina utilizando un esquema de puntuación de intensidad de tinción c-met desvelado en la presente memoria, por ejemplo, en la Tabla A en la Sección III.7 más adelante.

20 En algunas realizaciones, los análisis de IHQ comprenden adicionalmente tinción morfológica, antes o después de los mismos. En una realización, se utiliza hematoxilina para la tinción de núcleos celulares de los portaobjetos. La hematoxilina está ampliamente extendida. Un ejemplo de hematoxilina adecuada es la hematoxilina II (Ventana). Cuando se desean núcleos de color azul más claro, puede utilizarse un reactivo añil después de la tinción con hematoxilina.

25 En la presente memoria se desvela la detección de biomarcador c-met utilizando IHQ y también se desvela un esquema de puntuación de intensidad de tinción de c-met, por ejemplo, en la Tabla A, en la Sección III.7 más adelante. Como se indica en la presente memoria, pueden detectarse otros biomarcadores. En la presente memoria se desvelan otros ejemplos de biomarcadores. En algunas realizaciones de cualquiera de las invenciones desveladas en la presente memoria, una expresión de biomarcador c-met alta es un estado clínico de diagnóstico met positivo, como se define según la Tabla A de la presente memoria. En algunas realizaciones de cualquiera de las invenciones desveladas en la presente memoria, una expresión de biomarcador c-met alta es un estado clínico de diagnóstico met negativo, como se define según la Tabla A de la presente memoria.

35 En un aspecto, la cantidad de biomarcador c-met se determina utilizando un método que comprende: (a) realizar perfil de expresión génica, PCR (tal como rtPCR), RNA-seq, análisis de micromatriz, SAGE, técnica MassARRAY o FISH en una muestra (tal como una muestra de cáncer del paciente) con un anticuerpo anti-c-met; y b) determinar la expresión de un biomarcador c-met en la muestra. Como se indica en la presente memoria, pueden detectarse otros biomarcadores. En la presente memoria se desvelan otros ejemplos de biomarcadores.

40 Se analiza una muestra del paciente para detectar la expresión de uno o más de los biomarcadores de la presente memoria. La fuente de la muestra tisular o celular puede ser tejido sólido tal como una muestra, una biopsia o aspirado, de tejido u órgano reciente, congelado y/o conservado; sangres o cualquiera de los constituyentes de la sangre; líquidos corporales tales como líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células de cualquier tiempo en gestación o desarrollo del sujeto. La muestra tisular puede contener compuestos que no estén entremezclados naturalmente con el tejido en la naturaleza, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijantes, nutrientes, antibióticos o similares. Los ejemplos de muestras de tumores de la presente memoria incluyen, pero sin limitación, biopsias tumorales, células tumorales, suero o plasma, proteínas plasmáticas en circulación, líquido ascítico, cultivos de células primarias o de líneas celulares procedentes de tumores o que presentan propiedades similares a un tumor, así como muestras de tumor conservadas, tales como muestras de tumor fijadas en formalina, incluidas en parafina o muestras de tumor congeladas. En una realización, la muestra del paciente es una muestra de tumor fijada en formalina e incluida en parafina (FFIP) (por ejemplo, una muestra de tumor de CPNM o una muestra de tumor de cáncer de mama). La muestra puede obtenerse antes de que el paciente sea tratado con un medicamento para el cáncer (tal como un antagonista anti-c-met). La muestra puede obtenerse de un tumor primario o de un tumor metastásico. La muestra puede obtenerse la primera vez que se diagnostica el cáncer o, por ejemplo, después de que el tumor haya metastatizado. En algunas realizaciones, la muestra de tumor es de pulmón, ganglio linfático, riñón o cerebro.

60 Varios métodos para determinar la expresión de ARNm, proteína, o amplificación génica, incluyen, pero sin limitación, perfil de expresión génica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluyendo PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), RNA-Seq, FISH, análisis de micromatriz, análisis en serie de expresión génica (SAGE), MassARRAY, proteómica, inmunohistoquímica (IHQ), etc. En algunas realizaciones, se cuantifica la expresión proteica. Dichos análisis de proteínas pueden realizarse utilizando IHQ, por ejemplo, en muestras tumorales del paciente.

65

Ahora se describirán con más detalle diversos ejemplos de métodos para la determinación de la expresión del biomarcador.

### 1. Perfil de expresión génica

5 En general, los métodos de perfil de expresión génica pueden dividirse en dos grandes grupos: métodos basados en análisis de hibridación de polinucleótidos y métodos basados en secuenciación de polinucleótidos. Los métodos más habitualmente utilizados, conocidos en la técnica para la cuantificación de la expresión del ARNm en una muestra, incluyen transferencia northern e hibridación *in situ* (Parker y Barnes, *Methods in Molecular Biology* 106: 247-283 (1999)); ensayos de protección RNAsa (Hod, *Biotechniques* 13: 852- 854 (1992)); y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Weis *et al.*, *Trends in Genetics* 8: 263-264 (1992)). Como alternativa, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN, o dúplex de ADN-proteína. Como métodos representativos de análisis de expresión génica basados en secuenciación, se incluyen el análisis en serie de expresión génica (SAGE, *serial analysis of gene expression*) y el análisis de expresión génica por secuenciación de firma masivamente paralela (MPSS, *massively parallel signature sequencing*).

### 2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

20 De las técnicas indicadas anteriormente, un método cuantitativo sensible y flexible es la PCR, que puede utilizarse para comparar niveles de ARNm en poblaciones de muestras diferentes, en tejidos normales y tumorales, con o sin tratamiento con fármacos, para caracterizar patrones de expresión génica, para discriminar entre ARNm íntimamente relacionados y para analizar la estructura del ARN.

25 La primera etapa es el aislamiento de ARNm de una muestra diana. En material de partida es normalmente ARN total aislado de tumores humanos o de líneas celulares tumorales y que corresponden a tejidos o a líneas celulares normales, respectivamente. Por tanto, el ARN puede aislarse de varios tumores primarios, incluyendo mama, pulmón, colon, próstata, cerebro, hígado, riñón, páncreas, bazo, timo, testículo, ovario, útero, etc., de tumores o de líneas celulares tumorales, con ADN agrupado de donantes sanos. Si la fuente de ARNm es un tumor primario, el ARNm puede extraerse, por ejemplo, de muestras de tejido fijadas (por ejemplo, fijadas en formalina) e incluidas en parafina, congeladas o conservadas en archivos. En la técnica se conocen bien métodos generales para la extracción de ARNm y se desvelan en libros de texto de biología molecular convencionales, incluyendo Ausubel *et al.*, *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997). Se desvelan métodos de extracción de ARN de tejidos incluidos en parafina, por ejemplo, en Rupp y Locker, *Lab Invest.* 56: A67 (1987) y en De Andrés *et al.*, *BioTechniques* 18: 42044 (1995). En particular, el aislamiento de ARN puede realizarse utilizando un kit de purificación, ajustando un tampón y proteasas de fabricantes comerciales, tales como Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, puede aislarse ARN total de células en cultivo utilizando minicolumnas de Qiagen RNeasy. Otros kits de aislamiento de ARN disponibles en el comercio incluyen el kit de purificación de ADN y ARN completo de MASTERPURE® (EPICENTRE®, Madison, Wis.) y el kit de aislamiento de ARN en bloques de parafina (Ambion, Inc.). Puede aislarse ARN total de muestras tisulares utilizando RNA Stat-60 (Tel-Test). El ARN preparado de tumor puede aislarse, por ejemplo, por centrifugación en gradiente de densidad con cloruro de cesio.

45 Como el ARN no puede servir como un molde para la PCR, la primera etapa en el perfil de expresión génica mediante PCR es la transcripción inversa del molde de ARN en ADNc, seguido de su amplificación exponencial en una reacción PCR. Las dos transcriptasas inversas más habitualmente empleadas son la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). La etapa de transcripción inversa se inicia normalmente utilizando cebadores específicos, hexámeros al azar o cebadores oligo-dT, dependiendo de las circunstancias y del objeto del perfil de expresión. Por ejemplo, el ARN extraído puede retro transcribirse utilizando un kit de PCR para ARN de GENEAMP™ (Perkin Elmer, Calif., UTILIZA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después, el ADNc derivado puede utilizarse como un molde en la reacción PCR posterior. Aunque la etapa de la PCR puede utilizar diversas ADN polimerasas dependientes de ADN termoestable, normalmente emplea la ADN polimerasa de Taq (*Termus aquaticus*), que tiene actividad nucleasa 5'-3' pero carece de actividad endonucleasa de corrección de errores 3'-5'. Por tanto, la PCR TAQMAN® normalmente utiliza la actividad nucleasa 5' de la polimerasa de Taq o de Tth (*Termus thermophilus*), para hidrolizar una sonda de hibridación unida a su amplicón diana, aunque puede utilizarse cualquier enzima con actividad nucleasa 5' equivalente. Para generar un amplicón típico de una reacción PCR se utilizan dos cebadores oligonucleotídicos. Para detectar secuencias de nucleótidos localizadas entre los dos cebadores de la PCR se diseña un tercer oligonucleótido, o sonda. La sonda no es extensible con la enzima ADN polimerasa de Taq, y está marcada con un colorante fluorescente indicador y un colorante fluorescente desactivador. Cualquier emisión inducida por láser del colorante indicador es desactivada por el colorante desactivador cuando los dos colorantes se sitúan muy cerca entre sí, ya que están en la sonda. Durante la reacción de amplificación, la enzima ADN polimerasa de Taq escinde la sonda de una manera dependiente de molde. Los fragmentos de sonda resultantes se disocian en solución y la señal del colorante indicador liberado se libera del efecto desactivador del segundo fluoróforo. Una molécula del colorante indicador se libera por cada nueva molécula sintetizada y la detección del colorante indicador no desactivado proporciona la base para una interpretación cuantitativa de los datos.

Puede realizarse PCR TAQMAN® utilizando equipos disponibles en el comercio, tales como, por ejemplo, ABI PRISM 7700® Sequence Detection System® (Perkin- Elmer-Applied Biosystems, Foster City, Calif., UTILIZA), o Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). En una realización preferida, el procedimiento con nucleasa 5' se realiza en un dispositivo de PCR cuantitativa en tiempo real, tal como el sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7700®. El sistema consiste en un termociclador, un láser, un dispositivo acoplado a carga (CCD), una cámara y un ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida con láser se recoge en tiempo real a través de cables de fibra óptica para los 96 pocillos y se detecta en el CCD. El sistema incluye un programa informático para poner en marcha el instrumento y para analizar los datos.

Los datos del ensayo con nucleasa 5' se expresan inicialmente como Ct, o ciclo umbral (*threshold*). Como se indicó anteriormente, los valores de fluorescencia se registran durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado hasta ese punto en la reacción de amplificación. El punto cuando la señal fluorescente se registra primero como estadísticamente significativo es el ciclo umbral (Ct).

Para minimizar errores y el efecto de variación entre muestras, la PCR normalmente se realiza utilizando un patrón interno. El patrón interno ideal se expresa a un nivel constante entre los diferentes tejidos, y no se ve afectado por el tratamiento experimental. Los ARN más frecuentemente utilizados para normalizar patrones de expresión génica son los ARNm de los genes constitutivos (*housekeeping*) gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y P-actina.

Una variación más reciente de la técnica PCR es la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), que mide la acumulación de productos PCR a través de una sonda fluorogénica doblemente marcada (es decir, una sonda TAQMAN®). La PCR en tiempo real es compatible tanto con la PCR competitiva cuantitativa, en la que para la normalización se utiliza un competidor interno para cada secuencia diana, como con la PCR comparativa cuantitativa que utiliza un gen de normalización contenido en la muestra, o un gen constitutivo para PCR. Para detalles adicionales véase, por ejemplo Held *et al.*, Genome Research 6: 986-994 (1996).

Las etapas de un protocolo representativo para el perfil de expresión génica utilizando tejidos fijados, incluidos en parafina, como la fuente de ARN, incluyendo aislamiento, purificación, extensión con cebador y amplificación de ARNm, se ofrecen en diversos artículos de revistas publicadas (por ejemplo: Godfrey *et al.*, J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 (2000); Specht *et al.*, Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001)). En resumen, un proceso representativo comienza cortando secciones de aproximadamente 10 microgramos de espesor de muestras tisulares tumorales incluidas en parafina. Después, el ARN se extrae, y se retira la proteína y el ADN. Después del análisis de la concentración de ARN, pueden incluirse etapas de reparación y/o amplificación de ARN, si fuera necesario, y el ARN se retro transcribe utilizando promotores específicos de genes seguido de PCR.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, los cebadores y las sondas de PCR se diseñan basándose en secuencias intrónicas presentes en el gen a amplificar. En esta realización, la primera etapa en el diseño del cebador/sonda es la delineación de secuencias intrónicas dentro de los genes. Esto puede realizarse mediante programas informáticos disponible al público, tales como el programa informático DNA BLAT desarrollado por Kent, W., Genome Res. 12(4): 656-64 (2002) o por el programa informático BLAST incluyendo sus variaciones. Las etapas posteriores siguen métodos bien establecidos de diseño de cebadores y sondas de PCR.

Para evitar señales inespecíficas es importante ocultar secuencias repetitivas dentro de los intrones cuando se diseñan los cebadores y las sondas. Esto puede realizarse fácilmente utilizando el programa Repeat Masker (ocultador de repeticiones) disponible en línea a través del Baylor College of Medicine, que explora secuencias de ADN frente a una biblioteca de elementos repetitivos y devuelve una secuencia de consulta (*query*) en la los elementos repetitivos están ocultos. Las secuencias intrónicas ocultas pueden utilizarse después para diseñar secuencias de cebadores y sondas utilizando cualquiera de los paquetes de diseño de cebadores/sondas disponibles o, de otra manera, disponibles al público, tal como Primer Express (Applied Biosystems); ensayo por diseño MGB (Applied Biosystems); Primer3 (Rozen y Skaletsky (2000) Primer3 en la WWW para usuarios generales y programadores biólogos. En: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, N.J., páginas 365-386).

Los factores que se tienen en cuenta en el diseño de cebadores de PCR, incluyen la longitud del cebador, la temperatura de fusión (Tf) y el contenido de G/C, la especificidad, las secuencias de cebadores complementarias y la secuencias del extremo 3'. En general, los cebadores de PCR óptimos tienen generalmente una longitud de 17-30 bases, y contienen aproximadamente un 20-80 %, tal como, por ejemplo, aproximadamente un 50-60 % de bases de G+C. Normalmente se prefieren Tf entre 50 y 80 °C, por ejemplo, aproximadamente de 50 a 70 °C.

Para orientaciones adicionales sobre el diseño de sondas y cebadores de PCR véase, por ejemplo, Dieffenbach *et al.*, "General Concepts for PCR Primer Design" en: PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1995, páginas 133-155; Innis y Gelfand, "Optimization of PCRs" en: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, CRC Press, Londres, 1994, páginas 5-11 y Plasterer, T. N. Primerselect: Primer and probe design. Methods Mol. Biol. 70: 520527 (1997), cuya total divulgación se incorpora expresamente por referencia en la presente memoria.

### 3. RNA-Seq

La RNA-Seq, también denominada Secuenciación Aleatoria del Transcriptoma Completo (WTSS, *Whole Transcriptome Shotgun Sequencing*) se refiere al uso de tecnologías de secuenciación a alto rendimiento para secuenciar ADNc para obtener información sobre el contenido de ARN en la muestra. Las publicaciones que describen la RNA-Seq incluyen: Wang *et al.* "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics" *Nature Reviews Genetics* 10 (1): 57-63 (enero 2009); Ryan *et al.* *BioTechniques* 45 (1): 81-94 (2008); y Maher *et al.* "Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer". *Nature* 458 (7234): 97-101 (enero 2009).

### 4. Micromatrices

La expresión génica diferencial también puede identificarse, o confirmarse, utilizando la técnica de micromatriz. Por tanto, el perfil de expresión de genes asociados a cáncer de mama puede medirse en tejido de tumor reciente o incluido en parafina, utilizando tecnología de micromatriz. En este método, secuencias polinucleotídicas de interés (incluyendo los ADNc y oligonucleótidos) se siembran, o se organizan, en un sustrato microplaca. Las secuencias organizadas se hibridan después con sondas de ADN específicas a partir de células o tejidos de interés. Al igual que en el método de PCR, la fuente de ARNm es normalmente ARN total aislado de tumores humanos o de líneas celulares tumorales, y corresponde a líneas celulares o tejidos normales. Por tanto, el ARN puede aislarse de diversos tumores primarios o de líneas celulares tumorales. Si la fuente de ARNm es un tumor primario, el ARNm puede extraerse, por ejemplo, de muestras de tejido fijadas (por ejemplo, fijadas en formalina) e incluidas en parafina, congeladas o conservadas en archivos, que se preparan y conservan habitualmente en la práctica clínica cotidiana.

En una realización específica de la técnica de micromatriz, se aplican insertos amplificados por PCR de clones ADNc a un sustrato en una matriz densa. Preferentemente, se aplican al menos 10.000 secuencias de nucleótidos al sustrato. Los genes ordenados en la matriz, inmovilizados en la microplaca a 10.000 elementos cada uno, son adecuados para hibridación en condiciones rigurosas. Pueden generarse sondas de ADNc marcadas con fluorescencia incorporando nucleótidos fluorescentes mediante transcripción inversa de ARN extraído de tejidos de interés. Las sondas de ADNc marcadas aplicadas a la microplaca hibridan con especificidad con cada mancha de ADN sobre la matriz. Después de un lavado riguroso para retirar las sondas no específicamente unidas, la microplaca se escanea mediante microscopía láser confocal o mediante otro método de detección, tal como una cámara CCD. La cuantificación de la hibridación de cada elemento ordenado permite evaluar la abundancia de ARNm correspondiente. Con fluorescencia de doble color, sondas de ADNc marcadas por separado, generadas a partir de dos fuentes de ARN, se hibridan en grupos de dos con la matriz. Por tanto, la abundancia relativa de los transcritos de las dos fuentes correspondientes a cada gen especificado se determina simultáneamente. La escala miniaturizada de la hibridación permite realizar una evaluación conveniente y rápida del patrón de expresión de una gran cantidad de genes. Se ha observado que dichos métodos tienen la sensibilidad necesaria para detectar transcritos poco habituales, que se expresan a escasas copias por célula y para detectar de manera reproducible al menos aproximadamente diferencias dobles en los niveles de expresión (Schena *et al.*, *Proc. Acad. Sci. EE.UU.* 93 (2): 106-149 (1996)). Los análisis de micromatriz pueden realizarse con equipos disponibles al público, siguiendo protocolos del fabricante, tal como utilizando la tecnología Affymetrix GENCHIP™ o la tecnología de micromatriz Incyte.

El desarrollo de métodos de micromatriz para el análisis de expresión génica a gran escala hace posible investigar sistemáticamente marcadores moleculares de clasificación de cáncer y predecir resultados en diversos tipos de tumores.

### 5. Análisis en serie de expresión génica (SAGE)

El análisis en serie de expresión génica (SAGE) es un método que permite el análisis simultáneo y cuantitativo de una gran cantidad de transcritos génicos, sin tener que proporcionar una sonda de hibridación individual para cada transcrito. En primer lugar, se genera una etiqueta de secuencia corta (de aproximadamente 10-14 pb) que contiene información suficiente para identificar únicamente un transcrito, siempre que la etiqueta se obtenga de una sola posición dentro de cada transcrito. Después, muchos transcritos se unen entre sí para formar moléculas largas en serie, que pueden secuenciarse, revelando la identidad de las etiquetas múltiples simultáneamente. El patrón de expresión de cualquier población de transcritos puede evaluarse cuantitativamente determinando la abundancia de etiquetas individuales, e identificando el gen correspondiente a cada etiqueta. Para más detalles, véase, por ejemplo Velculescu *et al.*, *Science* 270: 484-487 (1995); y Velculescu *et al.*, *Cell* 88: 243-51 (1997).

### 6. Tecnología MassARRAY

La tecnología MassARRAY (Sequenom, San Diego, Calif.) es un método automatizado de análisis de expresión génica a alto rendimiento que utiliza espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*) para la detección. De acuerdo con este método, después del aislamiento del ARN, de la transcripción inversa y de la amplificación por PCR, los ADNc se someten a extensión con cebador. Los productos de extensión con cebador derivados de ADNc se purifican, y se distribuyen en una microplaca que se carga previamente con los componentes necesarios para la

preparación de muestras MALTI-TOF MS. Los diversos ADNc presentes en la reacción se cuantifican analizando las áreas pico en el espectro de masas obtenido.

### 7. Inmunohistoquímica

5 Los métodos inmunohistoquímicos ("IHQ") son también adecuados para detectar los niveles de expresión de los biomarcadores de la presente invención. Se ha observado que la tinción inmunohistoquímica de secciones tisulares es un método fiable para evaluar o detectar la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas inmunohistoquímicas utilizan un anticuerpo para explorar y visualizar antígenos celulares *in situ*, generalmente por métodos cromogénicos o fluorescentes. Por tanto, para detectar la expresión, se utilizan anticuerpos o antisueros, preferentemente antisueros policlonales, y más preferentemente, anticuerpos monoclonales específicos para cada marcador. Como se indica con mayor detalle más adelante, los anticuerpos pueden detectarse por marcaje directo de los propios anticuerpos, por ejemplo, con marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores hapteno, tal como biotina, o una enzima tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Como alternativa, se utiliza un anticuerpo primario no marcado junto con un anticuerpo secundario marcado, que comprende antisueros, antisueros policlonales, o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario. Los protocolos y kits de inmunohistoquímica son muy conocidos en la materia y se encuentran disponibles en el comercio.

20 Se dispone de dos métodos generales de IHQ; ensayos directos e indirectos. De acuerdo con el primer ensayo, la unión del anticuerpo con el antígeno diana se determina directamente. Este ensayo directo utiliza un reactivo marcado, tal como una etiqueta fluorescente, o un anticuerpo primario marcado con enzima, que puede visualizarse sin requerir una interacción de anticuerpo adicional. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario no conjugado se une al antígeno y después un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo secundario se conjuga con un marcador enzimático, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar la visualización del antígeno. La amplificación de la señal se produce porque varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítomos en el anticuerpo primario.

25 El anticuerpo primario y/o secundario utilizado para inmunohistoquímica normalmente se marcará con una fracción detectable. Se dispone de numerosos marcadores que generalmente pueden agruparse en las siguientes categorías:

30 (a) Radioisótopos, tales como  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  y  $^{131}\text{I}$ . El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo utilizando, por ejemplo, las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2, Coligen *et al.*, Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, N. Y., Pubs. (1991), y la radioactividad puede medirse utilizando recuento por centelleo.

(b) Partículas de oro coloidal.

40 (c) Marcadores fluorescentes incluyendo, pero sin limitación, quelante de tierras raras (quelantes de europio), Rojo Texas, rodamina, fluoresceína, dansilo, lisamina, umbeliferona, ficoeritrina, ficocianina o fluoróforos disponibles en el comercio, tales como SPECTRUM ORANGE® y SPECTRUM GREEN® y/o derivados de uno cualquiera o más de los anteriores. Los marcadores fluorescentes pueden conjugarse con el anticuerpo utilizando las técnicas desveladas, por ejemplo, en *Current Protocols in Immunology*, citado anteriormente. La fluorescencia puede medirse utilizando un fluorímetro.

45 (d) Diversos marcadores de sustrato enzimático disponibles y la Patente de Estados Unidos n.º 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de estos. La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse utilizando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente. Como alternativa, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Anteriormente se describen técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia. El sustrato quimioluminiscente comienza a excitarse electrónicamente mediante una reacción química y después puede emitir luz que puede medirse (utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo), o dona energía a un aceptor fluorescente. Como ejemplos de marcadores enzimáticos se incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de Estados Unidos n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidrotalazinodionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasas, galactosa oxidasas y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasas), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. En O'Sullivan *et al.* *Methods for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.* (ed J. Langone y H. Van Vunakis), Academic press, Nueva York, 73: 147-166 (1981) se describen técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos

60 Como ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato se incluyen, por ejemplo:

(i) Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como un sustrato, en el que la hidrógeno peroxidasa oxidada un colorante precursor [por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB)]. También puede utilizarse 3,3-diaminobencidina (DAB) para visualizar el anticuerpo marcado con HRP;

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico; y

(iii)  $\beta$ -D-galactosidasa ( $\beta$ -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosidasa) o un sustrato fluorogénico (por ejemplo, 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosidasa).

5 Los expertos en la técnica disponen de numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato. Para una revisión general de estas, véanse las Patentes de Estados Unidos 4.275.149 y 4.318.980.

10 Algunas veces, el marcador se conjuga indirectamente con el anticuerpo. El experto en la técnica conocerá diversas técnicas para realizar esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina o cualquiera de las cuatro amplias categorías de marcadores mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina o viceversa. La biotina se une selectivamente a la avidina y por tanto, el marcador puede conjugarse con el anticuerpo en esta manera indirecta. Como alternativa, para realizar la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti hapteno. Por tanto, puede realizarse la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo.

15 Además de los procedimientos de preparación de muestras indicados anteriormente, puede desearse un tratamiento adicional de la sección tisular antes, durante o después de la IHQ. Por ejemplo, pueden realizarse métodos de recuperación de epítomos, tales como calentamiento de la muestra tisular en tampón citrato [véase, por ejemplo, Leong *et al.* Appl. Immunohistoquímica. 4 (3): 201 (1996)].

20 Después de una etapa de bloqueo opcional, la sección tisular se expone a un anticuerpo primario durante un periodo de tiempo suficiente y en condiciones adecuadas de tal manera que el anticuerpo primario se une al antígeno de proteína diana en la muestra tisular. Las condiciones apropiadas para conseguir esto pueden determinarse por experimentación habitual.

25 El grado de unión del anticuerpo con la muestra se determina utilizando uno cualquiera de los marcadores detectables comentados anteriormente. Preferentemente, el marcador es un marcador enzimático (por ejemplo HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico tal como el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina. Preferentemente el marcador enzimático se conjuga con un anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de conejo y anticuerpo secundario es anticuerpo anti conejo de cabra).

35 Los especímenes así preparados pueden montarse y cubrirse con un cubreobjetos. La evaluación del portaobjetos se determina después utilizando, por ejemplo, un microscopio.

40 La IHQ puede combinarse con tinción morfológica, antes o después de la misma. Después de la desparafinización, las secciones montadas en portaobjetos pueden teñirse con una tinción morfológica para su evaluación. La tinción morfológica a utilizar proporciona una evaluación morfológica precisa de una sección tisular. La sección puede teñirse con uno o más colorantes cada uno de los cuales tiñe de forma distinta diferentes componentes celulares. En una realización, se utiliza hematoxilina para teñir los núcleos celulares de los portaobjetos. El uso de la hematoxilina está muy generalizado. Un ejemplo de una hematoxilina adecuada es la Hematoxilina II (Ventana). Cuando se desean núcleos de color azul más claro, puede utilizarse un reactivo añil después de la tinción con hematoxilina. Un experto en la técnica apreciará que la tinción puede optimizarse para un tejido determinado aumentando o disminuyendo la duración de tiempo en la que los portaobjetos permanecen en el colorante.

45 En el comercio existen sistemas automatizados para la preparación y procesamiento IHQ de portaobjetos. El sistema Ventana® Bench-Mark XT es un ejemplo de dicho sistema automatizado.

50 Después de la tinción, la sección tisular puede analizarse mediante técnicas de microscopía convencionales. Generalmente, un patólogo o especialista similar, evalúa el tejido para detectar la presencia de células anómalas o normales o un tipo de células específico y proporciona los locus de los tipos de células de interés. Por tanto, por ejemplo, un patólogo o especialista similar revisará los portaobjetos e identificará células normales (tal como células pulmonares normales) y células anómalas (tal como células pulmonares anómalas o neoplásicas). Puede utilizarse cualquier medio de definición de locus de las células de interés (por ejemplo, coordenadas en un eje X-Y).

55 Los anticuerpos anti-c-met adecuados para su uso en IHQ son muy conocidos en la técnica e incluyen SP-44 (Ventana), DL-21 (Upstate), ab27492 (Abcam), PA1-37483 (Pierce Antibodies). Un experto habitual en la técnica entiende que pueden identificarse y caracterizarse anticuerpos anti-c-met adicionales adecuados, comparando con anticuerpos c-met utilizando, por ejemplo, el protocolo IHQ desvelado en la presente memoria.

60 Como controles para análisis IHQ así como controles de puntuación, pueden utilizarse gránulos de células de control con diversas intensidades de tinción. Por ejemplo, H441 (intensidad de tinción de c-met fuerte); A549 (intensidad de tinción de c-met moderada); H1703 (intensidad de tinción de c-met débil), HEK-293 (293) (intensidad de tinción de c-met débil) y TOV-112D (intensidad de tinción de c-met negativa) o H1155 (intensidad de tinción de c-met negativa).  
65 En algunas realizaciones, las Figuras 1 y/o 2 de la presente memoria pueden hacer referencia a dos ejemplos de intensidades de puntuación IHQ de c-met. En algunas realizaciones, la Figura 1 representa una intensidad de

puntuación IHQ de c-met de 0, 1+, 2+ y 3+, por ejemplo, según el esquema de puntuación de la Tabla A que se indica a continuación. En algunas realizaciones, la Figura 2 representa una puntuación IHQ de c-met a modo de ejemplo de 0, 1, 2 y 3, por ejemplo, según el esquema de puntuación de la Tabla A que se indica a continuación.

- 5 El protocolo de inmunohistoquímica de c-met y el esquema de puntuación se ilustra en la presente memoria. Los criterios de intensidad de tinción de c-met pueden evaluarse de acuerdo con la Tabla A:

**Tabla A**

Puntuación IHQ	Criterios de tinción
0	muestras con tinción negativa o ambigua, o < del 50 % de las células tumorales con tinción débil (1+) o débil (1+) y moderada (2+) combinada
1	el 50 % o más de las células tumorales con tinción débil (1+) o débil (1+) y moderada (2+) combinada, pero menos del 50 % de las células tumorales con tinción moderada (2+) o moderada (2+) y fuerte (3+) combinada
2	el 50 % o más células tumorales con tinción moderada (2+) o moderada (2+) y fuerte (3+) combinada, pero menos del 50 % de las células tumorales con tinción fuerte (3+)
3	el 50 % o más de las células tumorales con tinción fuerte (3+)

- 10 En algunas realizaciones, las categorías clínicas “diagnóstico Met positivo” y “diagnóstico Met negativo” se definen de la siguiente manera:

- 15 diagnóstico Met positivo: puntuación IHQ de 2 o 3 (como se define en la Tabla A), y  
diagnóstico Met negativo: puntuación IHQ de 0 o 1 (como se define en la Tabla A).

- 20 En algunas realizaciones, biomarcador c-met alto asociado es una puntuación IHQ de 2, una puntuación IHQ de 3 o una puntuación IHQ de 2 o 3. En algunas realizaciones, biomarcador c-met alto es el 50 % o más de las células tumorales con intensidad de tinción de c-met moderada, intensidad de tinción de c-met moderada/alta combinada o intensidad de tinción de c-met alta. En algunas realizaciones, biomarcador c-met alto es el 50 % o más de las células tumorales con intensidad de tinción de c-met moderada o alta. En algunas realizaciones, al menos el 50 de las células tumorales se analizan en una muestra. En algunas realizaciones, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60 o 70 o más células tumorales se analizan en una muestra. En algunas realizaciones, una expresión de biomarcador c-met alta es un diagnóstico met positivo (estado clínico de diagnóstico met positivo) tal como se define según la Tabla A de la presente memoria.

- 30 En algunas realizaciones, biomarcador c-met bajo es una puntuación IHQ de 0, una puntuación IHQ de 1 o una puntuación IHQ de 0 o 1. En algunas realizaciones, biomarcador c-met bajo es tinción de c-met negativa, menos del 50 % de las células tumorales con intensidad de tinción débil o débil y moderada combinada, o el 50 % o más de las células tumorales con intensidad de tinción de c-met débil o débil y moderada combinada pero menos del 50 % de las células tumorales con intensidad de tinción moderada o moderada y fuerte combinada. En algunas realizaciones, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60 o 70 o más células tumorales se analizan en una muestra. En algunas realizaciones, una expresión de biomarcador c-met baja es un diagnóstico met negativo (estado clínico de diagnóstico met negativo) tal como se define según la Tabla A de la presente memoria.

**8. Proteómica**

- 40 El término “proteoma” se define como la totalidad de las proteínas presentes en una muestra (por ejemplo, un tejido, un organismo o un cultivo celular) en momento determinado. La proteómica incluye, entre otras cosas, el estudio de los cambios globales de la expresión de proteínas en una muestra (también denominado “expresión proteómica”). La proteómica normalmente incluye las siguientes etapas: (1) separación de proteínas individuales en una muestra por electroforesis en gel 2-D (PAGE 2-D); (2) identificación de las proteínas individuales recuperadas del gel, por ejemplo, mediante espectrometría de masas o secuenciación N terminal y (3) análisis de los datos utilizando bioinformática. Los métodos proteómicos son complementos valiosos a otros métodos de perfil de expresión génica y pueden utilizarse, en solitario o en combinación, con otros métodos, para detectar los productos de los marcadores pronóstico de la presente invención.

**9. Amplificación de genes**

- 50 La detección de la amplificación del gen *c-met* se realiza utilizando diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede utilizarse hibridación genómica comparativa para producir un mapa del número de copias de secuencias de ADN en función de la localización cromosómica. Véase, por ejemplo, Kallioniemi *et al.* (1992) Science 258: 818-821. La amplificación del gen *c-met* también puede detectarse, por ejemplo, mediante

hibridación de Southern, utilizando una sonda específica para el gen *c-met* o mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

5 En determinadas realizaciones, la detección de la amplificación del gen *c-met* se realiza evaluando directamente el número de copias del gen *c-met*, utilizando, por ejemplo, una sonda que se hibrida con el gen *c-met*. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo FISH. En determinadas realizaciones, la detección de la amplificación del gen *c-met* se realiza evaluando indirectamente el número de copias del gen *c-met*, por ejemplo, evaluando el número de copias de una región cromosómica que se encuentra fuera del gen *c-met* pero que se amplifica conjuntamente con el gen *c-met*. La expresión del biomarcador también puede evaluarse utilizando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo, administrando una molécula (tal como un anticuerpo) que se une a la molécula a detectar y que está marcada con un marcador detectable (por ejemplo, un isótopo radiactivo) y escaneando externamente al paciente para la localización del marcador.

#### 15 **IV. Usos médicos de antagonistas de c-met y otros medicamentos para el cáncer en métodos terapéuticos**

En un aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento de un paciente con cáncer, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de c-met si se ha encontrado que el paciente tiene una cantidad alta (elevada) de biomarcador c-met.

20 La invención también se refiere a un método para el tratamiento de un paciente con CPNM que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de c-met (por ejemplo, un anticuerpo anti-c-met, por ejemplo MetMab), si se ha encontrado que el paciente tiene una alta cantidad de biomarcador c-met (por ejemplo, si el cáncer del paciente expresa una alta cantidad de biomarcador c-met, por ejemplo, determinada utilizando IHQ). En algunas realizaciones, el CPNM es carcinoma de células escamosas. En algunas realizaciones, el CPNM es adenocarcinoma. En algunas realizaciones, el CPNM es CPNM de segunda línea o de tercera línea, localmente avanzado o metastásico. En algunas realizaciones, el CPNM es CPNM localmente avanzado o metastásico después de fracasar al menos un régimen de quimioterapia previo. En la presente memoria se analizan e ilustran métodos para determinar la expresión de c-met utilizando IHQ. En algunas realizaciones, se ha observado que el cáncer del paciente expresa alta cantidad de c-met con una puntuación IHQ de 2, una puntuación IHQ de 3 o una puntuación IHQ de al menos 2 (2 o 3). En algunas realizaciones, se ha observado que el cáncer del paciente (una muestra del cáncer del paciente) contiene 50 % o más células tumorales con intensidad de tinción de c-met moderada, intensidad de tinción de c-met moderada/alta combinada o intensidad de tinción de c-met alta. En algunas realizaciones, una alta cantidad de biomarcador c-met es el 50 % o más de las células tumorales con intensidad de tinción de c-met moderada o alta. En algunas realizaciones, los criterios desvelados en la presente memoria se utilizan para puntuar el estado del biomarcador c-met como alto o bajo.

Además, la invención proporciona un método para el tratamiento de un paciente con CPNM que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de un antagonista de c-met (tal como un anticuerpo anti c-met, tal como MetMab) y un antagonista de EGRF (tal como erlotinib), si se ha encontrado que el paciente tiene una alta cantidad de biomarcador c-met. El paciente tratado en la presente memoria se beneficiará deseablemente de (o será más susceptible a presentar) una mayor supervivencia sin progresión (SSP) y supervivencia global (SG) en relación con un paciente que tiene la cantidad reducida de biomarcador c-met. En la presente memoria se describen ejemplos de antagonistas de EGFR. En algunas realizaciones, el CPNM es CPNM localmente avanzado o metastásico después de que fracasar al menos un régimen de quimioterapia previo.

Adicionalmente, la invención se refiere a un método para el tratamiento de un paciente con cáncer (tal como CPNM) que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento para el cáncer distinto de un antagonista de c-met si se ha encontrado que el paciente tiene una cantidad reducida de biomarcador c-met (por ejemplo, si el cáncer del paciente expresa el biomarcador c-met reducido, por ejemplo, como se determina por IHQ). En algunas realizaciones, el cáncer del paciente no expresa de manera detectable c-met o expresa c-met con una puntuación IHQ de 0, con una puntuación IHQ de 1 o con una puntuación de IHQ de 0 o 1. En algunas realizaciones, los criterios desvelados en la presente memoria se utilizan para puntuar un estado de biomarcador c-met como negativo. En algunas realizaciones, se ha observado que el cáncer del paciente (una muestra del cáncer del paciente) contiene tinción c-met negativa, menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción de c-met débil o débil y moderada combinada, o el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción de c-met débil o débil y moderada combinada pero menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción de c-met moderada o moderada y fuerte combinada.

60 Los medicamentos para el cáncer de la invención pueden utilizarse solos o en combinación con otros medicamentos para el cáncer. Por ejemplo, un anticuerpo anti c-met (por ejemplo, MetMab) puede administrarse a una dosis de aproximadamente 15 mg/kg cada tres semanas, o a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg cada dos semanas.

65 Por ejemplo, un anticuerpo anti c-met puede administrarse conjuntamente (coadministrarse) con al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, con un agente quimioterapéutico, con otros antagonistas de c-met (tal como otros anticuerpos c-met), con un antagonista de EGFR (tal como erlotinib), o con un anticuerpo anti-VEGF (tal como

bevacizumab). Un anticuerpo c-met puede coadministrarse con un antagonista de c-met adicional. Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente incluyen la administración combinada (en la que dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración de un primer medicamento puede producirse antes, simultáneamente y/o después, de la administración de un segundo medicamento. En una realización, un anticuerpo anti c-met (tal como MetMAb) a una dosis de aproximadamente 15 mg/kg cada tres semanas; se utiliza en combinación con erlotinib (N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina) a una dosis de 150 mg, cada día de un ciclo de tres semanas. En otras realizaciones, se utiliza un antagonista de c-met (por ejemplo, anticuerpo anti c-met) en combinación con un anticuerpo anti VEGF y quimioterapia (por ejemplo, un taxano). Un ejemplo de protocolo es la administración a un paciente con cáncer de mama metastásico triple negativo, de un anticuerpo anti c-met (por ejemplo, MetMAb) administrado a una dosis de 10 mg/kg el Día 1 y el Día 15 de un ciclo de 28 días, un anticuerpo anti VEGF (por ejemplo, bevacizumab) administrado a una dosis de 10 mg/kg el Día 1 y el Día 15 del ciclo de 28 días y paclitaxel administrado a una dosis de 90 mg/m<sup>2</sup> por infusión IV el Día 1, el Día 8 y el Día 15 del ciclo de 28 días. Un ejemplo de protocolo es la administración a un paciente con cáncer de mama metastásico triple negativo de un anticuerpo anti c-met (por ejemplo MetMAb) administrado a una dosis de 10 mg/kg el Día 1 y el Día 15 de un ciclo de 28 días y paclitaxel administrado a una dosis de 90 mg/m<sup>2</sup> por infusión IV el Día 1, el Día 8 y el Día 15 del ciclo de 28 días.

Los medicamentos para el cáncer también pueden utilizarse en combinación con radioterapia.

El (los) medicamento(s) de la presente memoria pueden administrarse mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea un tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tal como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En la presente memoria se contemplan diversos programas de dosificación, incluyendo, pero sin limitación, administraciones sencillas o múltiples a lo largo de diversos momentos, administración en embolada, e infusión pulsada.

Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se utiliza en solitario o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y del ciclo de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, del historial clínico del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Una dosificación diaria típica variaría de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento generalmente sería sostenido hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden utilizarse otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriores pueden realizarse utilizando un inmunoconjugado de la invención en lugar de, o además de, un anticuerpo como medicamento.

En algunas realizaciones, el paciente no recibió más de dos tratamientos previos para el Estadio IIIB/IV. En otras realizaciones, el paciente no recibió más de 30 días de exposición a un agente en investigación o comercializado que puede actuar por inhibición de EGFR, o una toxicidad conocida relacionada con EGFR dando como resultado modificaciones en la dosis. Como inhibidores de EGFR se incluyen (pero sin limitación) gefitinib, erlotinib y cetuximab. En algunas realizaciones, el paciente no recibió quimioterapia, bioterapia, radioterapia o fármaco en investigación en los 28 días previos a la aleatorización (salvo que, opcionalmente, pudiesen utilizarse inhibidores de quinasa en las dos semanas previas a la aleatorización siempre que cualquier toxicidad relacionada con el fármaco fuera resuelta adecuadamente). En algunas realizaciones, el paciente no es un paciente con metástasis del SNC no tratada y/o activa (que progresa o que requiere anticonvulsivos o corticosteroides para un control sintomático). En los ejemplos se describen otros criterios de exclusión de pacientes y la presente invención contempla el uso de una o más de las exclusiones descritas en su interior. En algunas realizaciones, se ha observado que una muestra de cáncer del paciente tiene EGFR de tipo silvestre. En algunas realizaciones, no se ha observado que una muestra de cáncer del paciente tiene EGFR mutado.

## V. Artículos de fabricación

En otra realización de la divulgación, se proporciona un artículo de fabricación para su uso en el tratamiento de cáncer (tal como CPNM o cáncer de mama). El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente, o asociado al mismo. Como recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente lleva o contiene una composición que comprende el medicamento para el cáncer como agente activo y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón perforable a través del cual pasa una aguja de inyección hipodérmica).

El artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo recipiente que comprenda un tampón diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (ABPI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución DE dextrosa. El artículo de fabricación puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros  
5 tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

El artículo de fabricación también incluye información, por ejemplo, en forma de un prospecto, que indica que la composición se utiliza para el tratamiento de un cáncer basándose en el nivel de expresión de uno o más biomarcadores de la presente memoria. El prospecto o la etiqueta pueden tener cualquier forma, tal como un papel o  
10 un medio electrónico, tal como un medio registrado magnéticamente (por ejemplo, un disquete) o un CD-ROM. El prospecto o la etiqueta también pueden incluir otra información concerniente a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación en el kit o artículo de fabricación.

De acuerdo con una realización, se proporciona un artículo de fabricación que comprende, envasado conjuntamente, un antagonista de c-met (por ejemplo, un anticuerpo anti c-met) en un transportador farmacéuticamente aceptable y un prospecto que indique que el antagonista de c-met es para el tratamiento de un paciente con cáncer (tal como CPNM) basándose en la expresión de un biomarcador c-met.  
15

La divulgación también se refiere a un método de fabricación de un artículo de fabricación que comprende combinar en un envase una composición farmacéutica que comprenda un antagonista de c-met (por ejemplo, un anticuerpo anti c-met) y un prospecto de envase que indique que la composición farmacéutica es para el tratamiento de un paciente con cáncer (tal como CPNM) basándose en la expresión de un biomarcador c-met.  
20

El artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un recipiente adicional que comprenda un tampón diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (ABPI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y/o solución DE dextrosa. El artículo de fabricación puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros  
25 tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

### 30 **VI. Kits de diagnóstico**

La invención también se refiere a kits de diagnóstico útiles para la detección de cualquiera de uno o más de los biomarcadores identificados en la presente memoria. Por consiguiente, se proporciona un kit de diagnóstico que comprende uno o más reactivos para determinar la expresión de uno o más biomarcadores de c-met, k-ras, ALK o EGFR en una muestra de un paciente con cáncer. Opcionalmente, el kit comprende adicionalmente instrucciones para el uso del kit, para seleccionar un medicamento para el cáncer (por ejemplo, un antagonista de c-met, tal como un anticuerpo anti c-met) para el tratamiento del cáncer del paciente, si el paciente expresa el biomarcador c-met a un nivel alto. En otra realización, las instrucciones son para el uso del kit para seleccionar un medicamento para el cáncer distinto de un antagonista de c-met (o distinto de un anticuerpo anti c-met) si el paciente expresa el biomarcador a un nivel reducido.  
35  
40

### **VII. Métodos de publicidad**

La divulgación de la presente memoria también se refiere a métodos para anunciar un medicamento para el cáncer, que comprende promocionar, a un público objetivo, el uso del medicamento para el cáncer (por ejemplo, anticuerpo anti c-met) para el tratamiento de un paciente con cáncer basado en la expresión del biomarcador c-met.  
45

La publicidad es generalmente comunicación pagada a través de un medio no personal, en el que el patrocinador se identifica y el mensaje se controla. La propaganda para los fines de la presente memoria, incluye publicidad, relaciones públicas, colocación de productos, patrocinio, suscripción y promoción de venta. Este término también incluye avisos públicos informativos patrocinados que aparecen en cualquiera de los medios de comunicación impresos, diseñados para atraer la atención de una audiencia de masas para persuadir, informar, promover, motivar o, de otra manera, modificar el comportamiento hacia un patrón favorable de compra, respaldo o aprobación de la invención del presente documento.  
50  
55

La publicidad y la promoción del método de diagnóstico de la presente memoria puede efectuarse por cualquier medio. Como ejemplos de medios de publicidad utilizados para divulgar estos mensajes se incluyen la televisión, radio, películas, revistas, periódicos, Internet y vallas publicitarias, incluyendo mensajes comerciales que son mensajes que aparecen en los medios de comunicación. La publicidad también incluye la que se encuentra en los asientos de carros de supermercado, en las paredes de una pasarela de un aeropuerto y en los laterales de los autobuses, o en mensajes telefónicos o en sistemas de PA en tiendas, o en cualquier lugar donde pueda colocarse una comunicación visual o audible.  
60

Como ejemplos más específicos de medios de promoción o publicidad se incluyen la televisión, radio, películas, Internet, tal como páginas web y seminarios en red, redes informáticas interactivas destinadas a llegar a usuarios simultáneos, vallas publicitarias fijas o electrónicas y otras señales públicas, carteles, bibliografía tradicional o  
65

electrónica tal como revistas y periódicos, otros medios de comunicación, presentaciones o contactos individuales por ejemplo, mediante correo electrónico, teléfono, mensaje instantáneo, correo, mensajería, visitas en persona, etc.

El tipo de publicidad que se utilice dependerá de muchos factores, por ejemplo, de la naturaleza de la audiencia a la que se debe llegar, por ejemplo, hospitales, compañías aseguradoras, clínicas, médicos, personal sanitario y pacientes, así como de cuestiones de costes y leyes y jurisdicciones importantes y reglamentos que rigen la publicidad de medicamentos y diagnósticos. La publicidad puede ser individualizada o personalizada basándose en las caracterizaciones del usuario definidas por la interacción del servicio y/u otros datos tales como la demografía del usuario y la localización geográfica.

## Ejemplos

### **Materiales y métodos**

**Muestras:** se analizaron muestras de pacientes pretratamiento a partir de un ensayo clínico multicéntrico, aleatorizado, en fase II y con ocultación (descrito adicionalmente más adelante) diseñado para evaluar la actividad y seguridad preliminar del tratamiento con MetMab más erlotinib frente a erlotinib más placebo en CPNM. Se requirió la presentación de muestras tumorales fijadas en formalina e incluidas en parafina o de portaobjetos de parafina no teñidos (15 portaobjetos) de tumor representativo de todos los pacientes incluidos en el estudio.

**Inmunohistoquímica (IHQ):** las secciones tisulares fijadas en formalina e incluidas en parafina, se desparafinaron antes de la recuperación, bloqueo e incubación del antígeno con anticuerpos primarios anti c-Met. Después de la incubación con el anticuerpo secundario y el revelado enzimático del color, las secciones se tiñeron con tinción de contraste y se deshidrataron en series de alcoholes y xilenos antes de cubrir con un cubreobjetos.

Se utilizó el siguiente protocolo para la IHQ. Para realizar la tinción IHQ con c-met se utilizó el sistema Ventana Benchmark XT, utilizando los siguientes reactivos y materiales:

Anticuerpo primario: anticuerpo primario monoclonal de conejo (cat n.º M3444.R) anti cMET total (SP44) de Ventana

Tipo de espécimen: muestras fijadas en formalina incluidas en parafina (FFIP) y gránulos de células de control de diferentes intensidades de tinción

Especie del procedimiento: ser humano

Instrumento: BenchMark XT

Condiciones de recuperación del epítipo: acondicionamiento celular 1 (CC1, Ventana, cat n.º 950-124)

Condiciones de los anticuerpos primarios: 10 ug/ml/16 min a 37 °C

Diluyente: tampón de dilución de anticuerpo Ventana (tampón Tris HCl, cat n.º 95119)

Anticuerpo virgen para control negativo: IgG de conejo virgen a 3 µg/ml (IgG de conejo control negativo Ventana Confirm, cat n.º 760-1029)

Detección: kit de detección Ultraview Universal DAB (Reactivo Benchmark, sistema de polímero, Ventana cat n.º 760-500) utilizado según las instrucciones del fabricante.

Tinción de contraste: hematoxilina II Ventana (cat n.º 790-2208) con reactivo añil (Cat n.º 760-2037)

El Protocolo Benchmark XT fue el siguiente:

1. Parafina (Seleccionado)
2. Desparafinización (Seleccionado)
3. Acondicionamiento celular (Seleccionado)
4. Acondicionador n.º 1 (Seleccionado)
5. CC1 moderado (Seleccionado)
6. CC1 estándar (Seleccionado)
7. Temperaturas de Incubación de Ab (Seleccionado)
8. Ab Inc. 37C (Seleccionado)
9. Valoración (Seleccionado)
10. Aplicar a mano (Anticuerpo Primario) e Incubar durante (0 h 16 Min)
11. Tinción con contraste (Seleccionado)
12. Aplicar una gota de (Hematoxilina II) (Tinción de contraste), aplicar Cubreobjetos e incubar durante (4 minutos)
13. Tinción de Contraste Posterior (Seleccionado)
14. Aplicar una gota de (REACTIVO AÑIL) (Tinción de Contraste Posterior), aplicar Cubreobjetos e incubar durante (4 minutos)
15. Lavar los portaobjetos en agua jabonosa para eliminar el aceite.
16. Aclarar los portaobjetos con agua
17. Deshidratar los portaobjetos a través de Etanol 95 %, etanol 100 % a xileno (programa de autotinción Leica n.º 9)
18. Cubrir con portaobjetos.

**Puntuación de la expresión de c-met mediante IHQ:** la presencia o la ausencia de expresión de c-met en muestras de tumor se evaluó utilizando IHQ. Hubo un amplio intervalo dinámico de intensidades de tinción de c-met en CPNM, con tinción de células tumorales con intensidad negativa, débil, moderada o fuerte. Además, la expresión de c-met en tejido de tumor CPNM fue frecuentemente heterogénea; es decir, las células tumorales presentaron diferentes niveles de expresión de met en una muestra. Tanto la intensidad de tinción por IHQ (negativa, débil, moderada o fuerte) como la proporción de células tumorales que se tiñen a diferentes niveles de intensidad, se consideraron al evaluar la expresión de c-met por IHQ. Los criterios para definir los tumores con diagnóstico met positivo y los tumores con diagnóstico met negativo se definieron antes de desenmascarar el estudio, según se determina por IHQ siguiendo el sistema de puntuación a continuación.

Se puntuó la tinción de c-Met de las células tumorales. En la mayoría de los casos, la tinción fue principalmente membranosa con algunas señales citoplasmáticas (M, c), sin embargo, también se observó tinción citoplasmática predominante (C, m) en 5-10 % de las muestras. La tinción se clasificó como intensidad de tinción fuerte (3+), moderada (2+), débil (1+), ambigua (+/-) o negativa (-). La intensidad de tinción fuerte se caracterizó por un citoplasma de color marrón oscuro a negro y/o membranas engrosadas, oscuras de intensidad similar. La intensidad de tinción moderada se caracterizó por un citoplasma y/o membranas de color marrón. La tinción moderada carecía de color oscuro observado en intensidad de señal fuerte y las membranas eran más finas. La intensidad de la señal débil se caracterizó por un citoplasma de color marrón claro. La señal débil carecía del color marrón profundo observado en la intensidad de tinción moderada y las membranas eran más finas. La intensidad de señal negativa o ambigua se caracterizó por una ausencia de cualquier señal detectable o por una señal de color gris pálido o de color bronceado, en lugar de marrón, y sin evidencia de tinción de membrana potenciada.

Además de evaluar la intensidad de tinción, se estimaron visualmente los porcentajes de diversas intensidades/patrones de tinción en las muestras con señales heterogéneas.

Los siguientes gránulos de células de control con diversas intensidades de tinción se incluyeron como controles para el análisis de IHQ, así como controles de puntuación: H441 (tinción +++ (fuerte)); A549 (tinción ++ (moderada)); H1703 (tinción + (débil)); y TOV-112D (tinción - (negativa)) o H1155 (tinción - (negativa)). Para las muestras de pulmón, también se utilizó epitelio bronquial como control interno, ya que muestra una tinción membranosa moderada (2+). También se utilizó anticuerpo de control de isotipo para determinar la tinción inicial de fondo de las muestras de ensayo. El anticuerpo de control positivo, tal como Ki-67, se utilizó para evaluar la calidad del tejido. La Figura 2 muestra un ejemplo de muestras de tejido CPNM con puntuaciones IHQ de 0, 1, 2 o 3, preparadas de acuerdo con el protocolo IHQ anterior. Como se muestra en la Figura 2, la señal de tinción de c-met puede distribuirse homogéneamente con un nivel uniforme de intensidad a lo largo de las partes neoplásicas del tumor, o se distribuye heterogéneamente con más de un nivel de intensidad. La tinción puede ser heterogénea, por ejemplo, las muestras pueden tener más de un nivel de intensidad. La Figura 1 muestra ejemplos de gránulos de células de control preparados de acuerdo con el protocolo IHQ anterior.

Después de evaluar la tinción con IHQ, se informó una puntuación IHQ basada en el análisis de al menos 50 células tumorales con los siguientes límites de puntuación:

	Puntuación IHQ*	Criterios de tinción
Diagnóstico negativo	0	muestras con tinción negativa o ambigua o < 50 % de células tumorales con tinción débil (1+) o débil (1+) y moderada (2+) combinada
	1	50 % o más de células tumorales con tinción débil (1+) o débil (1+) y moderada (2+) combinada, pero menos del 50 % de células tumorales con tinción moderada (2+) o moderada (2+) y fuerte (3+) combinada
Diagnóstico positivo	2	50 % o más de células tumorales con tinción moderada (2+) o moderada (2+) y fuerte (3+) combinada, pero menos del 50 % de células tumorales con tinción fuerte (3+)
	3	50 % o más de células tumorales con tinción fuerte (3+)

\*indistintamente denominada "puntuación clínica IHQ" o "puntuación clínica"

La tinción vascular se documentó, pero no se utilizó para la puntuación IHQ, debido en parte a la falta de suficiente vasculatura en algunas muestras de biopsia.

Las categorías clínicas "diagnóstico Met positivo" y "diagnóstico Met negativo" se definieron de la siguiente manera:

- diagnóstico Met negativo: puntuación IHQ de 0 o 1
- diagnóstico Met positivo: puntuación IHQ de 2 o 3.

Para mayor claridad, se observa que la presente solicitud utiliza la siguiente terminología:  
 Por claridad, se observa que la presente solicitud utiliza la siguiente terminología:

Puntuación IHQ	Categoría de diagnóstico clínico
0 o 1	diagnóstico Met negativo, denominado indistintamente Met Dx-, Met bajo
2 o 3	diagnóstico Met positivo, denominado indistintamente Met Dx+, Met alto

- 5 Además, en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 61/378.911, presentada el 31 de agosto del 2010, una solicitud de patente relacionada con la presente solicitud, se utilizaron las expresiones “met positivo” y “met negativo” para referirse a la puntuación IHQ de 2 o 3, y a la puntuación IHQ de 0 o 1, respectivamente.

**Ensayo clínico**

10 El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial: produce la muerte de más personas que los cánceres de mama, colon, riñón, hígado, melanoma y próstata combinados. Cada año mueren 1,18 millones de personas como resultado de la enfermedad (Parkin DM, CA Cancer J Clin (2005) 55: 74-108). La mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón son diagnosticados cuando la enfermedad está en una fase avanzada y se ha propagado a otras partes del cuerpo.

15 El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) es la forma más común de la enfermedad, representando aproximadamente el 85% de todos los casos. Solo el 7,5 % de las personas diagnosticadas con CPNM avanzado (fase IV) se espera que estén vivas después de cinco años. El CPNM puede clasificarse como un adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas o carcinoma de células grandes. El adenocarcinoma es la forma más común de CPNM. Cada vez hay más pruebas de que los dos principales subtipos histológicos de CPNM, el adenocarcinoma (que representa aproximadamente el 40% de los cánceres de pulmón) y el CCE (que representa aproximadamente el 25 % del cáncer de pulmón) presentan propiedades biológicas únicas que dan como resultado respuestas diferenciales a terapias similares. Pemetrexed, aunque activo en adenocarcinoma, ha demostrado una eficacia relativamente menor en CCE (Scagliotti *et al*, 2008, J Clin Oncol. 26(21): 3543-51 Epub 27 de mayo de 2008). El tratamiento con bevacizumab en pacientes con CPNM con CCE localizado centralmente, ha dado como resultado un aumento del riesgo de hemorragia (Sandler *et al* 2006, N Engl J Med. 355 (24): 2542-50). Finalmente, los pacientes con CCE con enfermedad metastásica históricamente tienen peor supervivencia global en comparación con el adenocarcinoma. Por tanto, aún existe una necesidad de identificar regímenes eficaces para este subgrupo histológico.

20 El protocolo original para este estudio se describió, por ejemplo, en el documento WO2010/045345; sin embargo, el estudio se modificó posteriormente para añadir la inclusión de 50 pacientes con histología de células escamosas de la siguiente manera. Los pacientes se asignaron al azar en una proporción de 1:1 a uno de los dos grupos de tratamiento: MetMab + erlotinib frente a erlotinib + placebo. Una vez que se incluyeron 120 pacientes, que comprendía la población “global”, la elegibilidad se restringió a pacientes con histología de carcinoma de células escamosas (CCE) para asegurar que en el estudio se incluía un total de aproximadamente 80 pacientes con CCE. La asignación al azar de los primeros 120 pacientes que comprendía la población “global” se estratificó por un estado de fumador, un estado de rendimiento e histología y la asignación al azar de los siguientes 50 pacientes con CCE se estratificó por un estado de fumador y un estado de rendimiento. Durante este estudio, a los pacientes y a las personas en tratamiento, incluidos los investigadores, se les ocultó a la asignación de tratamiento del fármaco de estudio (MetMab o placebo). Un análisis específico del protocolo de los datos de este estudio obtenido a más tardar el 8 de junio del 2010 (n = 128 pacientes) sugirió que los pacientes cuyos tumores expresaban niveles más bajos de c-met no obtenían beneficios de MetMab. Basándose en estos datos, la exploración e inclusión de nuevos pacientes en el estudio se detuvo y el ensayo clínico se modificó de la siguiente manera:

- La administración de MetMab se interrumpió en pacientes que tenían tumores con diagnóstico c-met negativo, con la excepción de determinados pacientes si según criterio del investigador, el paciente estaba obteniendo beneficios del fármaco del estudio.
- 50 • Los pacientes con tumores de diagnóstico c-met que interrumpieron la administración de MetMab por razones distintas de la progresión de la enfermedad podrían continuar recibiendo monoterapia de erlotinib.
- Solo se permitió que los pacientes con tumores de diagnóstico c-met negativo, asignados al azar al grupo de placebo + erlotinib que presentaban progresión de la enfermedad, se cruzaran para recibir MetMab (además de continuar con erlotinib) si se obtenía una biopsia de tejido reciente en la progresión de la enfermedad y los resultados IHQ mostraron tumor de diagnóstico c-met positivo.
- 55 • Todos los demás pacientes continuaron recibiendo tratamiento según el protocolo.

60 El objetivo principal del estudio enmendado fue evaluar la supervivencia sin progresión (SSP) de MetMab más Erlotinib, con respecto a Erlotinib más placebo, en pacientes con tumores Met positivo (determinado por inmunohistoquímica), en pacientes con histología de células escamosas, así como en todos los pacientes (es decir incluyendo pacientes con tumores Met negativo).

Los objetivos secundarios de este estudio fueron: (a) evaluar la supervivencia sin progresión (SSP) en pacientes con histología de células escamosas; (b) determinar la tasa de respuesta global RECIST 1.0 y la duración de la respuesta en pacientes con tumores c-met positivo, histología de células escamosas, así como la población total de pacientes; (b) caracterizar la seguridad y tolerabilidad de MetMAB más Erlotinib en pacientes con CPNM; y (c) evaluar la concentración mínima (C<sub>mín</sub>) y la concentración máxima (C<sub>máx</sub>) tanto de MetMAB como de erlotinib en pacientes con CPNM.

Otros objetivos de este estudio fueron (a) evaluar la supervivencia global, en pacientes con histología de células escamosas, con tumores c-met positivo, así como en la población total; (b) evaluar la tasa de respuesta FDG-PET por grupo de tratamiento y en pacientes con tumores c-met positivo, así como en la población global; (c) evaluar la supervivencia sin progresión (SSP) en respondedores de FDG-PET frente a no respondedores, por grupo de tratamiento y en tumores Met positivo, histología de células escamosas, así como en la población global; (d) evaluar la relación entre los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST, *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*) 1.0 en la primera evaluación tumoral y la SSP; (e) evaluar la relación entre la respuesta y los cambios en los biomarcadores (o expresión inicial de) relacionados con las rutas de señalización HGF/Met y/o EGFR (incluyendo, pero sin limitación, IL-8 y HGF en suero); (f) evaluar posibles mecanismos de resistencia en pacientes que progresan en el estudio; y (g) evaluar el tiempo de progresión en pacientes con tumores a c-met positivo así como en la población global.

Diseño del estudio. Este estudio fue un estudio clínico multicéntrico en Fase II, con doble ocultación, aleatorizado, diseñado para evaluar la actividad y seguridad preliminar del tratamiento con MetMAB más Erlotinib frente a Erlotinib más placebo en CPNM de segunda y tercera línea. Aproximadamente se asignaron al azar 120 pacientes histológicamente no especificados de aproximadamente 40 sitios multinacionales a una proporción de 1:1 a respecto a uno de los dos grupos de tratamiento: MetMAB más Erlotinib frente a Erlotinib más placebo. Una vez que se incluyeron 120 pacientes, que comprendía la población "global", la elegibilidad se restringió a pacientes con histología de carcinoma de células escamosas (CCE) para asegurar que en el estudio se incluía un total de aproximadamente 80 pacientes con CCE. La asignación al azar de los primeros 120 pacientes que comprendía la población "global" se estratificó por estado de fumador (no fumadores y fumadores que lo habían dejado hace más de 10 de años frente a fumadores actuales y fumadores que lo habían dejado hace menos de 10 años), estado de rendimiento e histología, y la asignación al azar de los siguientes 50 pacientes con CCE se estratificó por el estado de fumador y estado de rendimiento. El tratamiento en cada grupo continuó hasta alcanzar la progresión de la enfermedad, una toxicidad inaceptable, o si se cumplía cualquier otro criterio de interrupción. Después de la progresión de la enfermedad, a los pacientes asignados al azar al grupo de Erlotinib más placebo se les dio la opción de recibir MetMAB (además de continuar con Erlotinib), siempre y cuando continuasen cumpliendo los criterios de elegibilidad. Los datos de seguridad recogidos de este estudio cruzado se resumieron para generar hipótesis.

Como se ha indicado anteriormente, un análisis específico del protocolo de los datos de este estudio obtenido a más tardar el 8 de junio del 2010 (n = 128 pacientes) sugirió que los pacientes cuyos tumores expresaban niveles más bajos de c-met no obtenían beneficios de MetMAB. Basándose en estos datos, la exploración e inclusión de nuevos pacientes en el estudio se detuvo y el ensayo clínico se modificó como se ha indicado anteriormente.

Durante estudio, se recogieron datos sobre la medición del tumor y el estado de supervivencia para la evaluación de la SSP, supervivencia global (OS) y tasa de respuesta global (TRG). Se obtuvieron escáneres CT al inicio y durante los primeros cuatro ciclos en intervalos de aproximadamente cada 6 semanas (es decir, cada dos ciclos de tres semanas de MetMAB/placebo). Después de cuatro ciclos, se realizaron escáneres CT de rutina aproximadamente cada 9 semanas (cada 3 ciclos de MetMAB/placebo). La obtención de imágenes FDG-PET se obtuvo al inicio y los Días 10-14 del Ciclo 1. Durante el transcurso de este estudio, un centro de lectura de imágenes (CLI) evaluó los resultados FDG-PET y se determinó si la obtención de imágenes FDG-PET debería continuar en todos los sitios participantes o si la obtención de imágenes FDG-PET debía limitarse a unos cuantos sitios basándose en los datos recibidos.

En algunos pacientes, se recogieron muestras de suero y plasma exploratorio para determinar el efecto de MetMAB más Erlotinib sobre niveles en circulación de posibles marcadores de actividad, incluyendo, pero sin limitación, IL-8 y HGF. La correlación de estos y otros marcadores con resultados clínicos ayuda a identificar biomarcadores predictivos, por ejemplo, marcadores en circulación que pueden reflejar la actividad del fármaco o la respuesta a la terapia. La sangre para el suero y plasma se extrajo de pacientes con consentimiento en tiempos preespecificados y se evaluó para los niveles de estos marcadores exploratorios.

La expresión de c-met y/o EGFR se determinó en una muestra de tratamiento previo del tumor. La expresión de C-met y/o EGFR se determinó por análisis IHQ y/o FISH.

Debido al beneficio de supervivencia bien establecido de los asiáticos orientales cuando se tratan con terapias dirigidas por EGFR, este estudio no permitió que más del 20% de la población de estudio evaluable fuera asiática oriental.

Medidas de resultado. La medida principal del resultado de este estudio fue la supervivencia sin progresión (SSP) definida por los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) 1.0 o muerte por cualquier causa en los treinta días posteriores al último tratamiento.

5 Las medidas secundarias del resultado de este estudio fueron las siguientes:

- (a) respuesta global (RG) (respuesta parcial más respuesta completa), determinada utilizando RECIST 1.0 en tumores Met positivo y en la población global; y
- (b) duración de la RG.

10

Las medidas del resultado exploratorio incluyeron lo siguiente:

- (a) tasas de respuesta FDG-PET, determinadas basándose en las definiciones de la European Organization for Research of Cancer (EORTC);
- (b) se supervisará la incidencia, la naturaleza y la gravedad de los acontecimientos adversos y de los acontecimientos adversos graves, y los cambios en los signos vitales, hallazgos físicos y resultados de laboratorio clínico durante y después de la administración del fármaco del estudio y
- (c) supervivencia global (tiempo desde la asignación al azar hasta la muerte por cualquier causa en los 30 días posteriores al último tratamiento del estudio).

20

Las medidas principales y secundarias de los resultados se evaluarán en pacientes con tumores c-met positivo, en pacientes con CCE y en la población "global".

Para análisis de farmacocinética y farmacodinámica de MetMab y erlotinib se recogerán muestras de suero.

25

Criterios de selección de pacientes. Los pacientes adultos eran elegibles para participar en este estudio si tenían CPNM inoperable localmente avanzado o metastásico (Fase IIIb/IV) (por ejemplo, determinado por estudios histológicos) y si habían recibido al menos uno, pero no más de dos, regímenes previos para la enfermedad CPNM en Fase IIIb/IV. Antes de la asignación al azar, se requirió la disponibilidad en el lugar de una muestra tumoral fijada en formalina e incluida en parafina, que permitió realizar el diagnóstico definitivo de CPNM con células tumorales viables adecuadas en un bloque de tejido (preferido) o en 15 portaobjetos seriados, acompañado de un informe de patología asociado. No se aceptaron muestras citológicas ni de aspirado con aguja fina. El paciente podía ser incluso elegible si proporcionaba al menos una cantidad mayor o igual a 5 portaobjetos en serie no teñidos o estaba dispuesto a consentir y a someterse a un tratamiento previo o a una biopsia excisional del tumor. No se aceptaron muestras citológicas ni de aspirado con aguja fina.

35

En este estudio, la estadificación del cáncer siguió el American Joint Committee on Cancer's AJCC Cancer Staging Manual, 6ª edición. Los pacientes que recibieron terapia neoadyuvante y/o adyuvante para la enfermedad en Fase I-IIIa antes de su régimen de primera línea (para Fase IIIb/IV), fueron elegibles para la participación en el estudio siempre que también recibieran terapia de primera línea para la enfermedad en Fase IIIb/IV. En algunas realizaciones, al menos uno de los regímenes que contenía quimioterapia (en cualquier fase) estaba basado en platino. Los pacientes deben haber tenido una enfermedad medible determinada por RECIST. En algunas realizaciones, los pacientes tenían al menos una lesión medible en un escáner FDG-PET previo al tratamiento, que también es una lesión diana en CT según RECIST. En algunas realizaciones, los pacientes proporcionaron una muestra de tumor previa al tratamiento y poseían al menos una lesión medible en un escáner FDG-PET previo al tratamiento que también es una lesión diana en CT según RESIST.

40

45

En algunas realizaciones, los sujetos excluidos eran sujetos que tenían más de dos tratamientos previos para la Fase IIIB/IV. En algunas realizaciones, los sujetos excluidos incluyeron sujetos con más de 30 días de exposición a un agente en investigación o comercializado, que podía actuar por inhibición de EGFR, o una toxicidad conocida relacionada con EGFR que producía modificaciones en la dosis. Como inhibidores de EGFR se incluyen (pero sin limitación) gefitinib, erlotinib y cetuximab. En algunas realizaciones, los sujetos excluidos incluyeron sujetos que recibieron quimioterapia, bioterapia, radioterapia o un fármaco en investigación 28 días antes de la asignación al azar (salvo que puedan utilizarse inhibidores de quinasa dos semanas antes de la asignación al azar siempre que se resuelva adecuadamente cualquier toxicidad relacionada con el fármaco) o sujetos con metástasis del SNC no tratados y/o activos (que progresan o que requieren anticonvulsivos o corticosteroides para control sintomático). En algunas realizaciones, los sujetos con antecedente de metástasis cerebral eran elegibles para participar en el estudio, siempre y cuando cumplieran los siguientes criterios: (a) enfermedad medible fuera del SNC, tal como lo define RECIST; (b) ninguna evidencia radiográfica de progresión provisional entre la finalización de la terapia dirigida al SNC y el estudio de exploración radiográfica; (c) tratamiento dirigido al SNC que puede incluir neurocirugía o radiocirugía estereotáctica; (d) la exploración del estudio radiográfico del SNC fue de  $\geq 4$  semanas desde la finalización de la radioterapia y de  $\geq 2$  semanas desde la interrupción de corticoides y anticonvulsivos; (e) la radioterapia y la radiocirugía estereotáctica finalizaron  $\geq 4$  semanas antes del Día 1 y (f) la neurocirugía se finalizó  $\geq 24$  semanas antes del Día 1 y la biopsia de cerebro se finalizó  $\geq 12$  semanas antes del Día 1.

60

65

En alguna realización, el sujeto excluido también incluyó sujetos con antecedentes de enfermedad sistémica grave, incluyendo infarto de miocardio en los seis últimos seis meses antes de la asignación al azar, hipertensión descontrolada (presión arterial persistente > 150/100 mmHg en antihipertensos), angina inestable, insuficiencia cardiaca congestiva de grado II o superior según la Asociación Estadounidense de Cardiología (*New York Heart Association*, NYHA), arritmia sintomática inestable que requiere medicación (los pacientes con arritmia auricular crónica, es decir, fibrilación auricular o taquicardia supraventricular paroxística son elegibles) o enfermedad vascular periférica de grado II o superior, diabetes descontrolada, como lo demuestra el nivel sérico de glucosa en ayunas > 200 mg/dl; procedimiento quirúrgico mayor o lesión traumática significativa en los 28 días antes de la asignación al azar; anticipación de la necesidad de un procedimiento quirúrgico mayor durante el estudio; radioterapia paliativa local en los 7 o 14 días previos a la asignación al azar o efectos adversos persistentes de la radioterapia que no se han resuelto hasta el grado II o menor antes de la asignación al azar; incapacidad para tomar medicación por vía oral o necesidad de alimentación IV o nutrición parenteral total con lípidos o procedimientos quirúrgicos previos que afectan a la absorción gastrointestinal. En algunas realizaciones, los sujetos excluidos incluyeron sujetos que tenían cualquiera de los siguientes valores hematológicos anómalos no corregidos (2 semanas antes de la asignación al azar): CAN < 1.500 células/ $\mu$ l, recuento de plaquetas < 100.000 células/ $\mu$ l, hemoglobina < 9,0 g/dl, después de transfusión de glóbulos rojos. Otros valores basales de laboratorio (2 semanas antes de la aleatorización), bilirrubina sérica > 1,5xLSN, creatinina sérica > 1,5xLSN, hipercalcemia incontrolada (> 11,5 mg/dl o > 1,5 calcio ionizado). En algunas realizaciones, el sujeto excluido incluía sujetos que tenían diabetes incontrolada y sujetos que tenían hipercalcemia sintomática que requerían el uso continuado de terapia con bisfosfonatos.

En algunas realizaciones, los sujetos excluidos incluyeron mujeres embarazadas o lactantes; los sujetos que tenían otras neoplasias malignas que se habían sometido a una supuesta cura quirúrgica o radioterapia (por ejemplo, carcinoma intraepitelial de cuello uterino, cáncer de próstata localizado después de prostatectomía o carcinoma de piel de células basales/escamosas) 5 años antes de la asignación al azar podían ser analizados con un monitor médico; o evidencia de confusión o desorientación, o antecedentes de enfermedad psiquiátrica mayor. Véase también otras exclusiones en la etiqueta de erlotinib.

Métodos estadísticos y análisis de eficacia. Los análisis de eficacia primaria y secundaria, incluyeron todos pacientes asignados al azar, con los pacientes asignados al grupo de tratamiento al que fueron asignados al azar. Los análisis de seguridad incluyeron todos los pacientes asignados al azar que recibieron al menos una dosis del tratamiento del estudio, con los pacientes asignados al grupo de tratamiento asociado al régimen realmente recibido. Las características demográficas e iniciales (por ejemplo, edad y sexo) se resumieron utilizando las medias, las desviaciones típicas, las medianas y los intervalos para las variables continuas y las proporciones para las variables categóricas, según procediera. Los resúmenes se presentaron por la población global de pacientes y por grupo de tratamiento. El valor de las medidas iniciales de cualquier variable se definió como el último valor disponible antes de la primera administración del tratamiento del estudio.

Para estimar la SSP mediana para cada grupo de tratamiento se utilizó la metodología de Kaplan-Meier. Los factores de estratificación se determinaron mediante los datos de la forma legible por ordenador (FLO), no mediante los datos recogidos por el sistema interactivo de lectura por voz en el momento de la asignación al azar a menos que faltaran los datos de FLO. La estimación de la razón de riesgos (es decir, la magnitud del efecto del tratamiento y el intervalo de confianza del 95 %) se determinó utilizando un modelo de regresión estratificado de Cox con una variable indicadora para el tratamiento con MetMAB. Se aplicaron los mismos métodos de análisis que los descritos para la SSP en pacientes de la población "global" a pacientes con tumores met positivos y a pacientes con histología de CCE. Todas las muertes por cualquier causa en los 30 días posteriores al último tratamiento se incluyeron como acontecimientos de SSP. La respuesta objetiva se definió como una respuesta completa o parcial determinada en dos ocasiones consecutivas mayores o iguales a cuatro semanas de diferencia. Los pacientes si una evaluación postbasal del tumor se consideraron no respondedores. Se calculó una estimación de la tasa de respuesta objetiva y un intervalo de confianza del 95 % (Blyth-Still-Casella) para cada grupo de tratamiento. Se calcularon los intervalos de confianza para la diferencia en la tasa de respuesta tumoral (Satnes and Snell 1980; Berger y Boos 1994). Para los pacientes con una respuesta objetiva, la duración de la respuesta objetiva se definió como el tiempo desde la respuesta inicial a la progresión de la enfermedad o la muerte por cualquier causa al cabo de los 30 días posteriores al último tratamiento. Los métodos para manejar la censura y para el análisis fueron los mismos que se describieron para SSP. Se evaluaron todos criterios de valoración de eficacia secundaria en pacientes con tumores met positivo, en pacientes con histología de CCE y por población de pacientes "global".

Medicamentos del ensayo clínico. MetMAB es un anticuerpo monoclonal monovalente, recombinante, humanizado conocido, dirigido contra c-met. MetMAB se suministra como un líquido estéril en un vial de un solo uso de 15 cc. Cada vial contiene 600 mg de MetMAB en 10 ml a una concentración de 60 mg/ml en acetato de histidina 10 mM, trehalosa 120 nM, polisorbato 20 al 0,02 %, pH 5,4. Los viales de MetMAB se refrigeraron a 2 °C - 8 °C y permanecieron refrigerados hasta antes de su uso. MetMAB se administró por vía intravenosa, después de dilución en solución salina normal (0,9 %).

Erlotinib (TARCEVA®) se proporciona como un comprimido convencional de liberación inmediata que contiene erlotinib como la sal clorhidrato. Además del principio activo, erlotinib, los comprimidos contienen lactosa (hidratada),

celulosa microcristalina, almidón glicolato de sodio, laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio. Se dispone de comprimidos que contienen 25 mg, 100 mg y 150 mg de Erlotinib.

El placebo consistía en 250 cc de NNS al 0,9 % (solución salina IV, 0,9 %).

5 Tratamiento del estudio. La dosis de MetMab fue de 15 mg/kg por vía intravenosa el día 1 de un ciclo de tres semanas. El peso en la exploración se utilizó para determinar la dosis real de MetMab. La dosis de erlotinib fue de 150 mg por vía oral cada día de un ciclo de 3 semanas. El nivel de dosificación de erlotinib puede haberse reducido a 100 mg (primera reducción) o a 50 mg (segunda reducción) en cuanto a la toxicidad probablemente atribuible al erlotinib (por ejemplo, erupción cutánea, diarrea).

15 Número de copias de MET y EGFR: se evaluaron los números de copias del gen MET y EGFR mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Se designaron mayor o igual a 5 copias de MET/célula como FISH positivo (véase Cappuzzo *et al.*, J Clin Oncol (2009) 27: 1667-9). La verdadera amplificación de MET se definió como un grupo de genes estrechos de más de o igual a 15 copias de MET en más de o igual a 10 % de células tumorales o una relación MET/CEP7 mayor o igual a 2. Para experimentos en los que se evaluaron tanto MET como el número de copias de EGFR, los tumores se consideraron MET y EGFR positivos mediante FISH, basándose en un criterio de puntuación utilizado en múltiples estudios clínicos (véase, por ejemplo, Varella-Garcia *et al.*, J Clin Pathol (2009) 62, 970-7; Capuzzo *et al.*, JNCI (2005); 97: 643-55.): FISH positivo: amplificación génica o polisomía alta, FISH negativo: polisomía, trisomía o disomía baja. Amplificación génica: grupos de genes estrechos de  $\geq 15$  copias de MET en  $\geq 10$  % de las células tumorales o relación de MET con respecto a CEP7 de  $\geq 2$ , polisomía alta:  $\geq 4$  copias de MET en  $\geq 40$  % de las células tumorales.

25 Genotipado de EGFR, KRAS y MET: se aisló ADN de portaobjetos de tejido tumoral macrodisecionado. Las mutaciones EGFR y KRAS se evaluaron utilizando kits de genotipado DxS, se evaluaron 14 variantes del exón de MET mediante DHPLC (Transgenomics Inc, Omaha NE) y se evaluó un polimorfismo MET N275S por pirosecuenciación.

30 Perfilado de ARNm: la expresión de ARNm de MET, HGF, EGFR, AREG, y EREG se evaluó en ARN extraído de portaobjetos de tejido tumoral macrodisecionado utilizando la plataforma Fluidigm. Los niveles de transcripción se normalizaron a la media de dos genes de referencia que se expresaron de forma estable en tejido pulmonar y los resultados se expresaron como valores de expresión normalizados ( $2^{-\Delta Ct}$ ).

35 HGF plasmático: los niveles en plasma de HGF recogido antes del tratamiento se evaluaron por ELISA de captura.

**Resultados de análisis basados en la fecha límite de datos de a más tardar el 8 de junio de 2010**

40 Participaron 128 pacientes con CPNM de segunda o tercera línea y asignaron al azar a 25 centros mundiales desde marzo del 2009 a marzo del 2010 a: (a) tratamiento con MetMab (15 mg/kg IV c3s) más erlotinib (denominado indistintamente "ME") (n = 64) o (b) tratamiento con placebo más erlotinib (denominado indistintamente "PE") (n = 64). La fecha límite de datos utilizada en este análisis fue a más tardar el 8 de junio de 2010.

En la Tabla 1 se muestra la distribución de los pacientes.

45

Tabla 1: distribución de los pacientes

n (%)	Erlotinib + Placebo (n = 64)	Erlotinib + MetMab (n = 64)	Total (n = 128)
Tratamiento oculto interrumpido	48 (75,0)	49 (76,6)	97 (75,8)
Progresión de la enfermedad	39 (60,9)	34 (53,1)	73 (57,0)
Acontecimientos adversos	2 (3,1)	7 (10,9)	9 (7,0)
Muertes	4 (6,3)	2 (3,1)	6 (4,7)
Otros	3 (4,7)	6 (9,4)	9 (7,0)

En la Tabla 2 se muestra la demografía de los pacientes.

Tabla 2: demografía de los pacientes

	Erlotinib+Placebo n = 64 (%)	Erlotinib+MetMab n = 64 (%)
mediana de edad (intervalo)	62 (42-83)	66 (30-83)
Sexo: masculino, n (%)	39 (60,9)	36 (56,3)
Raza: blanca, n (%)	58 (90,6)	56 (87,5)
ECOG: 0/1, n (%)	62 (96,9)	60 (93,8)
No escamoso, n (%)	48 (75)	49 (76,6)
Escamoso, n (%)	16 (25)	15 (23,4)
Nunca fumador, n (%)	8 (12,5)	10 (15,6)
Met alto*, n (%)	30 (50,8)	35 (56,5)

Kras mutante**, n (%)	13 (23,2)	13 (23,2)
EGFR mutante**, n (%)	6 (10,7)	7 (12,5)
* De 121 pacientes con muestras de tejido evaluables		
** De 112 pacientes con muestras de tejido evaluables.		

Las características iniciales estaban bien equilibradas en la población global (ITT, intención de tratar) incluyendo la prevalencia de pacientes con tumores Met alto (51 %/56,5 %; PE/ME), mutación Kras (23 %/23 %) y mutación EGFR (11 %/12,5 %). El tejido fue evaluable para análisis Met por IHQ en 121 pacientes (95 % de los pacientes) y para mutaciones de EGFR y KRAS en 112 pacientes.

En la Tabla 3 se muestran características iniciales por estado Met.

Tabla 3: características iniciales por estado Met.

	Met Alto (n = 65)		Met Bajo (n = 56)	
	MetMAB+ Erlotinib (n = 35)	Placebo+ Erlotinib (n = 30)	MetMAB+ Erlotinib (n = 27)	Placebo+ Erlotinib (n = 29)
Edad (años):				
Mediana (intervalo)	66 (30 - 83)	63 (44 - 82)	66 (45 - 82)	60(42-83)
>= 65 años	18 (51,4 %)	14 (46,7 %)	14 (51,9 %)	11 (37,9 %)
Sexo:				
Masculino	18 (51,4 %)	19 (63,3 %)	17 (63,0 %)	16 (55,2 %)
ECOG inicial:				
0/1	34 (97,1 %)	28 (93,3 %)	24 (88,9 %)	29 (100 %)
Histopatología:	26 (73,3 %)	21 (70,0 %)	12 (44,4 %)	17 (58,6 %)
Adenocarcinoma escamoso	5 (14,3 %)	4 (13,3 %)	10 (37,0 %)	10 (34,5 %)
Historial de tabaquismo:				
nunca fue fumador	7 (20,0 %)	6 (20 %)	2 (7,4 %)	1 (3,4 %)
Mutante Kras*	7 (22,6 %)	6(23,1 %)	6 (24,0 %)	7 (25,0 %)
Mutante EGFR*	7 (22,6 %)	2 (7,7 %)	0	4 (14,3 %)
* De 112 pacientes con muestras de tejido evaluables				

En este estudio, el tejido se obtuvo del 100 % de los pacientes. El 95 % de los pacientes tenía tejido adecuado para la evaluación de Met por IDC. El 54 % de los pacientes tenía CPNM "Met alto".

El tratamiento con MetMAB y erlotinib proporcionó un beneficio clínicamente significativo a pacientes con CPNM Met alto (Figura 3). Se observó un beneficio de SSP (razón de riesgos (RR) 0,56; IC del 95 % 0,31, 1,02; p = 0,05) y un beneficio de SG (RR 0,55; IC del 95 % 0,25, 1,16; p = 0,11) los pacientes tratados con MetMAB mas erlotinib. Se observó una separación temprana y sostenida de las curvas. La adición de MetMAB a erlotinib casi duplicó la supervivencia sin progresión y la supervivencia global en pacientes con CPNM met alto, en comparación con el tratamiento con erlotinib + placebo (la SSP en ME fue de 12,4 semanas, frente a 6,4 semanas en PE; la SG en ME fue de 7,7 semanas frente a 7,4 semanas en PE). 23 pacientes del grupo tratado con erlotinib + placebo se cruzaron con MetMAB y 12 de los 23 pacientes que se cruzaron con ME tuvieron una expresión alta de biomarcador Met.

Los pacientes con CPNM Met bajo no se beneficiaron del tratamiento con MetMAB + erlotinib (Figura 4). MetMAB aumentó el riesgo de progresión y muerte en pacientes con CPNM Met bajo frente a tratamiento con erlotinib y placebo: tanto la SSP (RR 2,01; IC 95 % 1,04, 3,91; p = 0,04) como la SG (RR 3,26; IC 95 % 1,20, 8,80; p = 0,01) fueron peores en la cohorte ME. ~70 por ciento de los pacientes Met bajo tratados con MetMAB y erlotinib progresó en la primera evaluación (TAC en la semana 6).

SSP y SG en la población global (Figura 5). La SSP y la SG no fueron significativamente diferentes en los grupos de tratamiento de MetMAB mas erlotinib y placebo más erlotinib en la población global. El tratamiento con MetMAB mas erlotinib no mostró beneficio en la población global en relación con el tratamiento de placebo más erlotinib. Las RR para la SSP y la SG en la población global (denominada indistintamente "intención de tratar" o ITT por las siglas *intention-to-treat*) fueron 1,09 (IC 95 % 0,71, 1,67; p = 0,70) y 1,09 (IC 95 % 0,62, 1,91; p = 0,76). La SSP mediana y SG media eran coherentes con los resultados previamente informados en situaciones similares de la enfermedad. 23 pacientes del grupo tratado con erlotinib + placebo se cruzaron con un tratamiento con MetMAB+ erlotinib. Las tasas de respuesta objetiva fueron: Erlotinib + Placebo n = 3 (4,7 %), Erlotinib + MetMAB n = 4 (6,3 %).

La SSP se examinó por subgrupos (Figura 6). Los pacientes con estado Met por IHQ de 3 y 2 mostraron un beneficio con tratamiento de MetMAB + erlotinib, mostrando los pacientes con estado 3 un mayor beneficio. Los pacientes con estado Met por IHQ de 0 y 1 no mostraron beneficio con tratamiento con de MetMAB mas erlotinib. Los pacientes con estado 0 empeoraron con MetMAB + erlotinib en comparación con los pacientes con estado 1. No se observó beneficio selectivo del tratamiento de MetMAB + erlotinib en otros subgrupos, incluyendo: categoría histológica (no escamoso frente a escamoso), historial de tabaquismo, ECOGCC, mutación de EGFR o mutación de Kras.

La Figura 9 muestra el análisis de subgrupos de SSP en pacientes con Met alto.

La SG también se examinó por subgrupos (Figura 7). Similar a los resultados de SSP, los pacientes con estado Met alto por IHQ de 3 y 2, mostraron beneficio del tratamiento con MetMab + erlotinib, los pacientes con estado 3 mostraron el mayor beneficio. Los pacientes con estado Met bajo por IHQ de 0 y 1, no mostraron beneficio del tratamiento con MetMab mas erlotinib. Los pacientes con estado 0 empeoraron con MetMab + erlotinib en comparación con los pacientes con estado 1. El beneficio selectivo del tratamiento de MetMab + erlotinib no se observó en otros subgrupos, incluyendo: categoría histológica (no escamoso frente a escamoso), historial de tabaquismo, ECOGCC, mutación de EGFR o mutación de Kras.

La Figura 10 muestra un análisis por subgrupos de SG en pacientes con Met alto. Las Figuras 11 y 12 muestran un análisis por subgrupos de SSP y SG, respectivamente, en pacientes con Met bajo.

La supervivencia global también se analizó en la población Met alto excluyendo pacientes con mutaciones conocidas de EGFR. El grado de beneficio del tratamiento con MetMab + erlotinib (con respecto a placebo + erlotinib) (SG RR =0,55, IC 95 % 0,26, 1,20, p = 0,13) fue aproximadamente igual a la supervivencia global en la población Met alto incluyendo a pacientes con mutaciones conocidas de EGFR. Por lo tanto, el beneficio del tratamiento con MetMab + erlotinib en pacientes con Met alto no fue promovido por un estado de la mutación de EGFR.

En la Tabla 4 se muestran variables de pronóstico clave por estado Met.

Tabla 4: variables de pronóstico clave por estado Met

	Met positivo (n = 65)		Met negativo (n = 56)	
	Erlotinib + Placebo (n = 30)	Erlotinib +MetMab (n = 35)	Erlotinib +Placebo (n = 29)	Erlotinib +MetMab (n = 27)
Histopatología (n = 128)				
Adenocarcinoma	21 (70,0)	26 (73,3)	17(58,6)	12 (44,4)
Escamoso	4(13,3)	5 (14,3)	10 (34,5)	10 (37,0)
Análisis mutacional (n = 112)				
Mutante Kras	6(23,1)	7(22,6)	7 (25,0)	6 (24,0)
Mutante EGFR	2(7,7)	7(22,6)	4(14,3)	0

La expresión de Met fue pronóstica de un peor resultado (Figura 8). En un análisis de los pacientes tratados con erlotinib + placebo, los pacientes con Met alto tuvieron un mayor riesgo de progresión (RR = 1,73; SSP mediana de 6,4 semanas) y aproximadamente el doble de riesgo de muerte (RR = 2,52; SG mediana de 7,4 semanas) en relación con pacientes con Met bajo (SSP mediana de 11,4 semanas; SG mediana de 9,2 semanas). Por lo tanto, la expresión de Met es un factor pronóstico para la progresión y la supervivencia en pacientes con CPNM de segunda o tercera línea tratados con erlotinib: los pacientes con Met alto empeoraron cuando se trataron con erlotinib, mientras que los pacientes con Met bajo mejoraron cuando se trataron con erlotinib.

El patrón de progresión (crecimiento de lesión diana frente a nueva lesión) fue comparable entre los grupos de tratamiento y por el estado met (Tabla 5).

Tabla 5: patrón de progresión

	Met Alto		Met Bajo	
	Erlotinib + Placebo n =21	Erlotinib + MetMab n = 17	Erlotinib + Placebo n = 15	Erlotinib + MetMab n = 15
n.º de pts PD por RECIST	13 (61,9)	11 (64,7)	10 (66,7)	11 (73,3)
PD en lesiones diana	12 (57,1)	9 (52,9)	6 (40,0)	7 (46,7)

El patrón de progresión (crecimiento de lesión diana frente a nueva lesión) fue comparable entre los grupos de tratamiento y por estado Met.

En la Tabla 6 se muestra un análisis de eficacia de la tasa de respuesta global, TRG.

Tabla 6: análisis de eficacia de TRG.

	Erlotinib + Placebo	Erlotinib + MetMab
<b>Global</b>	n = 64	n = 64
N.º de pacientes con RG (%)	3 (4,7)	4 (6,3)
IC 95 % para TRG	1,3-12,5	2,2-15
Diferencia en TRG, % (IC 95 %)	1,6 (-6,3-9,4)	

Valor de p	1,0	
<b>Met alto</b>	n = 30	n = 35
N.º de pacientes con RG (%)	1 (3,3)	3 (8,6)
IC 95 % para TRG	0,2 %-16,3	2,4-21,5
Diferencia en TRG, % (IC 95 %)	5,2 (-6,0-16,5)	
Valor de p	0,62	

En la Tabla 7 se muestra la exposición al tratamiento por estado Met.

Tabla 7: exposición al tratamiento por estado Met

	Met Alto		Met Bajo	
	Erlotinib +Placebo (n = 30)	Erlotinib +MetMAB (n = 35)	Erlotinib +Placebo (n = 29)	Erlotinib +MetMAB (n = 27)
<b>MetMAB o Placebo</b>				
N.º de ciclos: mediana (intervalo)	2(1-14)	4(1-18)	4(1-12)	2 (1-8)
<b>Erlotinib</b>				
N.º de dosis: mediana (intervalo)	49,5 (4-290)	61 (14-338)	85 (21-239)	42 (1-152)
Pacientes que requieren modificación de la dosis (%)	8(26,7)	14 (40)	7(24,1)	11 (40,7)

5

Seguridad: el tratamiento con Erlotinib + MetMAB fue bien tolerado. La Tabla 8 muestra todos los acontecimientos adversos, independientemente de la relación, con una frecuencia informada superior al 10 % observada en el estudio. Con la excepción de edema (predominantemente de grado 1-2), la toxicidad global de Erlotinib + MetMAB fue comparable a la de Erlotinib + Placebo.

10

Tabla 8: todos los acontecimientos adversos

n (%)	Met Alto		Met Bajo	
	Erlotinib +Placebo (n=30)	Erlotinib +MetMAB (n=35)	Erlotinib +Placebo (n=29)	Erlotinib +MetMAB (n=27)
<b>Total</b>	30 (100)	35 (100)	29 (100)	26 (96,3)
<b>Erupción</b>	19 (63,3)	21 (60,0)	16 (52,2)	15 (55,6)
<b>Diarrea</b>	13 (43,3)	18 (51,4)	13 (44,8)	7 (25,9)
<b>Fatiga</b>	12 (40,0)	15 (42,9)	10 (34,5)	6 (22,2)
<b>Disminución del apetito</b>	10 (33,3)	10 (28,6)	5 (17,2)	3 (11,1)
<b>Nauseas</b>	8 (26,7)	10 (28,6)	8 (27,6)	9 (33,3)
<b>Disnea</b>	8 (26,7)	7 (20,0)	4 (13,8)	4 (14,8)
<b>Tos</b>	6 (20,0)	6 (17,1)	5 (17,2)	3 (11,1)
<b>Dermatitis acneiforme</b>	3 (10,0)	5 (14,3)	6 (20,7)	5 (18,5)
<b>Piel seca</b>	5 (16,7)	5 (14,3)	5 (17,2)	2 (7,4)
<b>Edema periférico</b>	2 (6,7)	7 (20)	2 (6,9)	5 (18,5)
<b>Anemia</b>	5 (16,7)	4 (11,4)	3 (10,3)	3 (11,1)

La Tabla 9 muestra todos los acontecimientos adversos de grado 3-5 (frecuencia > 5 %) observados en el estudio. No hubo acontecimientos de grado 5. La erupción cutánea, la diarrea y la fatiga fueron comparables entre los grupos de tratamiento tanto en las subpoblaciones Met alto como en las Met bajo. La incidencia de acontecimientos adversos de grado ≥ 3 fue similar en ME frente a PE en el grupo con Met alto (54 % frente a 53 %); sin embargo, la incidencia de acontecimientos adversos de grado ≥ 3 fue mayor en el grupo ME que en el grupo de Met bajo (52 % frente a 35 % en el grupo PE).

15

Tabla 9: acontecimientos adversos de grado 3-5

n (%)	Met alto		Met bajo	
	Erlotinib +Placebo (n = 30)	Erlotinib +MetMAB (n = 35)	Erlotinib +Placebo (n = 29)	Erlotinib +MetMAB (n = 27)
<b>Total</b>	16 (53,3)	19 (54,3)	10 (34,5)	14 (51,9)
<b>Erupción</b>	1 (3,3)	3 (8,6)	1 (3,4)	1 (3,7)
<b>Diarrea</b>	2 (6,7)	4 (11,4)	1 (3,4)	1 (3,7)
<b>Neumonía</b>	0	1 (2,9)	1 (3,4)	4 (14,8)
<b>Fatiga</b>	1 (3,3)	3 (8,6)	1 (3,4)	2 (7,4)
<b>Embolismo pulmonar</b>	1 (3,3)	2 (5,7)	0	2 (7,4)

20

En la Tabla 10 se muestra un resumen de seguridad.

Tabla 10: resumen de seguridad

n (%)	Met alto		Met bajo	
	Erlotinib +Placebo (n = 30)	Erlotinib +MetMab (n = 35)	Erlotinib + Placebo (n = 29)	Erlotinib +MetMab (n = 27)
Ningún AA	30 (100)	35 (100)	29 (100)	26 (96,3)
Grado ≥ 3 AA	16 (53,3)	19 (54,3)	10 (34,5)	14 (51,9)
AAS	11 (36,7)	14 (40)	6 (20,7)	11 (40,7)
AA que conducen al tratamiento	3 (10)	8 (22,9)	0	1 (3,7)
Interrupción*				
AA que conducen a muerte**	3 (10)	1 (2,9)	0	4 (14,8)

\*Para pacientes del grupo tratado con Erlotinib + MetMab que eran Met alto: neumonía por aspiración, hernia obstructiva, hipoxia, infarto cerebral, estenosis esofágica, fatiga, NOS y toxicidad en uñas.  
\*\*AA que conducen a muerte para paciente con Met bajo: neumonía, embolia pulmonar, hemoptisis, CPNM

### Conclusiones

- 5
- El anticuerpo anti c-met, MetMab, era un inhibidor selectivo y fuerte del receptor de Met.
  - La expresión alta de Met se asoció con un peor resultado en los pacientes tratados con placebo.
  - El tratamiento con la combinación de erlotinib y MetMab benefició a pacientes con CPNM que tenían Met alto.
  - Los resultados más malos para los pacientes con CPNM que tenían Met bajo tratados con erlotinib + MetMab no pueden explicarse por los acontecimientos adversos.
- 10
- Erlotinib + MetMab fueron bien tolerados y no hubo nuevos hallazgos de seguridad significativos.
  - Los resultados para la población global frente a los de los pacientes con CPNM con Met alto destacan la importancia de utilizar un diagnóstico.

### Análisis final basado en la fecha límite de datos de a más tardar el 15 de noviembre de 2010

- 15
- Participaron 128 pacientes con CPNM de segunda o tercera línea y asignaron al azar a 25 centros mundiales desde marzo del 2009 a marzo del 2010 a: (a) tratamiento con MetMab (15 mg/kg IV c3s) más erlotinib (denominado indistintamente "ME") (n = 64) o (b) tratamiento con placebo más erlotinib (denominado indistintamente "PE") (n = 64). La fecha límite de datos utilizada en este análisis fue a más tardar el 15 de noviembre de 2010.

20

En la Tabla 11 se muestra la distribución de los pacientes.

Tabla 11: distribución de los pacientes

N.º de pacientes (%)	Diagnóstico Met positivo		Diagnóstico Met negativo		Todos los pacientes (n=137)
	Placebo + erlotinib (n=31)	MetMab + erlotinib (n=35)	Placebo + erlotinib (n=31)	MetMab + erlotinib (n=31)	
Progresión de la enfermedad	23 (74,2)	18 (51,4)	22 (71,0)	22 (71,0)	92 (67,2)
Acontecimiento adverso	2 (6,5)	7 (20,0)	1 (3,2)	1 (3,2)	11 (8,0)
Muerte	4 (12,9)	0	1 (3,2)	2 (6,5)	7 (5,1)
Decisión del médico	1 (3,2)	2 (5,7)	5 (16,1)	3 (9,7)	12 (8,8)
Decisión del paciente	1 (3,2)	3 (8,6)	1 (3,2)	1 (3,2)	6 (4,4)
Decisión del patrocinador	0	0	1 (3,2)	0	1 (0,7)

- 25
- En la Tabla 12 se muestran los datos demográficos del paciente.

Tabla 12: datos demográficos del paciente

	Erlotinib+Placebo n = 64 (%)	Erlotinib+MetMab n = 64 (%)
Mediana de edad (intervalo)	62 (42-83)	66 (30-83)
Sexo: masculino, n (%)	39 (60,9)	36 (56,3)
Raza: blanca, n (%)	5 (90,6)	56 (87,5)
ECOG: 0/1, n (%)	62 (96,9)	60 (93,8)
No escamoso, n (%)	48 (75)	49 (76,6)
Escamoso, n (%)	16 (25)	15 (23,4)
Nunca fumador, n (%)	8 (12,5)	10 (15,6)
Met Dx pos *, n (%)	30 (50,8)	35 (56,5)
Kras mutante**, n (%)	13 (23,2)	13 (23,2)
EGFR mutante**, n (%)	6 (10,7)	7 (12,5)

\* De 121 pacientes con muestras de tejido evaluables  
\*\* De 112 pacientes con muestras de tejido evaluables.

Las características iniciales estaban bien equilibradas en la población global (ITT, intención de tratar) incluyendo la prevalencia de pacientes que tenían tumores con diagnóstico Met positivo (51 %/56,5 %; PE/ME), mutación Kras (23 %/23 %) y mutación EGFR (11 %/12,5 %). El tejido fue evaluable para análisis Met por IHQ en 121 pacientes (95 % de los pacientes) y para mutaciones de EGFR y KRAS en 112 pacientes.

5

En la Tabla 13 se muestran características iniciales por estado Met.

Tabla 13: características iniciales por estado Met

	ITT		Met Dx Negativo		Met Dx Positivo	
	Placebo + erlotinib (n = 68)	MetMAB + erlotinib (n = 69)	Placebo + erlotinib (n = 31)	MetMAB + erlotinib (n = 31)	Placebo + erlotinib (n = 31)	MetMAB + erlotinib (n = 35)
Mediana de edad (intervalo)	63 (42-83)	64 (30-83)	61 (42-83)	63 (45-82)	64 (44-82)	66 (30-83)
Sexo: masculino	62 %	58 %	55 %	65 %	65 %	51 %
Raza: blanca	90 %	88 %	90 %	87 %	90 %	91 %
ECOG PS: 0/1	97 %	94 %	100 %	90 %	94 %	97 %
Escamoso	29 %	29 %	39 %	45 %	16 %	14 %
Nunca fue fumador	12 %	15 %	3 %	7 %	19 %	20 %
Met Dx positivo*	50 %	53 %	0 %	0 %	100 %	100 %
Mutante KRAS**	23 %	23 %	25 %	24 %	23 %	23 %
Mutante EGFR**	11 %	13 %	14 %	0 %	8 %	23 %
* De 128 pacientes con muestras de tejido evaluable						
** De 112 pacientes con muestras de tejido evaluable.						

10

En este estudio, el tejido se obtuvo del 100 % de los pacientes. El 95 % de los pacientes tenían tejido adecuado para la evaluación de Met por IHC. El 54 % de los pacientes tenía CPNM con "Met alto".

15

El tratamiento con MetMAB y erlotinib proporcionó un beneficio estadísticamente significativo y clínicamente importante en pacientes con CPNM con diagnóstico Met positivo (Figura 13). Se observó un beneficio de SSP (razón de riesgos (RR) 0,53; IC 95 % 0,28-0,99; p = 0,04,) y un beneficio de SG (RR 0,37; IC 95 % 0,19-0,72; p = 0,002) en pacientes con diagnóstico Met positivo tratados con MetMAB más erlotinib. Se observó una separación temprana y sostenida de las curvas. La adición de MetMAB a erlotinib dio como resultado una reducción de casi tres veces en el riesgo de muerte. La SSP mediana en pacientes tratados con MetMAB + erlotinib (ME) fue de 2,9 meses, frente a 1,5 meses en pacientes tratados con placebo + erlotinib (PE); la SG mediana en pacientes tratados con MetMAB + erlotinib fue de 12,6 meses frente a 3,8 meses en los pacientes tratados con placebo + erlotinib).

20

25

Los pacientes con CPNM con diagnóstico Met negativo no se beneficiaron del tratamiento con MetMAB + erlotinib (Figura 14). MetMAB aumentó el riesgo de progresión y muerte en pacientes con CPNM con Met bajo frente a tratamiento con erlotinib y placebo: tanto la SSP mediana (RR 1,82; IC 95 % 0,99-3,32; p = 0,05) como la SG mediana (RR 1,78; IC 95 % 0,79 - 3,99; p = 0,16) fueron peores en la cohorte tratada con MetMAB + erlotinib. ~70 por ciento de los pacientes con Met bajo tratados con MetMAB y erlotinib progresó en la primera evaluación (TAC en la semana 6).

30

En la figura 15 se muestra la SSP y la SG en la población global. La SSP y la SG no fueron significativamente diferentes en los grupos de tratamiento con MetMAB más erlotinib y placebo más erlotinib en la población global. El tratamiento con MetMAB más erlotinib no mostró beneficio en la población global en relación con el tratamiento con placebo más erlotinib. Las razones de riesgo para la SSP y GS en la población global (denominada indistintamente "intención de tratar" o ITT) fueron 1,09 (IC 95 % 0,73, 1,62; p = 0,69) y 0,8 (IC 95 % 0,5, 1,3; p = 0,76). La SSP mediana y la SG mediana fueron coherentes con los hallazgos previamente informados en situaciones similares de enfermedad.

35

40

También se examinó la SG por subgrupos (Figura 16). Los pacientes con diagnóstico Met positivo mediante IHQ de estado 3 y 2 mostraron beneficio del tratamiento con MetMAB + erlotinib, y los pacientes con estado 3 mostraron mayor beneficio. Los pacientes con diagnóstico Met negativo mediante IHQ de estado 0 y 1 no se beneficiaron del tratamiento con MetMAB más erlotinib, y los pacientes con estado 0 empeoraron con MetMAB + erlotinib en comparación con los del estado 1. No se observó beneficio selectivo del tratamiento de MetMAB + erlotinib en otros subgrupos, incluyendo: categoría histológica (células escamosas frente a no escamosas), historial de tabaquismo, ECOGCC, mutación de EGFR o mutación de Kras.

45

La Figura 17 muestra un análisis de subgrupos de SG en pacientes con diagnóstico Met negativo.

También se analizó la supervivencia global en subpoblaciones de pacientes clave: pacientes con MET FISH positivo (definido como mayor o igual a cinco copias de MET), diagnóstico Met positivo/MET FISH negativo, diagnóstico Met positivo/EGFR de tipo silvestre y diagnóstico Met positivo/MET FISH negativo/EGFR de tipo silvestre (Figura 18). El beneficio de la adición de MetMab a erlotinib no fue exclusivo para los pacientes con MET FISH positivo y se observó en los pacientes con MET FISH negativo/diagnóstico Met positivo, lo que sugiere que la IHQ es un factor pronóstico de beneficio más sensible de MetMab. El beneficio de MetMab + erlotinib en los pacientes con diagnóstico Met positivo no fue promovido por un estado de mutación de EGFR.

En la Tabla 14 se muestran variables pronósticas clave por estado Met.

Tabla 14: variables pronósticas clave por estado Met

	Met Positivo (n = 65)		Met Negativo (n = 56)	
	Erlotinib + Placebo (n = 30)	Erlotinib +MetMab (n = 35)	Erlotinib +Placebo (n = 29)	Erlotinib +MetMab (n = 27)
Histopatología (n = 128)				
Adenocarcinoma	21 (70,0)	26 (73,3)	17(58,6)	12 (44,4)
	Erlotinib + Placebo (n=30)	Erlotinib +MetMab (n=35)	Erlotinib +Placebo (n=29)	Erlotinib +MetMab (n=27)
Histopatología (n = 128)				
Escamoso	4(13,3)	5 (14,3)	10 (34,5)	10 (37,0)
Análisis mutacional (n = 112)				
Mutante Kras	6(23,1)	7(22,6)	7 (25,0)	6 (24,0)
Mutante EGFR	2(7,7)	7(22,6)	4(14,3)	0

La expresión de Met fue pronóstico de un peor resultado (Figura 19). En un análisis de los pacientes tratados con erlotinib + placebo, los pacientes con diagnóstico Met positivo tenían riesgo aumentado de progresión (RR = 1,7; SSP mediana de 1,5 meses) y riesgo aumentado de muerte (RR = 3,8; SG mediana de 3,8 meses) con respecto a los pacientes con diagnóstico Met negativo (SSP mediana de 2,7 meses; SG mediana de 15,3 meses). Por tanto, la expresión de Met es un factor pronóstico de progresión y supervivencia en los pacientes con CPNM de segunda o tercera línea tratados con erlotinib: los pacientes con diagnóstico Met positivo no empeoraron cuando se trataron con erlotinib, mientras que los pacientes con diagnóstico Met negativo mejoraron cuando se trataron con erlotinib.

Seguridad: el tratamiento con Erlotinib + MetMab fue bien tolerado. En la Tabla 15 se resumen los datos de seguridad.

Tabla 15: resumen de datos de seguridad

N.º de pacientes (%)	Diagnóstico Met Positivo		Diagnóstico Met Negativo	
	Placebo + erlotinib (n = 31)	MetMab + erlotinib (n = 35)	Placebo + erlotinib (n = 31)	MetMab + erlotinib (n = 31)
Ningún acontecimiento adverso	31 (100)	35 (100)	31 (100)	31 (100)
Acontecimiento adverso de grado ≥ 3	17 (54,8)	20(57,1)	13(41,9)	17 (54,8)
Acontecimiento adverso grave	11 (35,5)	15 (42,9)	9 (29,0)	13 (41,9)
Acontecimientos adversos que conducen a interrumpir el tratamiento con MetMab/placebo	2 (6,5)	8 (22,9)	0	2 (6,5)
Acontecimientos adversos que conducen a muerte	4(12,9)	1 (2,9)	0	3(9,7)

La adición de MetMab no aumentó sustancialmente la frecuencia (mayor que o igual a 10) de ningún acontecimiento adverso específico en ambas poblaciones diagnósticas con la excepción del edema periférico, que fue mayor en los grupos tratados con MetMab, en las poblaciones con diagnóstico Met tanto positivo como negativo. El tratamiento con MetMab no aportó nuevas toxicidades sustanciales ni agravó las toxicidades conocidas de erlotinib, independientemente del estado diagnóstico de Met, aunque una proporción más alta de pacientes con diagnóstico Met positivo interrumpió el tratamiento con MetMab + erlotinib debido a acontecimientos adversos y una proporción más alta de pacientes con diagnóstico Met negativo con tratamiento MetMab + erlotinib tuvo acontecimientos adversos significativos y acontecimientos adversos de grado 3 o mayor.

Crecimiento tumoral y progresión de la enfermedad: La tasa de crecimiento tumoral no fue significativamente diferente entre los grupos de tratamiento del estado Met en el ciclo 2, momento en el cual se había producido la mayoría de los acontecimientos de SSP.

El efecto del tratamiento con MetMab + erlotinib sobre la supervivencia global también se evaluó en pacientes utilizando diferentes esquemas de puntuación IHQ para definir a los pacientes que se puntuaron como met positivos:

- Un límite menos estricto de mayor que o igual al 10 % de las células tumorales con una intensidad de tinción IHQ moderada (2+) o alta (3+) ("diagnóstico Met positivo de 10 %")

- Un límite más estricto de mayor que o igual al 90 % de las células tumorales con una intensidad de tinción IHQ moderada (2+) o alta (3+) ("diagnóstico Met positivo de 90 %").

Las estimaciones del efecto del tratamiento en subgrupos de pacientes se expresaron como razones de riesgo utilizando un modelo de Cox no estratificado, incluyendo un intervalo de confianza del 95 %. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 21. Cuando se utilizó el 10 % como límite, la RR en los pacientes seleccionados como diagnóstico Met positivo de 10% (n = 87) fue de 0,52, con un IC del 95 % de 0,30, 0,92. Cuando se utilizó el 50 % como límite (es decir, mayor que o igual al 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción IHQ moderada (2+) o alta (3+)), la RR en los pacientes seleccionados como diagnóstico Met positivo (n = 66) fue de 0,38, con un IC del 95 % de 0,20, 0,71. Cuando se utilizó el 90 % como límite, la RR en pacientes seleccionados como diagnóstico Met positivo de 90% (n = 47) fue de 0,30, con un IC del 95 % de 0,14, 0,64. En los pacientes que se seleccionaron como (a) diagnóstico Met positivo de 10% y (b) diagnóstico no Met positivo utilizando el límite de 50 %, (n = 21), la RR fue de 2,83, con un IC del 95 % de 0,53, 15,2. En los pacientes que se seleccionaron como (a) diagnóstico Met positivo utilizando el límite del 50 % y (b) diagnóstico no Met positivo del 90 % (n = 19), la RR fue de 0,75, con un IC del 95% de 0,24, 2,42. Este análisis detallado de los diferentes esquemas de puntuación confirma el uso de la definición de diagnóstico Met positivo como mayor o igual al 50 % de las células tumorales que se tiñen con una intensidad de moderada (2+) o alta (3+) para Met por IHQ.

### Conclusiones

- El anticuerpo anti c-met, MetMAB, era un inhibidor selectivo y fuerte del receptor de Met.
- La expresión alta de Met se asoció con un peor resultado en los pacientes tratados con placebo.
- El tratamiento con la combinación de erlotinib y MetMAB benefició a pacientes con CPNM con diagnóstico Met positivo.
- Los resultados más malos para los pacientes con CPNM con diagnóstico Met positivo tratados con erlotinib + MetMAB no pueden explicarse por los acontecimientos adversos.
- Erlotinib + MetMAB fueron bien tolerados y no hubo nuevos hallazgos de seguridad significativos.
- Los resultados para la población global frente a los de los pacientes con CPNM con diagnóstico Met positivo destacan la importancia de utilizar un diagnóstico.

### Análisis con biomarcadores exploratorios de OAM4558g: un estudio en fase II controlado con placebo de erlotinib ± MetMAB en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) avanzado

Se midieron biomarcadores tumorales exploratorios relacionados con la señalización de c-Met y/o EGFR mediante FISH, qRT-PCR o diversas técnicas de detección de mutaciones a partir de especímenes archivados de tejido tumoral. Los niveles plasmáticos de HGF se midieron mediante ensayo ELISA. Los análisis con resultados se llevaron a cabo independientemente del estado del diagnóstico clínico de Met.

**Resultados:** las características iniciales de pacientes con tumor evaluable o de especímenes de plasma fueron generalmente comparables.

Mutaciones de EGFR y de KRAS: se obtuvieron datos de EGFR y KRAS de n = 112 (93 %) pacientes, variantes del exón 14 de MET de n = 87 (72 %) pacientes y del snp N375S de MET de n = 113 (93 %) pacientes. Se predijeron mutaciones de EGFR para 6/7 respuestas objetivas en estudio y fueron comparables entre los grupos de tratamiento. Las mutaciones de KRAS (detectadas en el 23 % (26/112) de especímenes evaluables) se excluyeron mutuamente con mutaciones de EGFR (detectadas en el 12 % (13/112) de los especímenes evaluables) y no tuvieron un resultado significativamente impactante con MetMAB en las poblaciones ITT o con diagnóstico Met positivo/negativo.

Datos de variantes de MET: la mutación de delección del exón 14 de MET se identificó en el 1 % (n = 1) de los especímenes evaluables. El snp N375S de MET se identificó en el 11 % (n = 12) de los especímenes evaluables. Debido al desequilibrio entre los grupos de tratamiento no se pudieron realizar análisis de los resultados.

FISH (hibridación in situ con fluorescencia) de MET: se obtuvieron datos FISH de n = 96 (75 %) pacientes. Hubo una tendencia no significativa a mejorar el resultado en pacientes con EGFR de tipo silvestre que fueron MET FISH positivo, como se define por  $\geq 5$  copias de MET/célula, pero no a un umbral inferior (por ejemplo  $\geq 4$  copias (RR=0,89, p=0,82)). En general, el 74 % de los pacientes que fueron FISH positivo también tuvieron un diagnóstico Met positivo. La verdadera amplificación génica se detectó en el 8 % de los pacientes. Sin embargo, los pacientes con EGFR de tipo silvestre que tuvieron un diagnóstico Met positivo y fueron MET FISH negativo, mostraron una tendencia a mejorar los resultados (SG RR=0,45, p=0,07), lo que indica que la evaluación de la amplificación del gen met utilizando FISH, perdía posiblemente un gran subgrupo de pacientes que podían beneficiarse del tratamiento con MetMAB. No hubo ninguna diferencia significativa en la SG en los pacientes con MET y EGFR FISH positivo.

Análisis de genes de la ruta MET y EGFR por qRT-PCR y análisis de niveles plasmáticos de HGF: se obtuvieron datos de ARNm de n = 67 pacientes (49 %) (Figura 20). Se observó una asociación no estadísticamente significativa de los niveles de ARNm de tumor MET con la puntuación clínica IHQ para Met; sin embargo, la expresión de ARNm

de *MET* o de otros genes no se predijo independientemente para beneficio de la SSP o SG en el subconjunto de pacientes con datos de ARNm (Tabla 16).

Tabla 16. Asociación de la expresión de *MET*, *EGFR*, *AREG* y *EREG* con resultados

ARNm		Placebo + Erlotinib		MetMAb + Erlotinib		RR	IC del 95 %	Valor de p
(mediana)		n	Mediana (meses)	n	Mediana (meses)			
MET (3,16)	Alta	12	6,5	22	8,7	0,59	0,25-1,4	0,23
	Baja	19	15,3	14	11,7	1,48	0,54-4,1	0,45
EGFR (7,75)	Alta	13	8,3	21	7,1	1,1	0,44-2,76	0,83
	Baja	18	7,1	15	11,7	0,88	0,33-2,33	0,80
AREG (7,11)	Alta	13	8,3	21	NA	0,77	0,30-1,99	0,58
	Baja	18	6,9	15	6,5	1,31	0,53-3,25	0,55
EREG (0,26)	Alta	13	6,9	21	10,2	0,67	0,28-1,63	0,37
	Baja	18	9,2	15	8,1	1,34	0,50-3,60	0,57

5 Se obtuvieron datos iniciales de HGF plasmático de n = 96 pacientes (70 %). Fue obvia una tendencia no significativa de un mejor resultado en pacientes con niveles bajos de proteína HGF en el plasma recogido antes del tratamiento.

10 *Conclusiones:* los datos presentados en la presente memoria confirman una IHQ Met como el indicador más fuerte, sensible e independiente del beneficio de SG en el tratamiento con MetMAb. La investigación adicional de estos biomarcadores se justifica dado el pequeño tamaño de este estudio.

Aunque la invención Anterior se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad y entendimiento, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.

<120> BIOMARCADORES Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO

20

<130> P4492R1 WO

<140>

<141>

25

<150> 61/503.489

<151> 30-06-2011

30

<150> 61/492.338

<151> 01-06-2011

<150> 61/487.527

<151> 18-05-2011

35

<150> 61/420.703

<151> 07-12-2010

<150> 61/390.995

<151> 07-10-2010

40

<150> 61/389.922

<151> 05-10-2010

<150> 61/378.911

<151> 31-08-2010

45

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

50

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

ES 2 641 916 T3

<220>  
 <221> Fuente  
 <223> /Observación= "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

5 <400> 1

**Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His**  
**1 5 10**

10 <210> 2  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <221> Fuente  
 <223> /Observación= "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 2

**Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe**  
**1 5 10 15**

20 **Lys Asp**

<210> 3  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <221> Fuente  
 <223> /Observación= "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

30 <400> 3

**Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr**  
**1 5 10**

35 <210> 4  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <221> Fuente  
 <223> /Observación= "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

45 <400> 4

**Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu**  
**1 5 10 15**

**Ala**

50 <210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

# ES 2 641 916 T3

<220>  
<221> Fuente  
<223> /Observación= "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"  
5  
<400> 5  
  
**Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser**  
**1 5**

10 <210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<221> Fuente  
<223> /Observación= "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"  
  
<400> 6  
20  
**Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr**  
**1 5**

25 <210> 7  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<221> Fuente  
<223> /Observación= "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"  
  
<400> 7

ES 2 641 916 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe  
 50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 8  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <221> Fuente  
 <223> /Observación= "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly



ES 2 641 916 T3

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val  
 130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 210 215 220

<210> 10  
 <211> 222  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 641 916 T3

<220>  
 <221> Fuente  
 <223> /Observación= "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

5 <400> 10

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val  
 130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 210 215 220

10 <210> 11



ES 2 641 916 T3

50						55						60			
Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Thr	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Val	Thr	Pro	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
		115					120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
	130					135					140				
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150					155					160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
		195					200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
	210					215					220				
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
225					230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245					250					255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275					280					285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
	290					295					300				

ES 2 641 916 T3

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435 440 445

Lys

<210> 12

<211> 220

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

10 <223> /Observación= "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr  
20 25 30

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
35 40 45

ES 2 641 916 T3

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215 220

<210> 13

<211> 227

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

10 <223> /Observación= "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 13

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
20 25 30

ES 2 641 916 T3

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220

Pro Gly Lys  
 225

## REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar a un paciente con cáncer que es (a) susceptible a, o (b) menos susceptible a, responder al tratamiento con un antagonista de c-met, que comprende la etapa de determinar si el cáncer del paciente tiene (a) una cantidad alta o (b) una cantidad baja de biomarcador c-met, en donde la expresión del biomarcador c-met indica que el paciente es (a) susceptible a responder al tratamiento con el antagonista de c-met o (b) menos susceptible a responder al tratamiento con el antagonista de c-met, en el que la expresión de la proteína de biomarcador c-met se determina en una muestra de cáncer obtenida del paciente utilizando inmunohistoquímica (IHQ) y (a) una expresión alta de biomarcador c-met es (i) el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción moderada de c-met o una intensidad de tinción moderada/fuerte combinada de c-met pero menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción fuerte (puntuación IHQ de 2), o (ii) el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción fuerte de c-met (puntuación IHQ de 3) y (b) una expresión baja de biomarcador c-met es (i) una tinción negativa de c-met, menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción baja o baja y moderada combinada de c-met (puntuación IHQ de 0) o (ii) el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción baja o baja y moderada combinada de c-met pero menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción moderada o moderada y fuerte combinada de c-met (puntuación IHQ de 1), en el que la intensidad de tinción de la expresión de c-met se determina con respecto a la intensidad de tinción de c-met de gránulos de células de control, y, en el que un control para la intensidad de tinción moderada de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular A549; un control para la intensidad de tinción fuerte de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular H441; un control para la intensidad de tinción negativa de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular H1155; y un control para la intensidad de tinción baja de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular HEK-293.
2. Un método para determinar el pronóstico de un paciente con cáncer, que comprende la etapa de determinar si el cáncer del paciente tiene una cantidad alta de biomarcador c-met, en el que la expresión de biomarcador c-met indica que el paciente es susceptible a tener un aumento de la supervivencia global (SG) y/o de la supervivencia sin progresión (SSP) cuando el paciente es tratado con un antagonista de c-met, en donde la expresión de la proteína de biomarcador c-met se determina en una muestra de cáncer obtenida del paciente utilizando inmunohistoquímica (IHQ) y una expresión alta de biomarcador c-met es (i) el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción moderada de c-met o una intensidad de tinción moderada/fuerte combinada de c-met pero menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción fuerte (puntuación IHQ de 2), o (ii) el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción fuerte de c-met (puntuación IHQ de 3), en el que la intensidad de tinción de la expresión de c-met se determina con respecto a la intensidad de tinción de c-met de gránulos de células de control, y en el que un control para la intensidad de tinción moderada de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular A549; un control para la intensidad de tinción fuerte de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular H441; un control para la intensidad de tinción negativa de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular H1155; y un control para la intensidad de tinción baja de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular HEK-293.
3. Un método para seleccionar un tratamiento para un paciente, que comprende determinar la expresión de un biomarcador c-met en una muestra de cáncer obtenida del paciente y seleccionar un medicamento para el cáncer basándose en el nivel de expresión del biomarcador, en donde se selecciona al paciente para el tratamiento con (i) un antagonista de c-met si la muestra de cáncer expresa el biomarcador a un nivel alto, o (ii) un medicamento para el cáncer distinto de un antagonista de c-met si la muestra de cáncer expresa el biomarcador a un nivel bajo o sustancialmente indetectable, en el que la expresión de la proteína del biomarcador c-met se determina en una muestra de cáncer del paciente utilizando inmunohistoquímica (IHQ) y (a) una expresión alta de biomarcador c-met es (i) el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción moderada de c-met o una intensidad de tinción moderada/fuerte combinada de c-met pero menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción fuerte (puntuación IHQ de 2), o (ii) el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción fuerte de c-met (puntuación IHQ de 3) y (b) una expresión baja de biomarcador c-met es (i) una tinción negativa de c-met, menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción débil o débil y moderada combinada de c-met (puntuación IHQ de 0) o (ii) el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción débil o débil y moderada combinada de c-met pero menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción moderada o moderada y fuerte combinada de c-met (puntuación IHQ de 1), en el que la intensidad de tinción de la expresión de c-met se determina con respecto a la intensidad de tinción de c-met de gránulos de células de control, y en el que un control para la intensidad de tinción moderada de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular A549; un control para la intensidad de tinción fuerte de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular H441; un control para la intensidad de tinción negativa de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular H1155; y un control para la intensidad de tinción débil de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular HEK-293.

4. Un método para determinar la expresión del biomarcador c-met, que comprende la etapa de determinar la expresión de la proteína de biomarcador c-met en una muestra de cáncer obtenida de un paciente utilizando inmunohistoquímica (IHQ) con un anticuerpo anti-c-met, que comprende determinar (a) el porcentaje de células tumorales en la muestra con una intensidad de tinción negativa de c-met, (b) el porcentaje de células tumorales en la muestra con una intensidad de tinción débil de c-met, (c) el porcentaje de células tumorales en la muestra con una intensidad de tinción moderada de c-met y (d) el porcentaje de células tumorales en la muestra con una intensidad de tinción fuerte de c-met, en donde la expresión del biomarcador c-met tiene una puntuación IHQ de 0 cuando la muestra tiene una tinción negativa de c-met, o menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción débil o débil y moderada combinada de c-met; una puntuación IHQ de 1 cuando la muestra tiene el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción débil o débil y moderada combinadas de c-met pero menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción moderada o moderada y fuerte combinadas de c-met; una puntuación IHQ de 2 cuando la muestra tiene el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción moderada o moderada y fuerte combinada de c-met pero menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción fuerte; y una puntuación IHQ de 3 cuando la muestra tiene el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción fuerte de c-met;
- 5 en el que la intensidad de tinción de la expresión de c-met se determina con respecto a la intensidad de tinción de c-met de gránulos de células de control, y
- 10 en el que un control para la intensidad de tinción moderada de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular A549; un control para la intensidad de tinción fuerte de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular H441; un control para la intensidad de tinción negativa de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular H1155; y un control para la intensidad de tinción débil de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular HEK-293.
- 15
5. El método de la reivindicación 4, en el que la expresión del biomarcador c-met con una puntuación IHQ de 2 o 3 indica que el paciente es susceptible a responder al tratamiento con un antagonista de c-met.
- 25
6. El método de las reivindicaciones 4 o 5, que comprende la etapa de determinar si un cáncer del paciente tiene un nivel alto de biomarcador c-met, en el que una expresión alta de biomarcador c-met es (i) el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción moderada de c-met o una intensidad de tinción moderada y fuerte combinada de c-met pero menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción fuerte (puntuación IHQ de 2) o (ii) el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción fuerte de c-met (puntuación IHQ de 3), en donde la expresión de c-met se detecta utilizando el anticuerpo c-met, en donde la expresión del biomarcador c-met indica que el paciente es susceptible a tener un aumento de la SG y/o de la SSP cuando el paciente es tratado con un antagonista de c-met.
- 30
- 35
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el control para la intensidad de tinción moderada de c-met es la línea celular A549; el control para la intensidad de tinción fuerte de c-met es la línea celular H441; el control para la intensidad de tinción negativa de c-met es la línea celular H1155; y el control para la intensidad de tinción débil de c-met es la línea celular HEK-293.
- 40
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 6, en el que el paciente tiene una SSP y/o una SG superior con respecto a un paciente que no tiene un biomarcador c-met alto.
- 45
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra se obtiene (i) antes del tratamiento con un antagonista de c-met, (ii) antes del tratamiento con un medicamento para el cáncer o (iii) después de que el cáncer haya metastatizado.
- 50
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la muestra se fija a la formalina y se incluye en parafina.
- 55
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la IHQ de c-met se realiza utilizando el anticuerpo anti-c-met SP44.
- 60
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el cáncer es cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de células renales, cáncer pancreático, carcinoma gástrico, cáncer de vejiga, cáncer esofágico, mesotelioma, melanoma, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, osteosarcoma, cáncer de próstata o glioblastoma.
- 65
13. El método de la reivindicación 12, en el que el cáncer es cáncer de pulmón no microcítico (CPNM).
14. El método de la reivindicación 13, en el que el CPNM es: cáncer de pulmón no microcítico de segunda línea o de tercera línea localmente avanzado o metastásico, adenocarcinoma o carcinoma de células escamosas.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 5-14, en el que el antagonista de c-met es un anticuerpo antagonista anti-c-met.

16. El método de la reivindicación 15, en el que el anticuerpo anti-c-met:

(i) comprende (a) una HVR1 que comprende la secuencia GYTFTSYWLH (SEQ ID NO: 1); (b) una HVR2 que comprende la secuencia GMIDPSNSDTRFNPFDK (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR3-HC que comprende la secuencia ATYRSYVTPLDY (SEQ ID NO: 3); (d) una HVR1-LC que comprende la secuencia KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR2-LC que comprende la secuencia WASTRES (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR3-LC que comprende la secuencia QQYYAYPWT (SEQ ID NO: 6); o

(ii) es monovalente y comprende (a) un primer polipéptido que comprende una cadena pesada, comprendiendo dicho polipéptido la secuencia:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNSDTR  
 FNPFDKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGTLVTVSSA  
 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGL  
 YLSVSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSV  
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ  
 VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV  
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11);

(b) un segundo polipéptido que comprende una cadena ligera, comprendiendo el polipéptido la secuencia

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPKAPKLLIYWASTRE  
 SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI  
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSL  
 TLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12);

y un tercer polipéptido que comprende una secuencia Fc, comprendiendo el polipéptido la secuencia

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG  
 DSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 13),

en donde el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera están presentes como un complejo y forman un solo brazo de unión a antígeno, en donde el primer y el segundo polipéptidos Fc están presentes en un complejo y forman una región Fc que aumenta la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula de Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno.

17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 5-15, en el que el antagonista de c-met es uno o más de crizotinib, tivantinib, carbozantinib, MGCD-265, ficlatuzumab, TAK-701 humanizado, rilotumumab, foretinib, h224G11, DN-30, MK-2461, E7050, MK-8033, PF-4217903, AMG208, JNJ-38877605, EMD1204831, INC-280, LY-2801653, SGX-126, RP1040, LY2875358, BAY-853474 y/o LA480.

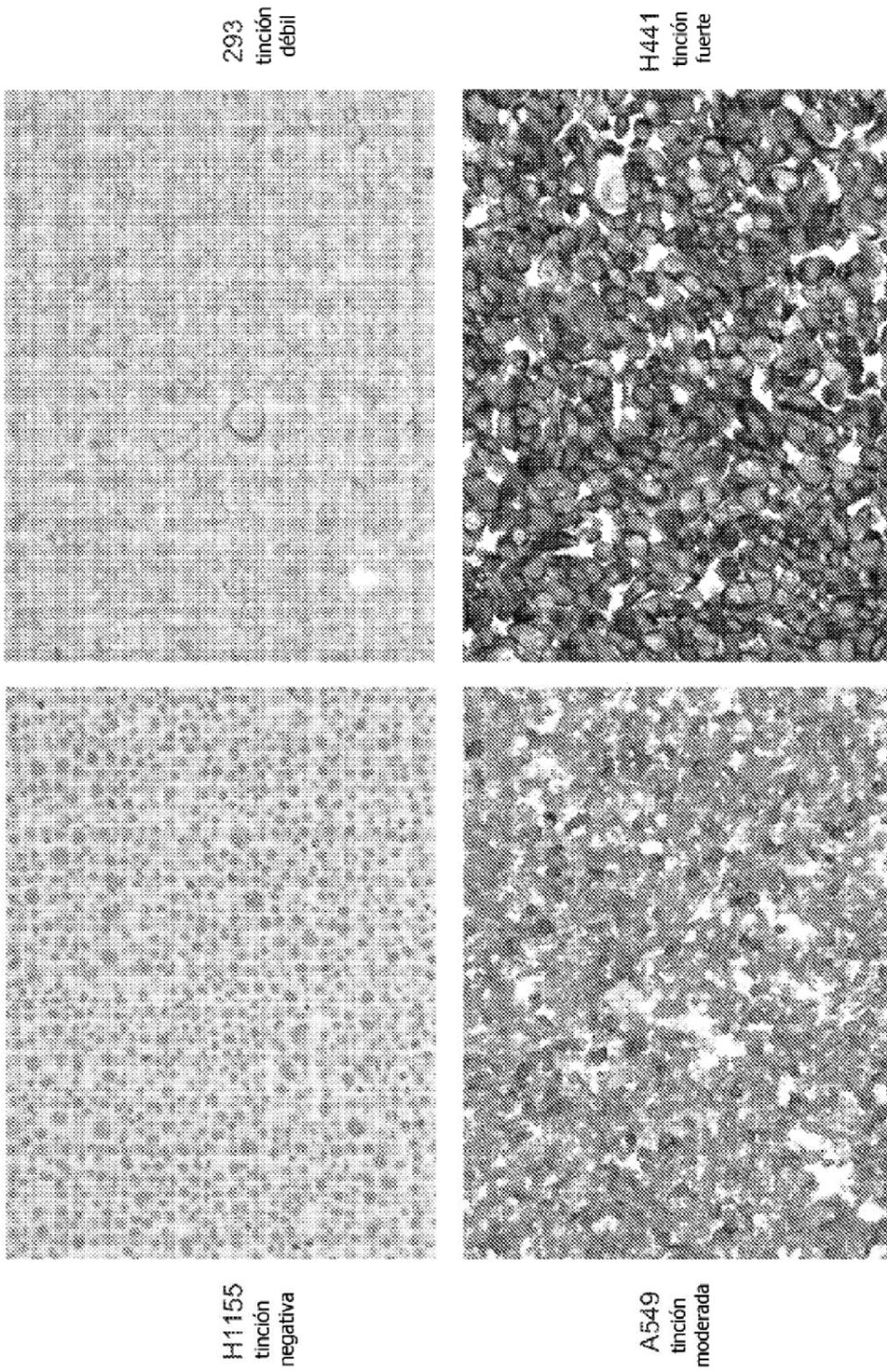
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 5-17, en el que el tratamiento es en combinación con un tratamiento con un antagonista de EGFR.

19. El método de la reivindicación 18, en el que el antagonista de EGFR es erlotinib.

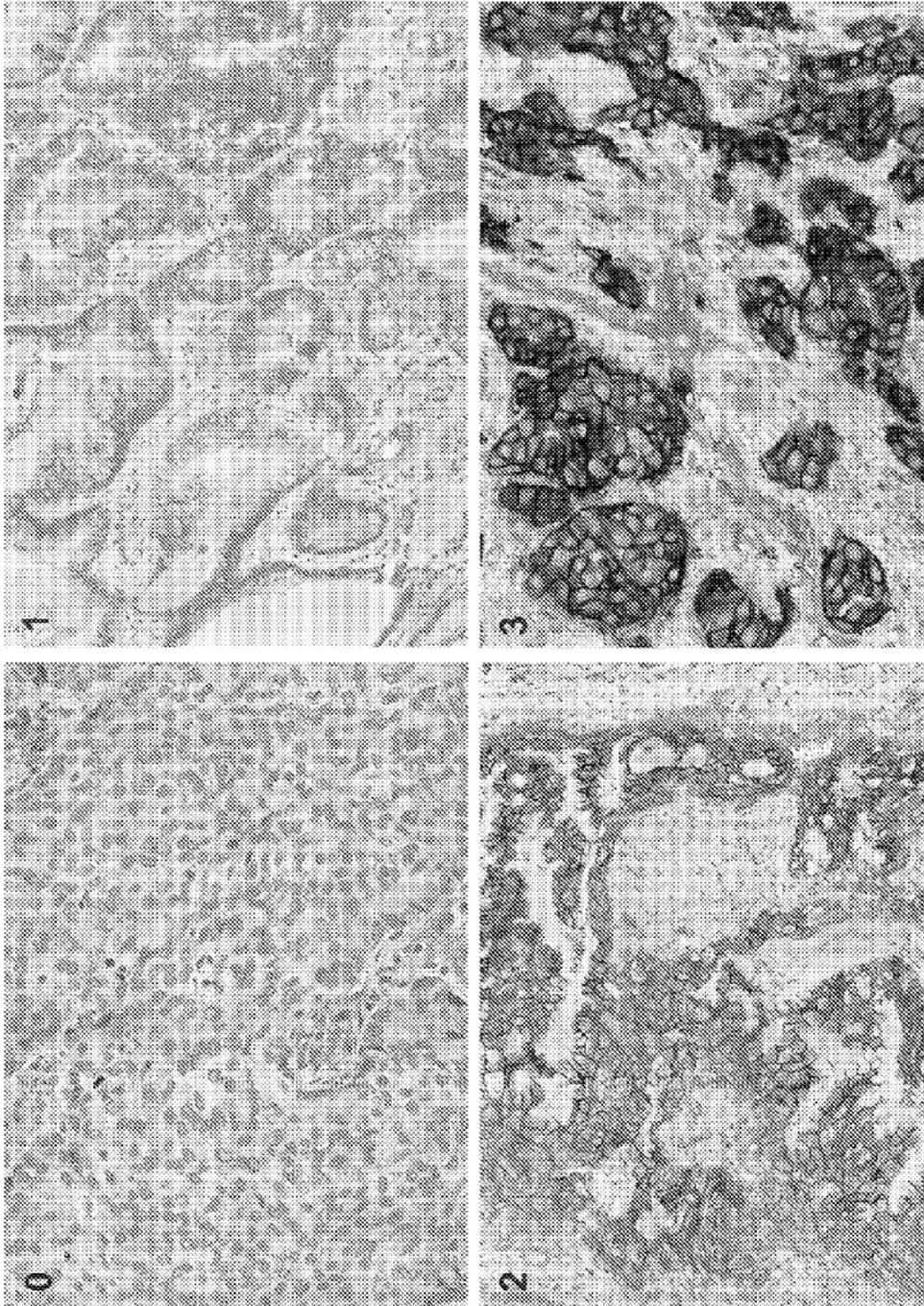
20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 5-17, en el que el antagonista de c-met es onartuzumab y el tratamiento comprende adicionalmente un tratamiento con erlotinib, o el antagonista de c-met es crizotinib, tivantinib, carbozantinib, MGCD-265, ficlatuzumab, TAK-701 humanizado o foretinib, y el tratamiento comprende adicionalmente un tratamiento con erlotinib.

21. Un antagonista de c-met para su uso en un método de tratamiento de un paciente con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) donde se ha encontrado que el cáncer del paciente tiene una cantidad alta de un biomarcador c-

- met, en donde la expresión de la proteína del biomarcador c-met se determina en una muestra de cáncer obtenida del paciente utilizando inmunohistoquímica (IHQ) y una expresión alta del biomarcador de c-met es (i) el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción moderada de c-met o una intensidad de tinción moderada/fuerte combinada de c-met pero menos del 50 % de las células tumorales con intensidad de tinción fuerte (puntuación IHQ de 2) o (ii) el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción fuerte de c-met (puntuación IHQ de 3),
- 5 en donde la intensidad de tinción de la expresión de c-met se determina con respecto a la intensidad de tinción de c-met de gránulos de células de control, y
- 10 en donde un control para la intensidad de tinción moderada de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular A549; un control para la intensidad de tinción fuerte de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular H441; un control para la intensidad de tinción negativa de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular H1155; y un control para la intensidad de tinción débil de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular HEK-293.
- 15 22. El antagonista de c-met para el uso de la reivindicación 21, en donde el antagonista de c-met es (i) un anticuerpo anti-c-met, o (ii) es onartuzumab.
23. El antagonista de c-met para el uso de las reivindicaciones 21 o 22, en donde el paciente presenta una SSP y/o una SG superior con respecto a un paciente que no presenta un biomarcador de c-met elevado.
- 20 24. El antagonista de c-met para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en donde el control para la intensidad de tinción moderada de c-met es la línea celular A549; el control para la intensidad de tinción fuerte de c-met es la línea celular H441; el control para la intensidad de tinción negativa de c-met es la línea celular H1155; y el control para la intensidad de tinción débil de c-met es la línea celular HEK-293.
- 25 25. El antagonista de c-met para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en donde el CPNM es un cáncer de pulmón no microcítico de segunda línea o de tercera línea localmente avanzado o metastásico, un adenocarcinoma o un carcinoma de células escamosas.
- 30 26. El antagonista de c-met para el uso de las reivindicaciones 21 o 22, en donde el paciente es tratado con una combinación de anticuerpo anti-c-met y un antagonista de EGFR.
27. El antagonista de c-met para el uso de la reivindicación 26, en donde el antagonista de EGFR es erlotinib.
- 35 28. El antagonista de c-met para el uso de la reivindicación 27, en donde el paciente es tratado con (a) onartuzumab a una dosis de aproximadamente 15 mg/kg cada tres semanas; y (b) erlotinib (N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina) a una dosis de aproximadamente 150 mg, todos los días de un ciclo de tres semanas.
- 40 29. Uso de un kit de diagnóstico que comprende uno o más reactivos para determinar la expresión de un biomarcador c-met en una muestra de un paciente con CPNM e instrucciones para utilizar el kit **caracterizado por que** la utilización del kit es para seleccionar (a) un antagonista de c-met para tratar al paciente con CPNM si se determina una cantidad alta de biomarcador c-met o (b) un medicamento para el cáncer distinto de un antagonista de c-met para tratar al paciente con CPNM si se determina una cantidad baja o sustancialmente indetectable de biomarcador c-met, en donde la expresión de la proteína del biomarcador c-met se determina en una muestra de
- 45 cáncer del paciente utilizando inmunohistoquímica (IHQ) y (a) una expresión alta de biomarcador c-met es (i) el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción moderada de c-met o una intensidad de tinción moderada/fuerte combinada de c-met pero menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción fuerte (puntuación IHQ de 2), o (ii) el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción fuerte de c-met (puntuación IHQ de 3), y (b) una expresión baja de biomarcador c-met es (i) una tinción negativa de c-met, menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción baja o baja y moderada combinada de c-met (puntuación IHQ de 0), o (ii) el 50 % o más de las células tumorales con una intensidad de tinción baja o baja y moderada combinada de c-met pero menos del 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción moderada o moderada y fuerte combinada de c-met (puntuación IHQ de 1),
- 50 en donde la intensidad de tinción de la expresión de c-met se determina con respecto a la intensidad de tinción de c-met de gránulos de células de control, y
- 55 en donde un control para la intensidad de tinción moderada de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular A549; un control para la intensidad de tinción fuerte de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular H441; un control para la intensidad de tinción negativa de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular H1155; y un control para la intensidad de tinción débil de c-met tiene la intensidad de tinción de c-met de la línea celular HEK-293.
- 60



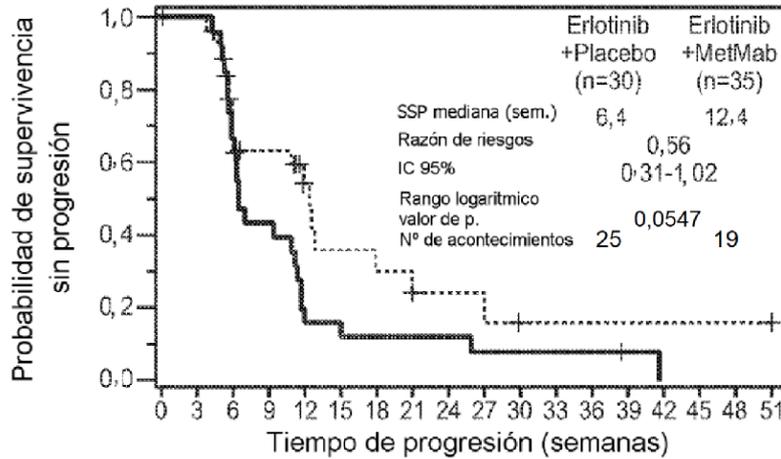
**FIG. 1**



**FIG. 2**

**Análisis de pacientes con Met Alto\***

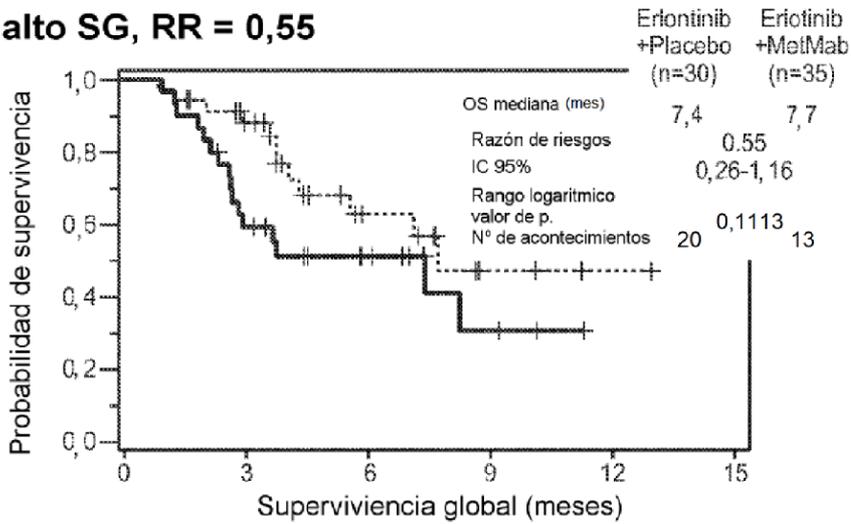
**SSP, RR = 0,56**



Número en riesgo:

	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51
Erlotinib+Placebo	30	18	5	3	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erlotinib+MetMab	35	22	9	5	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**Met alto SG, RR = 0,55**



Número en riesgo:

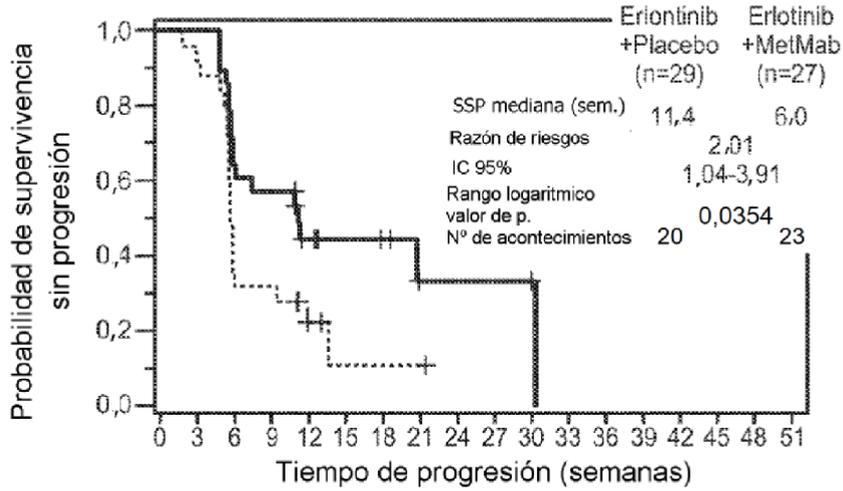
	0	3	6	9	12	15
Erlotinib+Placebo	30	17	9	3	0	0
Erlotinib+MetMab	35	26	10	3	1	0

12/23 pacientes del grupo tratado con erlotinib + placebo que se cruzaron con MetMab fueron Met alto

\* Met alto = el 80% o más de las células tumorales con una intensidad de tinción de 2+ o 3+

**FIG. 3**

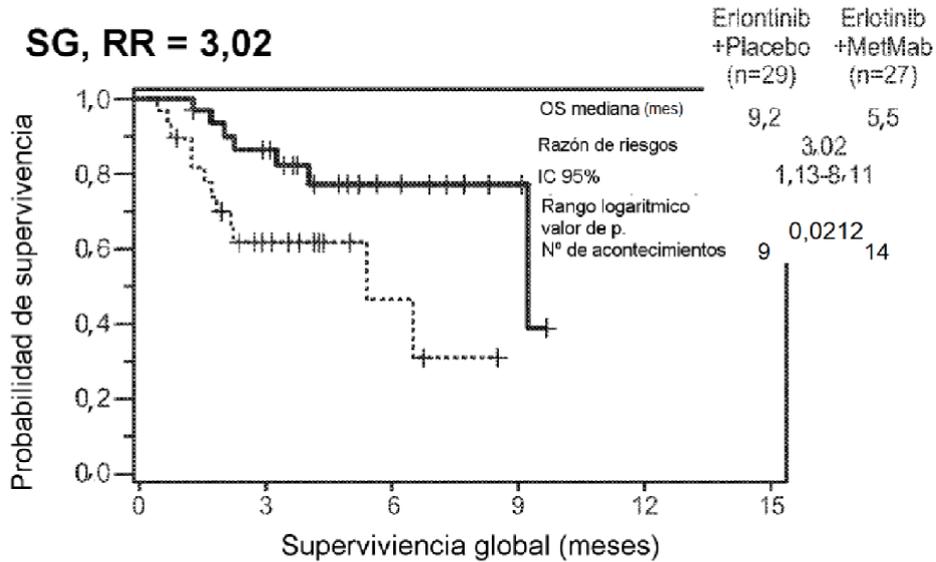
**Análisis de pacientes con Met bajo**  
**SPP, RR = 2,01**



Número en riesgo:

Erlotinib+Placebo	29	22	9	6	2	2	0	0	0
Erlotinib+MetMab	27	15	5	1	0	0	0	0	0

**SG, RR = 3,02**



Número en riesgo:

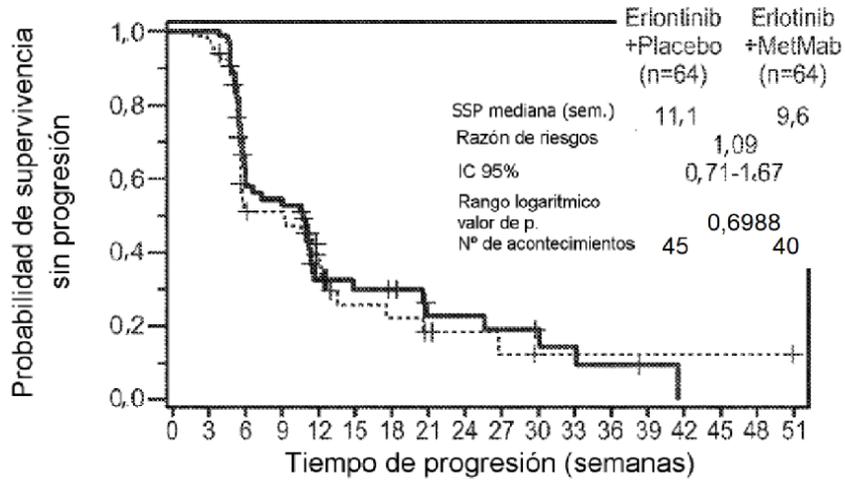
Erlotinib+Placebo	29	23	9	3	0	0
Erlotinib+MetMab	27	12	3	0	0	0

10/23 pacientes del grupo tratado con erlotinib + placebo que se cruzaron con MetMab fueron Met bajo

**FIG. 4**

**Análisis de todos los pacientes**

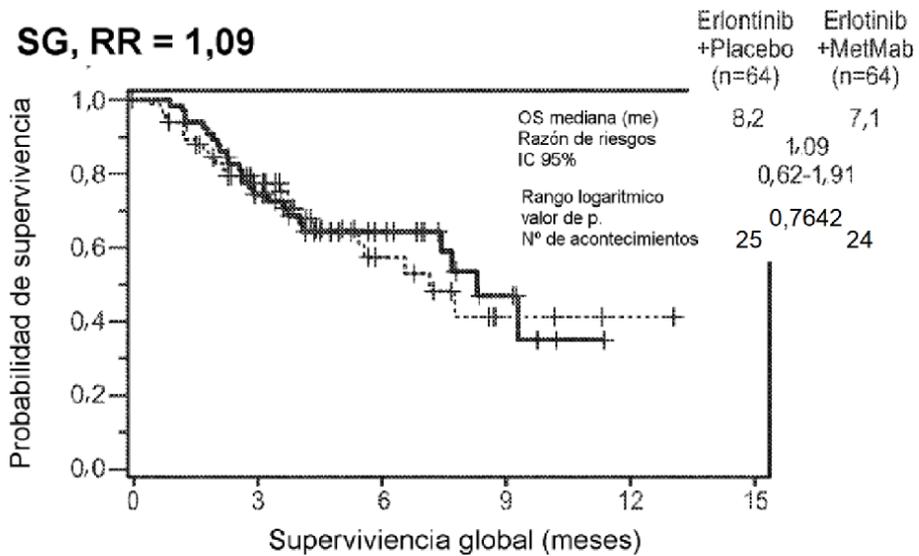
**SSP, RR = 1,09**



Número en riesgo:

Erlotinib+Placebo	64	44	17	11	6	5	2	0	0
Erlotinib+MetMab	64	39	14	6	3	1	1	1	1

**SG, RR = 1,09**



Número en riesgo:

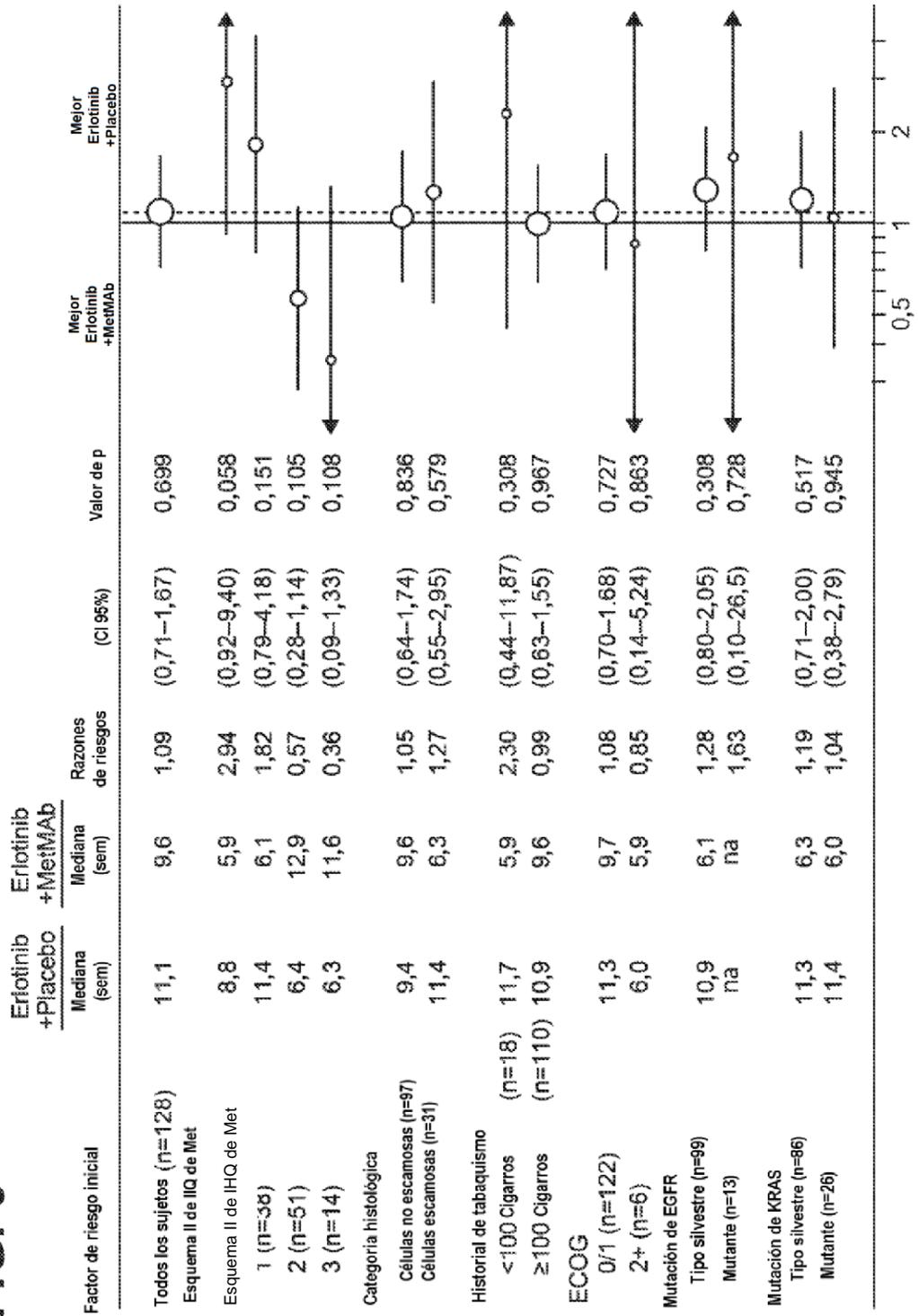
Erlotinib+Placebo	64	44	20	6	0	0
Erlotinib+MetMab	64	38	13	3	1	0

23 pacientes del grupo tratado con erlotinib + placebo se cruzaron con MetMab

**FIG. 5**

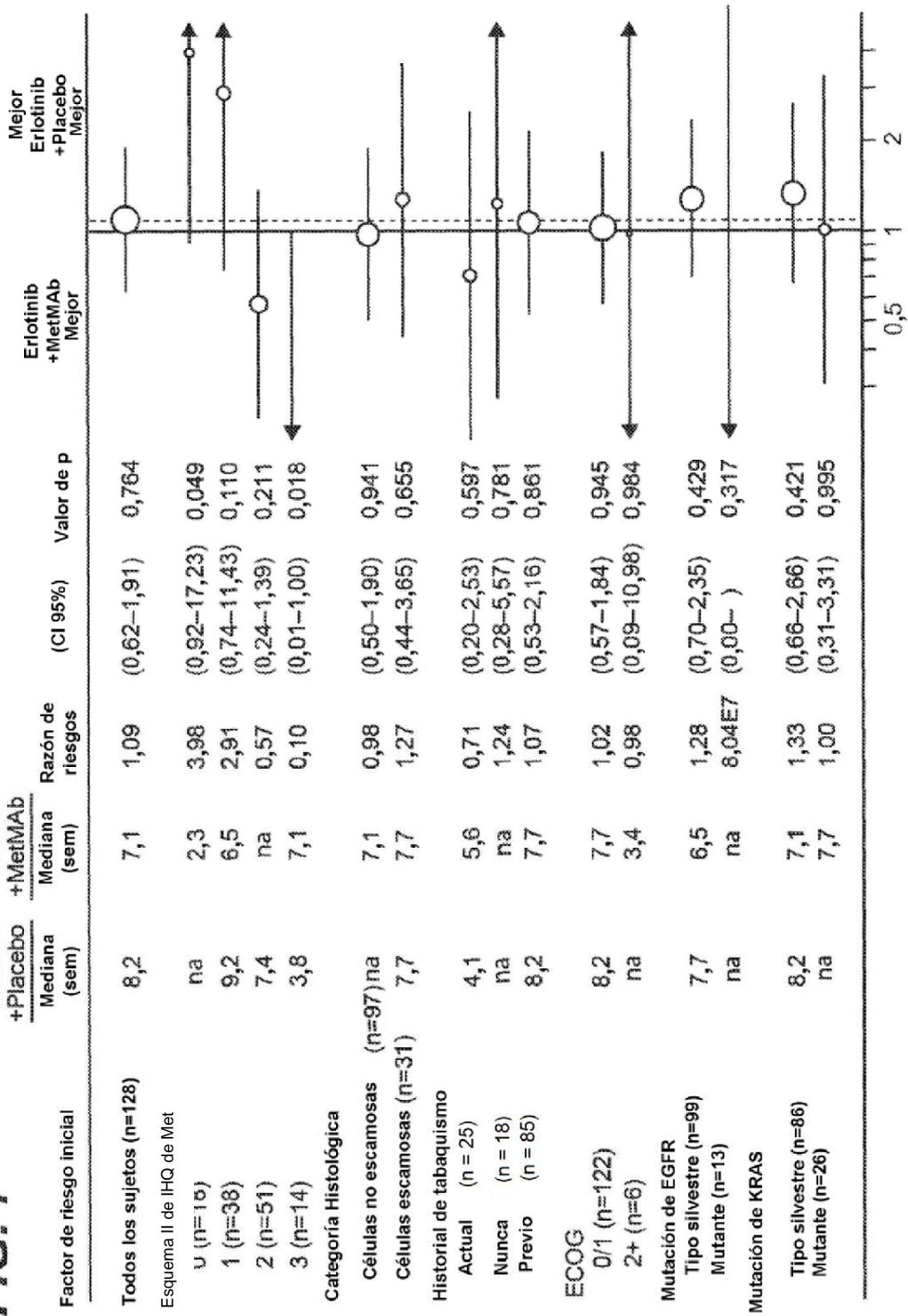
**SSP por subgrupos (población global)**

**FIG. 6**



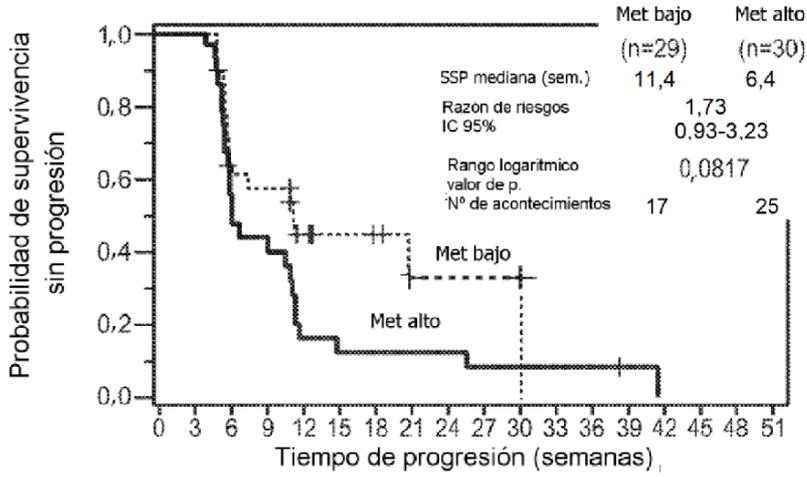
**FIG. 7**

**SG por subgrupos**

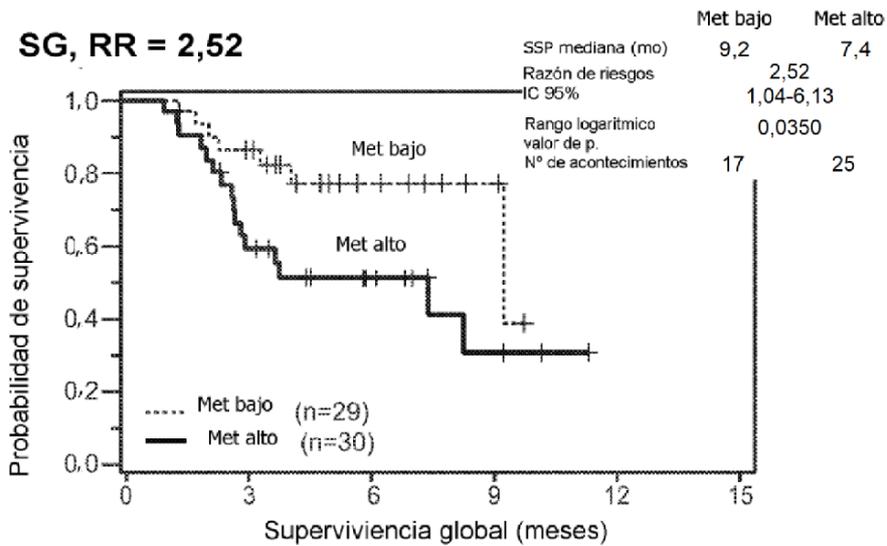


**Análisis de pacientes tratados con placebo**

**SSP, RR = 1,73**



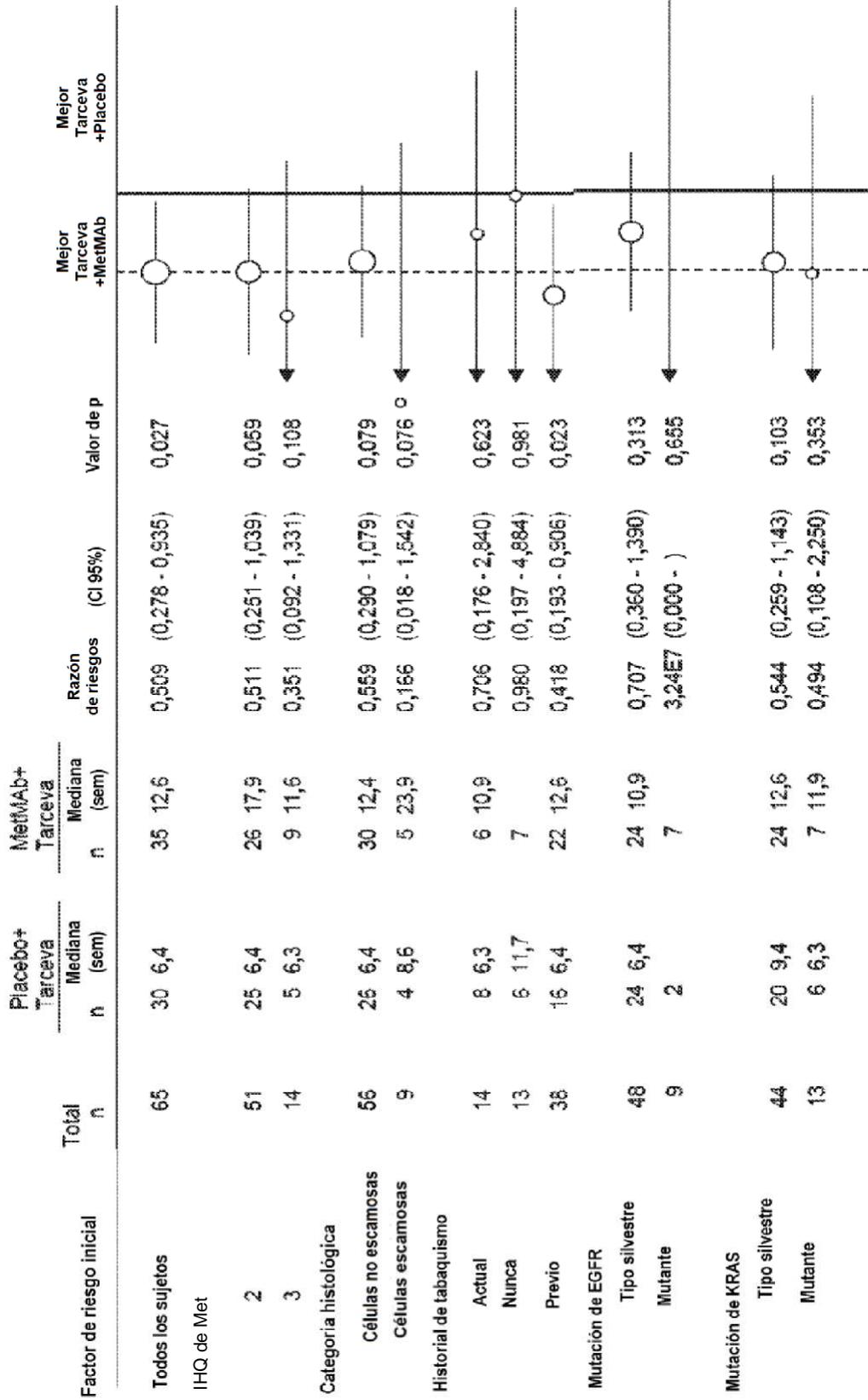
**SG, RR = 2,52**



**Definición de Met alto:**  $\geq 50\%$  de las células tumorales con una intensidad de tinción de 2\* o 3\*

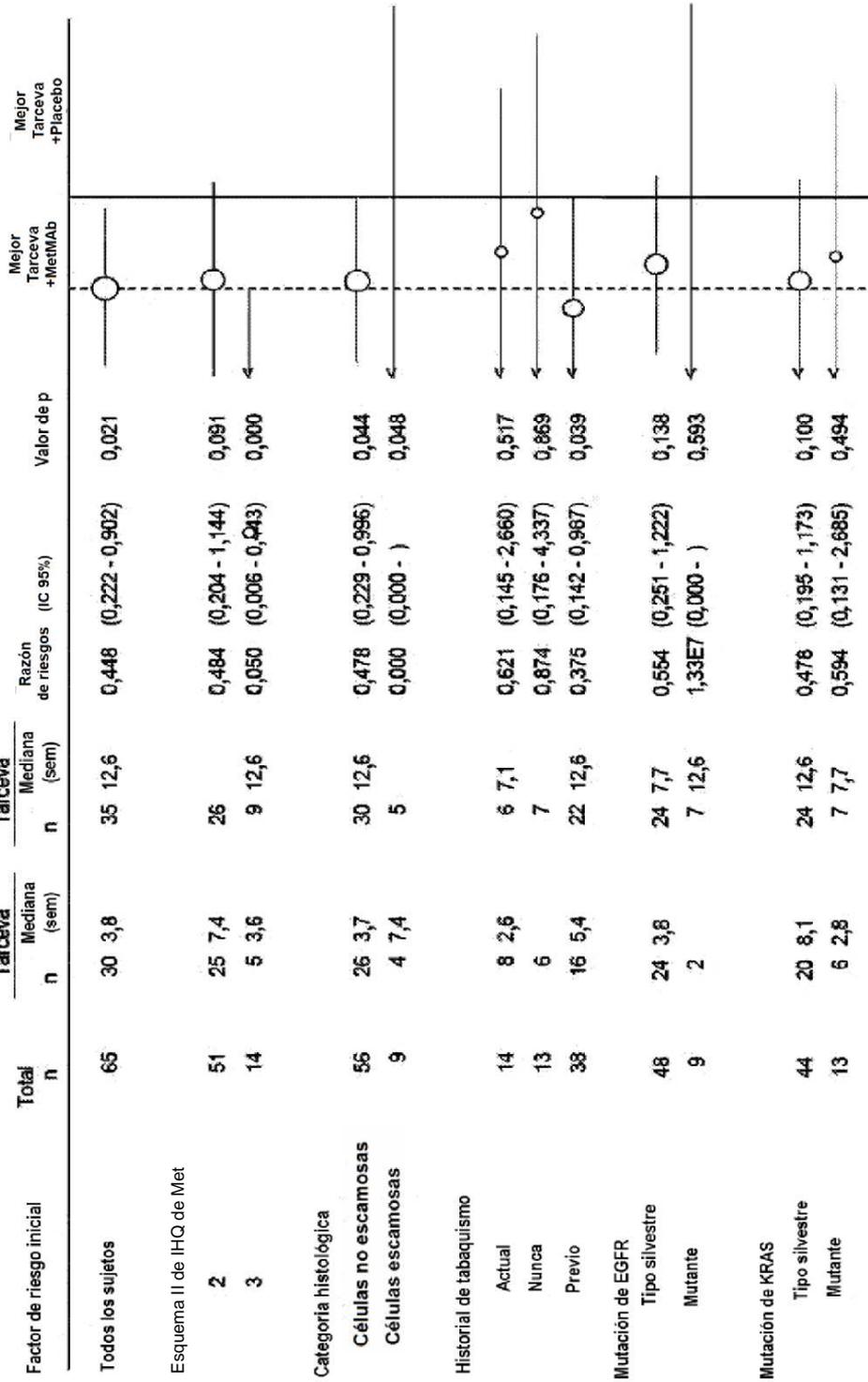
**FIG. 8**

**FIG. 9** Análisis por subgrupos de SSP en pacientes con Met alto



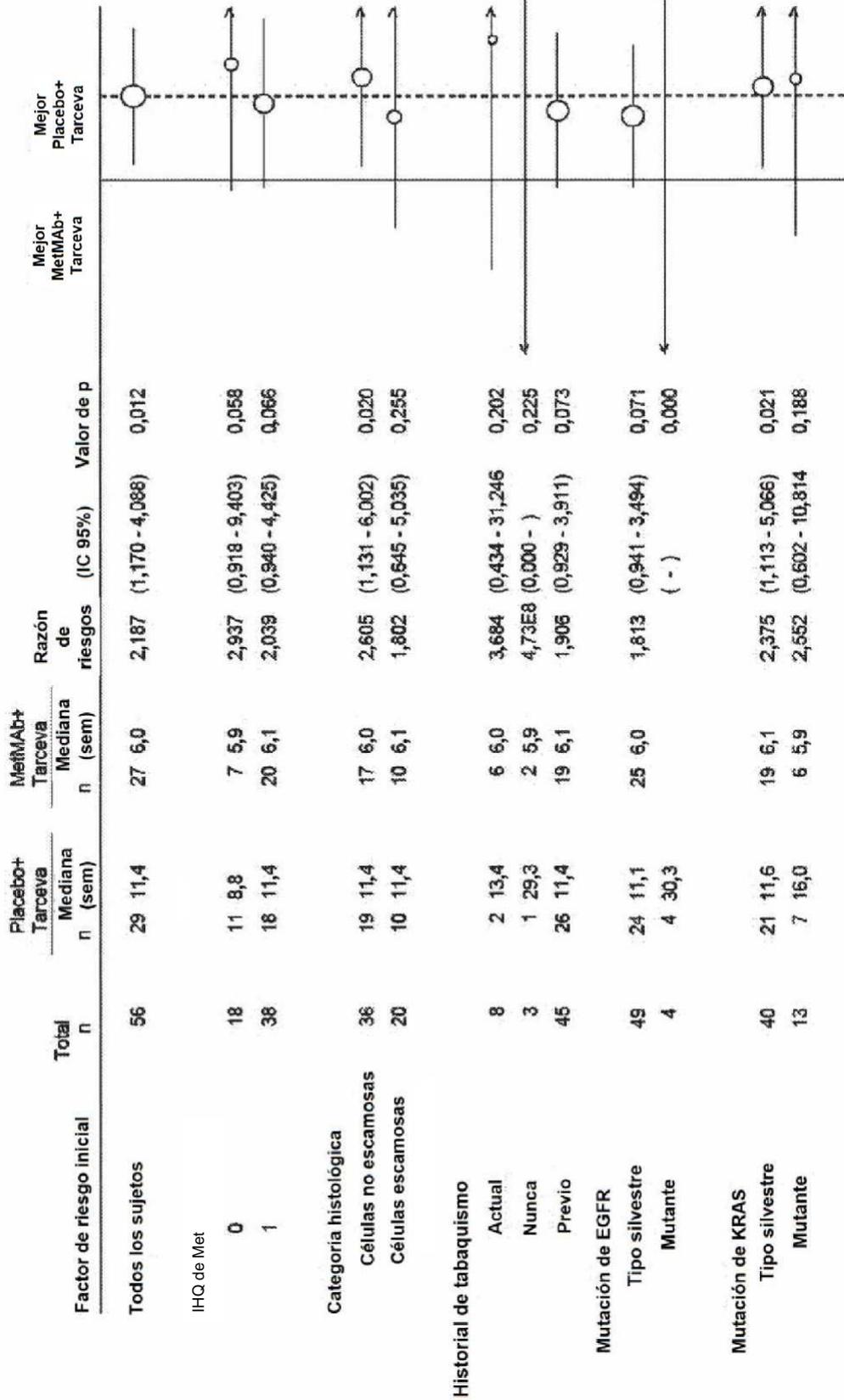
**Análisis por subgrupo de SG en pacientes con Met alto**

**FIG. 10**



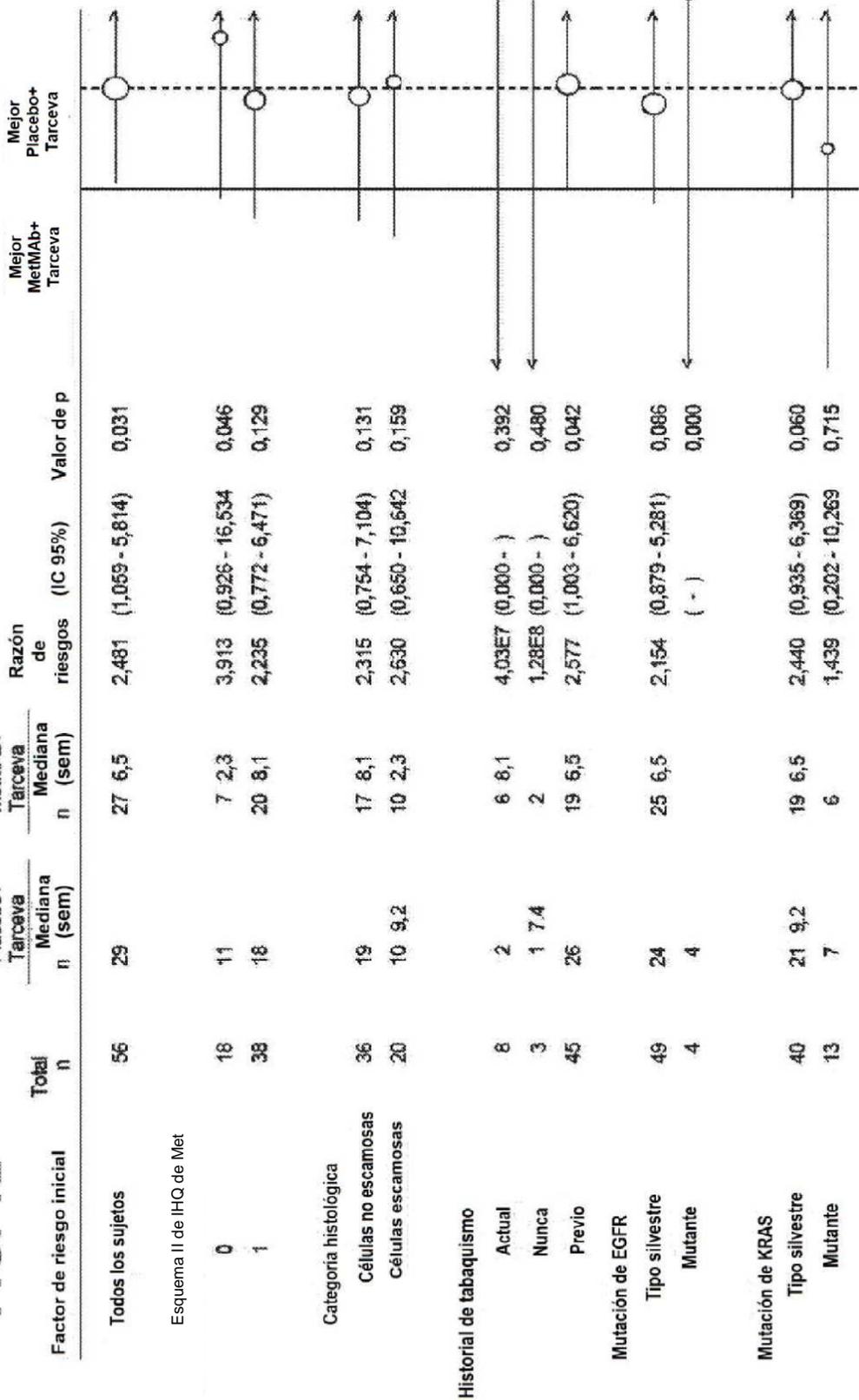
Análisis por subgrupo de SSP en pacientes con Met bajo

FIG. 11

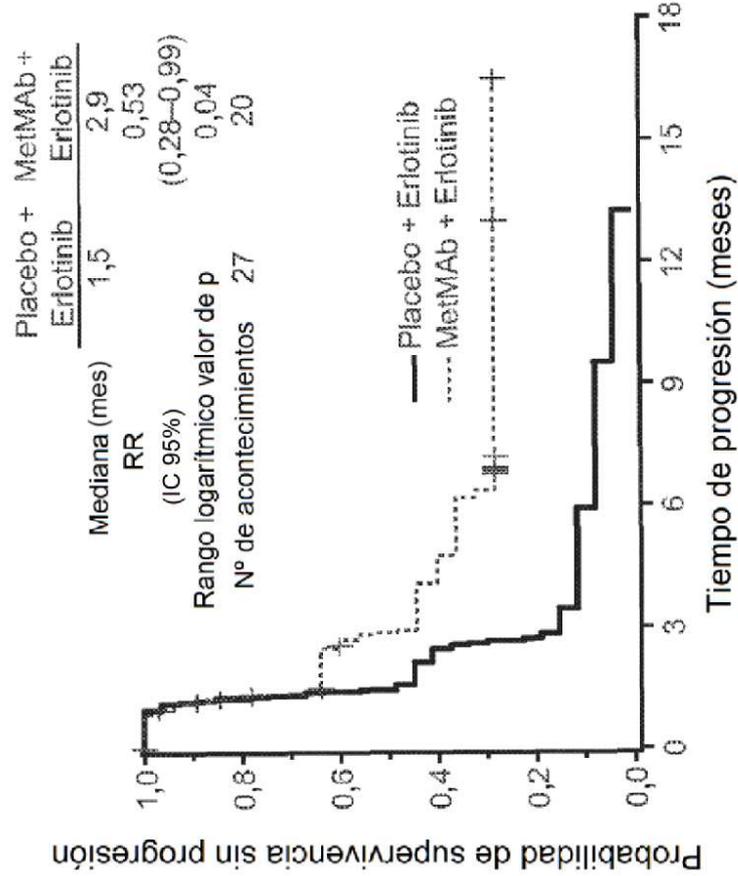


Análisis por subgrupo de SG en pacientes con Met bajo

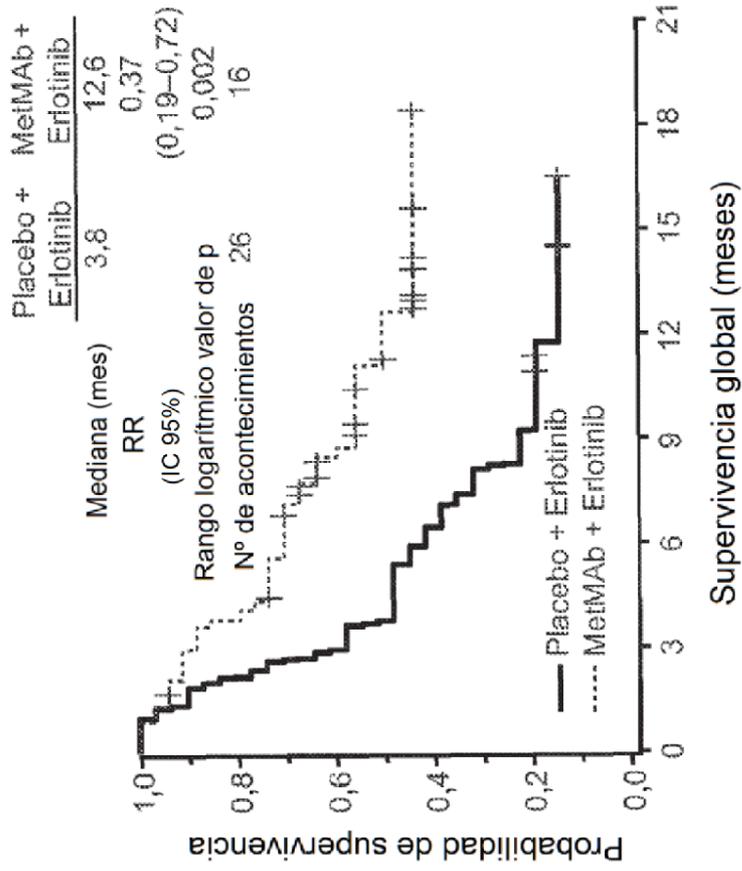
FIG. 12



**SSP : RR= 0,53**



**SG : RR= 0,37**

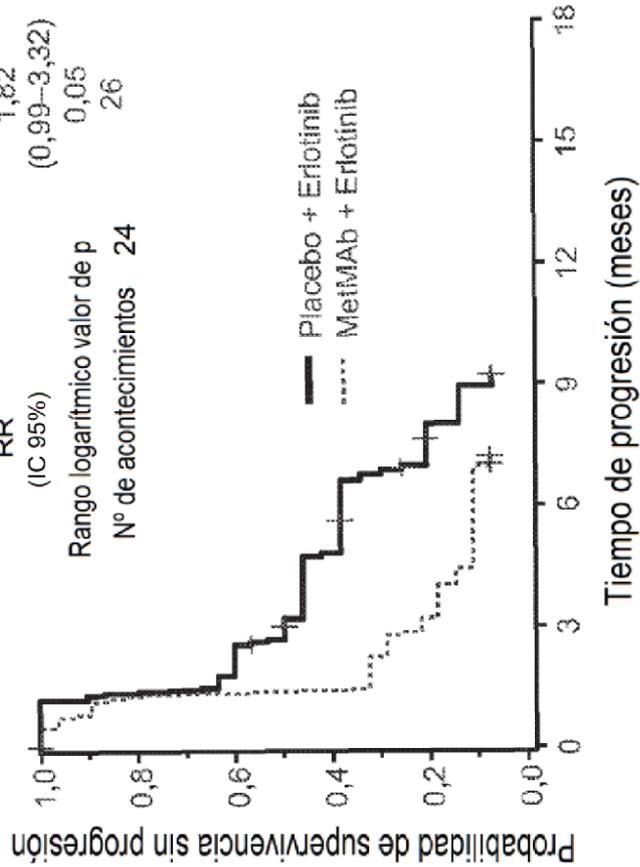


**FIG. 13**

**SSP : RR = 1,82**

Placebo + Erlotinib	2,7	Mediana (mes)
MetMab + Erlotinib	1,4	RR

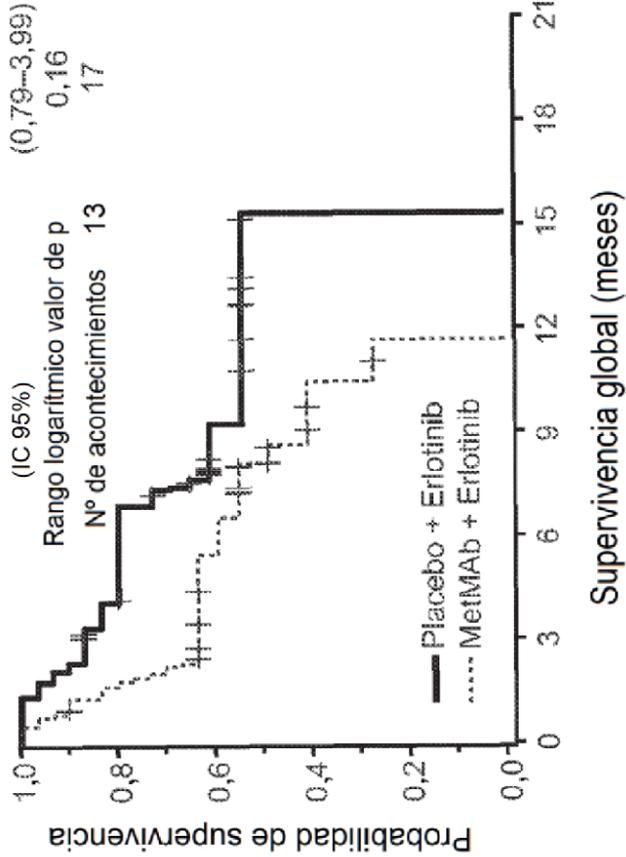
Rango logarítmico valor de p (0,99-3,32)  
 N° de acontecimientos 24



**SG : RR = 1,78**

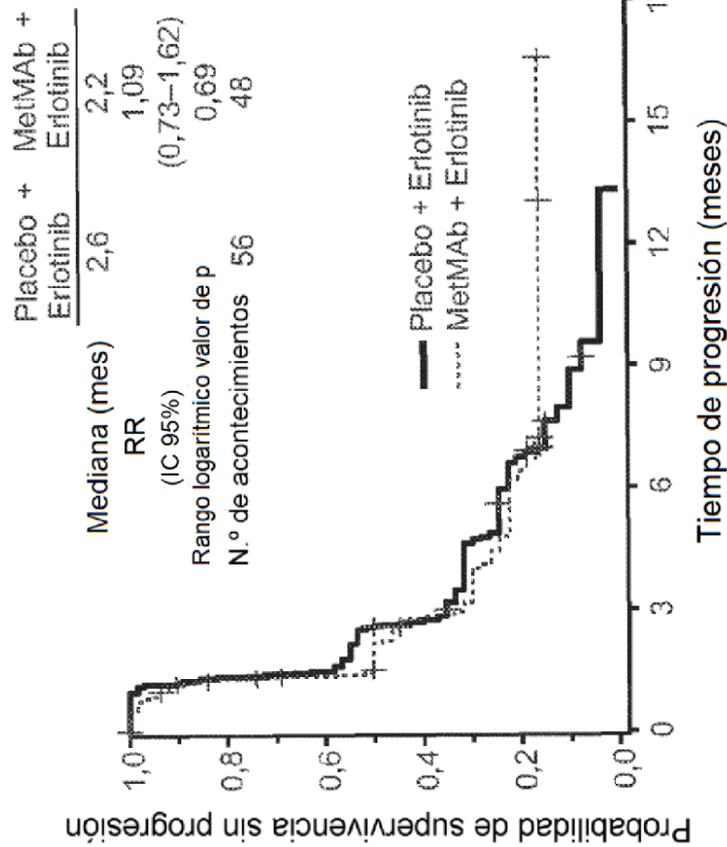
Placebo + Erlotinib	15,3	Mediana (mes)
MetMab + Erlotinib	8,1	RR

Rango logarítmico valor de p (0,79-3,99)  
 N° de acontecimientos 13

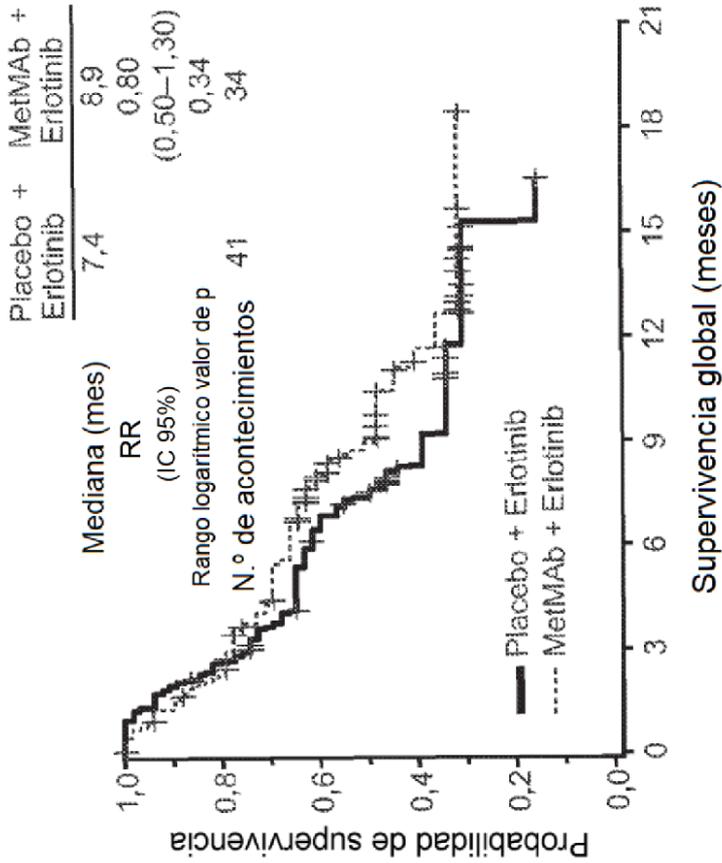


**FIG. 14**

**SSP: RR=1,09**

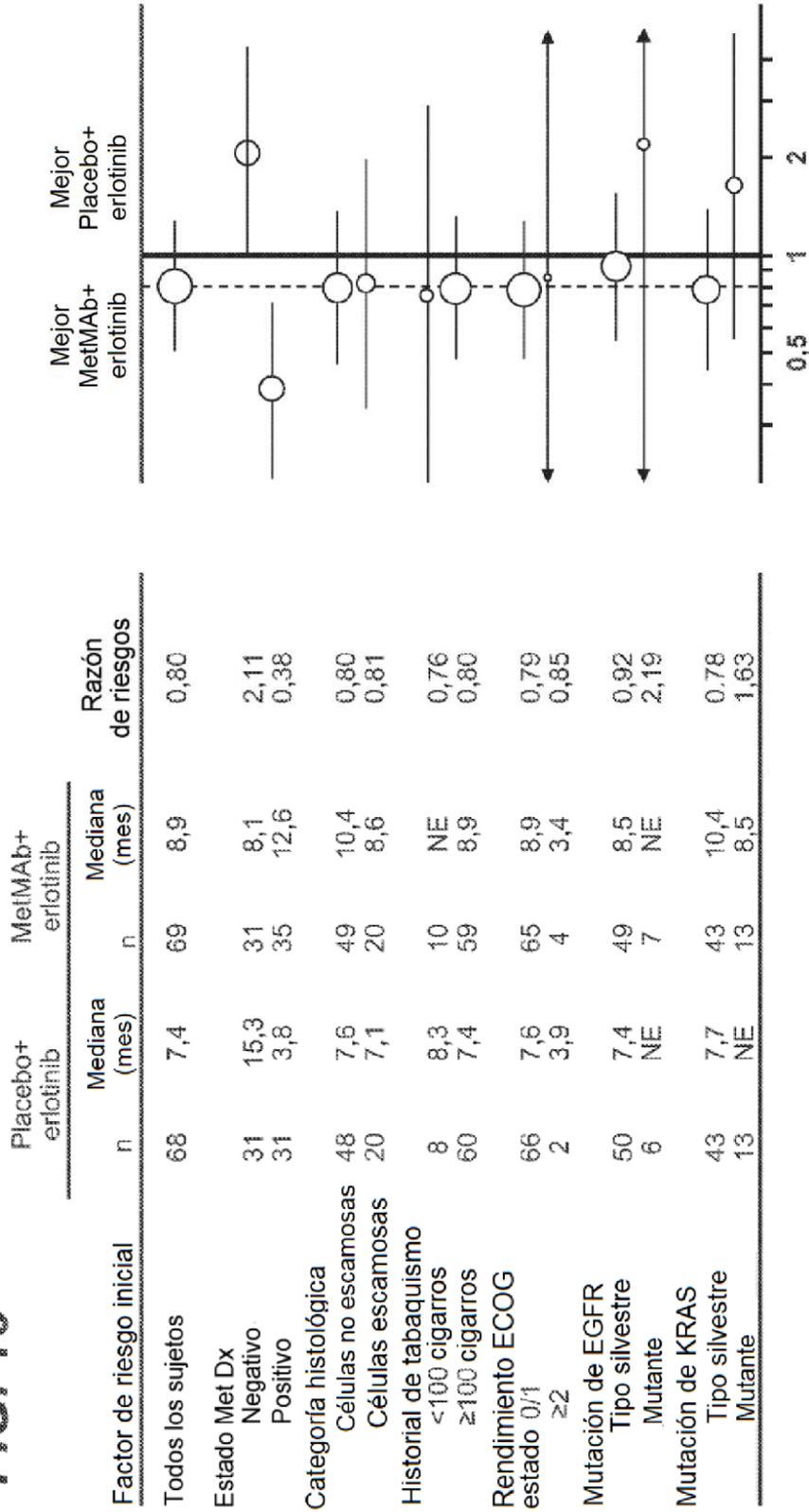


**SG: RR=0,8**



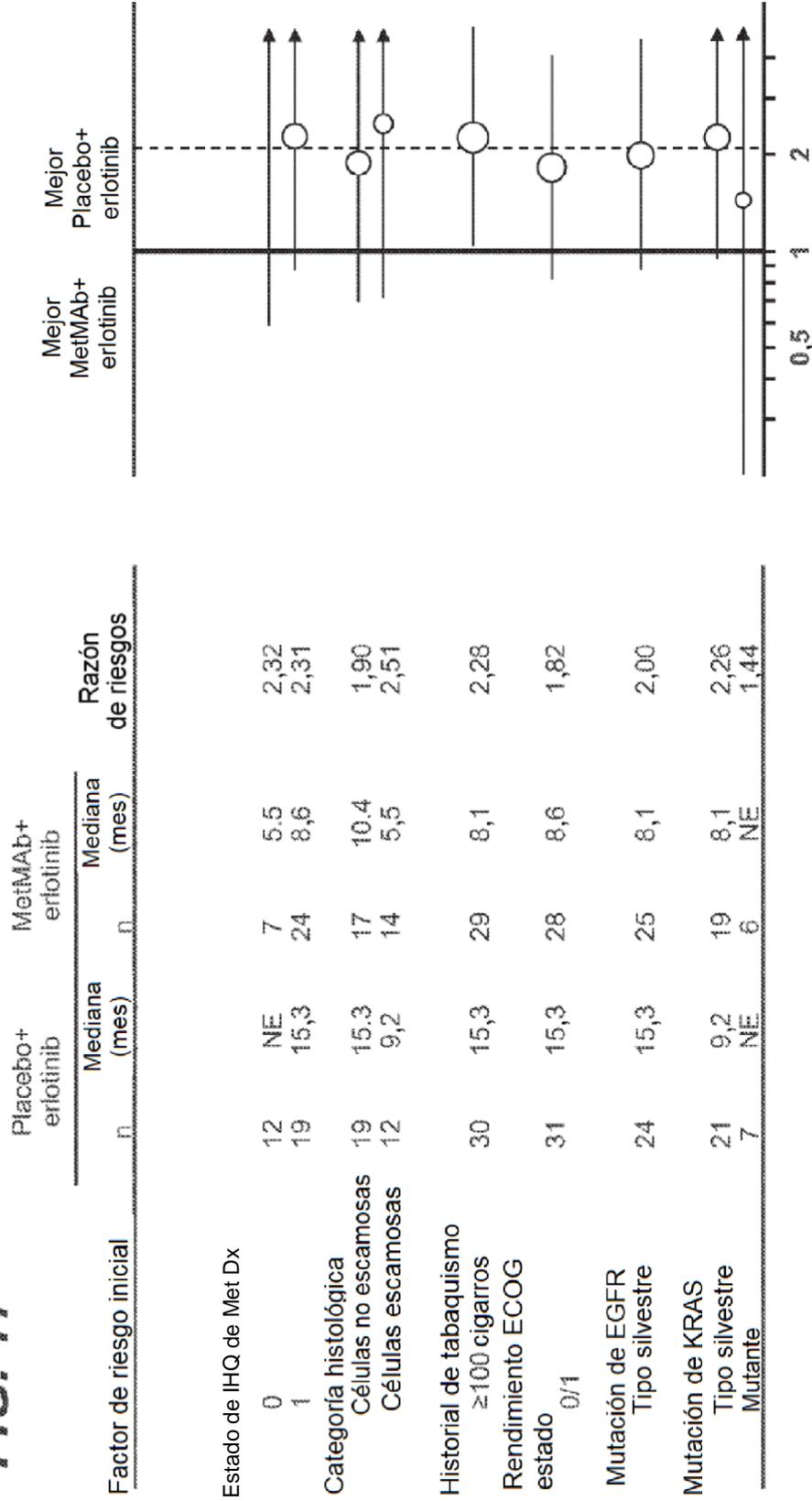
**FIG. 15**

**FIG. 16**

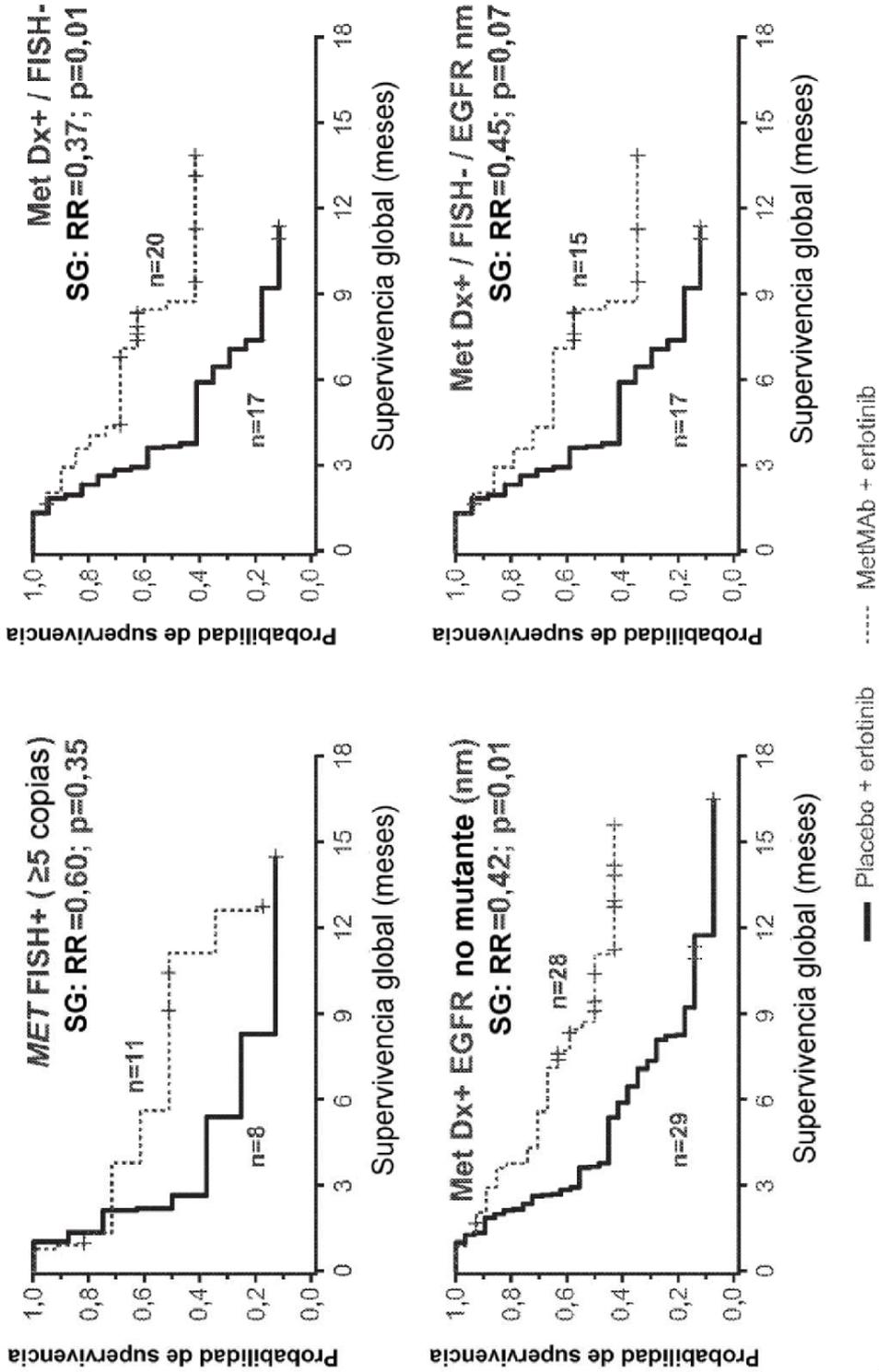


La supervivencia global mediana se estimó a partir de curvas de Kaplan-Meier  
 La relación de riesgos en relación con placebo + erlotinib se estimó por regresión de Cox. Se muestra la razón de riesgos no estratificada  
 NE: No evaluable

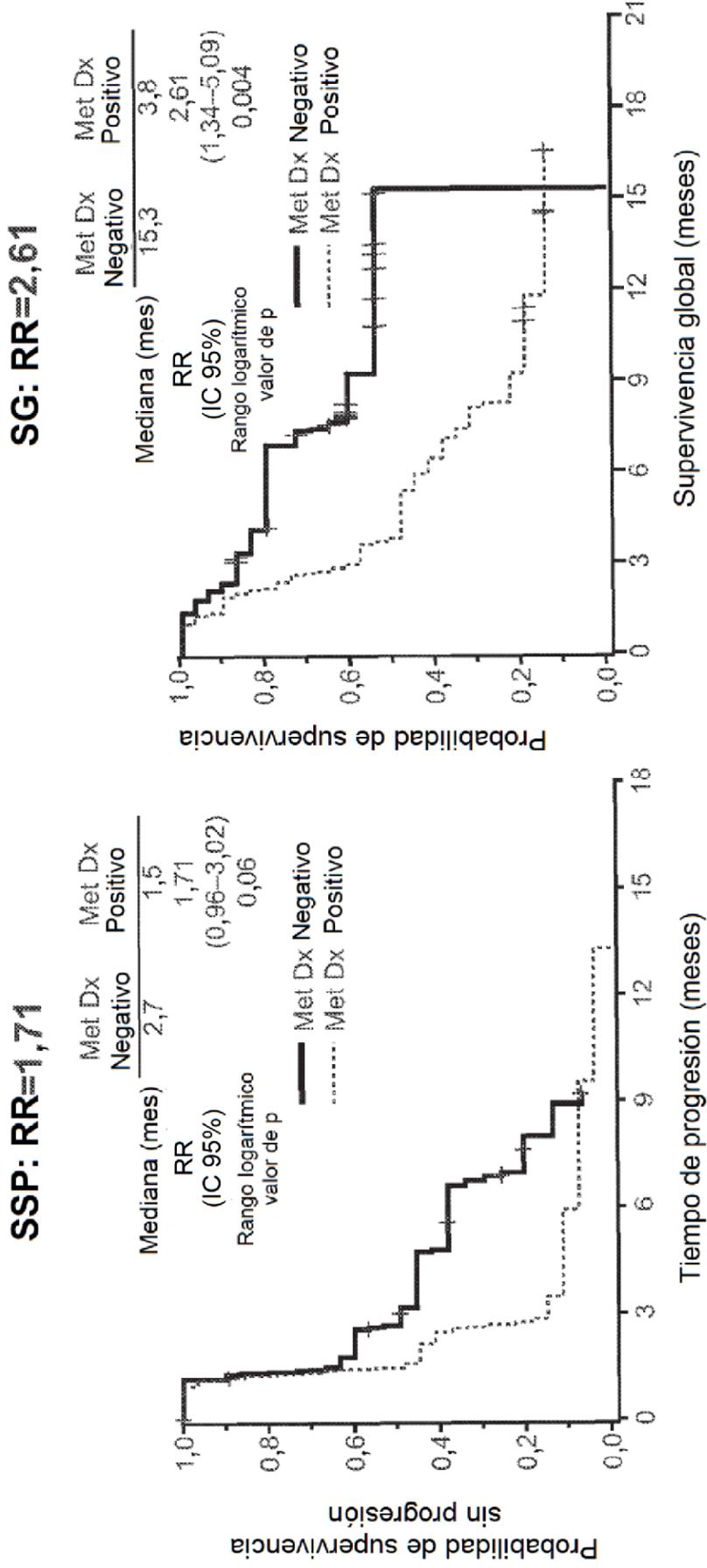
**FIG. 17**



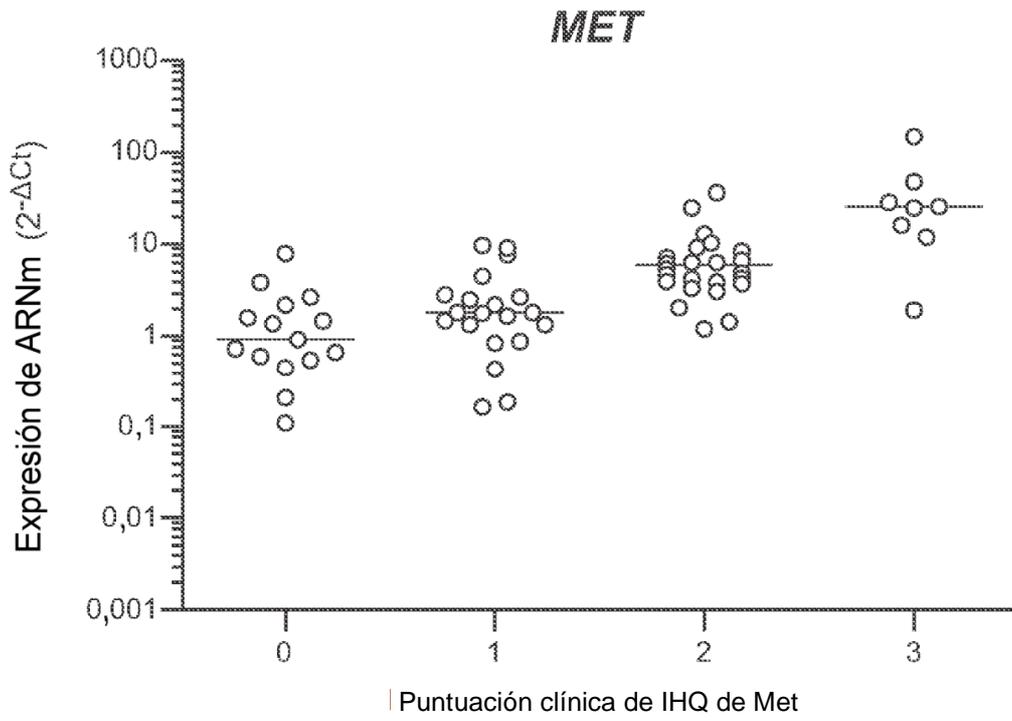
La supervivencia global mediana se estimó a partir de curvas de Kaplan-Meier  
 La relación de riesgos en relación con placebo + erlotinib se estimó por regresión de Cox. Se muestra la relación de riesgos no estratificada  
 NE: No evaluable



**FIG. 18**



**FIG. 19**



***FIG. 20***

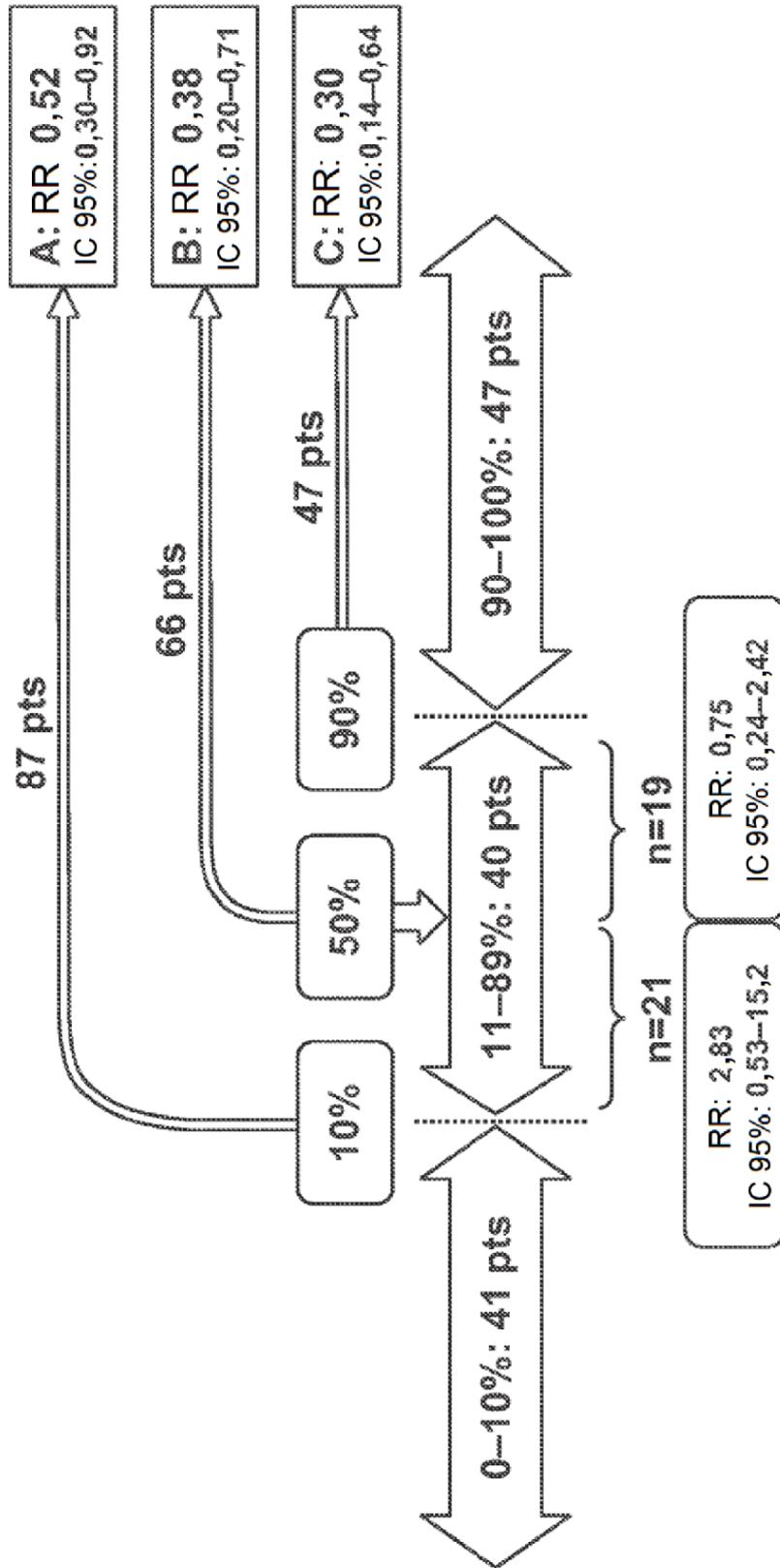


FIG. 21