

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 783**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2014 PCT/GB2014/052994**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015 WO15049537**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2014 E 14781645 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 3052647**

54 Título: **Biomarcadores de cáncer y usos de los mismos**

30 Prioridad:

04.10.2013 GB 201317622

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

29.10.2018

73 Titular/es:

**F-STAR BIOTECHNOLOGY LTD. (50.0%)
Eddeva B920 Babraham Research Campus
Cambridge, Cambridgeshire CB22 3AT, GB y
F-STAR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNGS-
UND ENTWICKLUNGSGES.M.B.H (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEUNG, KINMEI;
SUN, HAIJUN;
BATEY, SARAH y
ROWLAND, ROBERT**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 687 783 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 de cáncer y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de número de copias de genes (GCN, *gene copy number*) del Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (HER2) y a niveles de ARNm de HER2 como biomarcadores. De forma específica, la presente invención se refiere al uso de número de copias del gen HER2 y a niveles de ARNm de HER2 como biomarcadores para identificar cánceres que responderán al tratamiento con un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio constante, por ejemplo el dominio CH3, del miembro de unión específica, y miembros de unión específica que compiten con tal miembro de unión para su unión a HER2. La presente invención también se refiere a miembros de unión específica que comprenden un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

20 El Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (también denominado HER2, HER2/neu o ErbB-2) es un receptor transmembrana citoplasmático de tirosina quinasa de 185 kDa. Está codificado por el gen *c-erbB-2* localizado en el brazo largo del cromosoma 17q y es un miembro de la familia HER (Ross *et al.*, 2003). La familia HER normalmente regula el crecimiento y la supervivencia celular, así como adhesión, migración, diferenciación, y otras respuestas celulares (Hudis, C, 2007). La sobreexpresión y amplificación de HER2 se observa en el desarrollo de diversos cánceres sólidos que incluyen cánceres de mama (Yarden, Y, 2001), gástrico (Gravalos *et al.*, 2008), estómago (Rüschoff *et al.*, 2010), colorrectal (Ochs *et al.*, 2004), ovarios (Lanitis *et al.*, 2012), pancreático (Lei *et al.*, 1995), endometrio (Berchuk *et al.*, 1991) y de pulmón no microcítico (Brabender *et al.*, 2001).

Los cánceres de mama, colorrectal, y gástrico representan un 30 % de todos los casos de cáncer diagnosticados y un 24 % de todas las muertes por cáncer en 2008 (Informe Mundial sobre Cáncer de CRUK y OMS). El cáncer de mama, en particular, es una causa principal de muerte entre las mujeres. HER2 se sobreexpresa o amplifica en un 15 % a un 30 % de los cánceres de mama y se asocia con un mal pronóstico, periodos más cortos sin enfermedad y supervivencia global, así como un fenotipo de cáncer más agresivo (Vinatzer *et al.*, 2005). En el cáncer de mama, aproximadamente un 20 % de los pacientes desarrollaron tumores que albergan una alteración genómica que implica la amplificación de un amplicón en el cromosoma 17 que contiene el proto-oncogén de HER2 (Ross, J, 2009; y Hicks *et al.*, 2005). Tales tumores representan a subtipo más agresivo de cáncer de mama que contribuyen en mayor medida a la mortalidad de la enfermedad (Hudis C, 2007).

Un número de terapias que se dirigen a HER2 se han aprobado para tratamiento de tumores positivos para HER2.

40 Herceptin™ (trastuzumab) está aprobado para el tratamiento de cáncer de mama metastásico en combinación con Taxol™ (paclitaxel) y solo para el tratamiento de cáncer de mama positivo para HER2 en pacientes que han recibido uno o más ciclos de quimioterapia para enfermedad metastásica. Dado que el trastuzumab también aumenta la eficacia de la quimioterapia adyuvante (paclitaxel, docetaxel y vinorelbina) en tumores positivos para HER2 que se pueden operar o que están localmente avanzados, se considera patrón de protocolo para pacientes con estadios iniciales o avanzados de cáncer de mama que sobreexpresa HER2. El Trastuzumab también se ha aprobado para tratamiento de cáncer metastásico positivo para HER2 del cáncer de estómago o de la unión gastroesofágica, en combinación con quimioterapia (cisplatino y cualquiera de capecitabina o 5-fluorouracilo) en pacientes que no han recibido tratamiento anterior para su enfermedad metastásica (Genentech, About Herceptin. [en línea] Disponible en: <http://www.herceptin.com/about> [entrada el 17 de septiembre de 2013]).

Perjeta™ (pertuzumab) también se ha probado para el tratamiento de cáncer de mama metastásico positivo para HER2 en combinación con trastuzumab y docetaxel (Genentech, PERJETA Can Help Strengthen Your Treatment. [en línea] Disponible en: <http://www.perjeta.com/patient/about> [entrada el 17 de septiembre de 2013]). El pertuzumab se dirige a un dominio diferente de HER2 y tiene un mecanismo de acción diferente al del trastuzumab. De forma específica, el pertuzumab es un inhibidor de la dimerización de HER2, que evita que HER2 se empareje con otros receptores de HER (EGFR/HER1, HER3 y HER4). Kadcyla™ (ado-trastuzumab emtansina, T-DM1) es un conjugado de anticuerpo-fármaco, que comprende trastuzumab unido al agente citotóxico mertansina (DM1), que interrumpe el ensamblaje de microtúbulos en células en división dando como resultado la muerte celular, y está aprobado para el tratamiento de cáncer de mama metastásico en pacientes que han recibido tratamiento anterior con trastuzumab y una quimioterapia con taxano (Genentech, Cómo se Cree que Funciona Kadcyla™ (ado-trastuzumab emtansina) (Mecanismo de Acción Propuesto). [en línea] Disponible en: <http://www.gene.com/media/product-information/kadcyla-moa> [entrada el 17 de septiembre de 2013]).

65 Tykerb™ (lapatinib) es un inhibidor de quinasa de molécula pequeña que bloquea la acción catalítica tanto de HER2 como de EGFR. Se ha probado en combinación con Femara™ (letrozol) para el tratamiento de cáncer de mama

metastásico, positivo para receptor hormonal, positivo para HER2 en mujeres postmenopáusicas, y en combinación con Xeloda™ (capecitabina) para el tratamiento de cáncer de mama positivo para HER2 avanzado o metastásico en pacientes que han recibido terapia anterior que incluye una antraciclina, un taxano, y Herceptin™ (U.S. Food and Drug Administration, Highlights of Prescribing Information. [en línea] Disponible en: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/022059s007bl.pdf [entrar al 28 de septiembre de 2013]). Algunos fármacos adicionales están en desarrollo clínico.

Aunque las terapias aprobadas específicas para HER2 han mejorado el patrón de protocolo de cánceres de mama y gástrico positivos para HER2, existe una necesidad médica sin satisfacer significativa, debido a la resistencia intrínseca o adquirida con respecto a estos fármacos. A pesar del estado de referencia de trastuzumab para el cáncer de mama positivo para HER2, el 20-50 % de los pacientes de un entorno con adyuvante y aproximadamente el 70 % de los pacientes de un entorno con monoterapia, continúa desarrollando resistencia al trastuzumab (Wolff *et al.*, 2007; y Harris *et al.*, 2007).

Hay una nueva tendencia en la terapia para el cáncer hacia la selección de pacientes para el tratamiento basándose en la evaluación de mecanismos genéticos o moleculares subyacentes del cáncer, como biomarcadores. La FDA ha aprobado algunos ensayos de diagnóstico basados en biomarcadores encontrados como relevantes en cánceres en particular, para identificar pacientes susceptibles de tratamiento con terapias específicas para el cáncer. Hacia mayo de 2013, la FDA había aprobado 15 de estos ensayos de diagnóstico, también conocidos como diagnósticos complementarios (Genetic Engineering and Biotechnology News, 2013, Companion Diagnostics: 52 Pick-Up. [en línea] Disponible en: <http://www.genengnews.com/insight-and-intelligenceand153/companion-diagnostics-52-pick-up/77899813/> [entrada el 28 de septiembre de 2013]) y otros diversos están en desarrollo. Por ejemplo, el ensayo para KRAS, theascreen™, es un ensayo de inmunohistoquímica de EGFR que identifica pacientes que tienen cáncer colorrectal metastásico positivo para EGFR con genes KRAS de tipo silvestre a tratar con Erbitux™ (cetuximab). El ensayo de inmunohistoquímica PharmDx de C-kit de DAKO identifica pacientes con tumores de estroma gastrointestinal positivos para c-kit susceptibles a tratamiento con Gleevec (imatinib). También se ha aprobado diversos ensayos de diagnóstico para la identificación de tumores positivos para HER2 para el tratamiento con Herceptin™ (trastuzumab) (Hamburg y Collins, 2010), tales como el ensayo de inmunohistoquímica Herceptest™ y Her2 FISH PharmDx Kit™, que normalmente se usan conjuntamente. Algunos kits adicionales disponibles en el mercado para inmunohistoquímica de tumores positivos para HER2 incluyen Oracle (Leica Biosystems) y Pathway (Ventana). Algunos esfuerzos de investigación preclínica y clínica para identificar biomarcadores predictivos de la respuesta clínica al tratamiento también tienen el potencial de identificar otros pacientes con cánceres HER2+ "no tradicionales", que incluyen cáncer colorrectal, cáncer de ovarios y otros, que probablemente se van a beneficiar de las terapias que se dirigen a HER2 (Gun *et al.*, 2013).

Como resultado de la naturaleza agresiva de los tumores que sobreexpresan HER2 o amplifican el gen HER2, el estado de amplificación de HER2 se ha convertido cada vez más en un indicador importante del resultado de la enfermedad y se somete a ensayo ampliamente. Normalmente, los tumores positivos para HER2 que pueden ser susceptibles de tratamiento con un agente terapéutico biológico específico para HER2 se, identifican en el primer caso usando inmunohistoquímica (IHC). Las muestras de los pacientes se evaluaron de una manera semicuantitativa usando un sistema de puntuación que refleja la intensidad de la tinción junto con el porcentaje de células tumorales teñidas en la muestra. Se mide el nivel de expresión o sobreexpresión de HER2 y una puntuación mediante la que se proporciona una tinción fuerte de la membrana completa a la que se le proporciona una puntuación de 3+ y se considera muy positiva o inequívoca. A una tinción de la membrana completa de débil a moderada observada en más de un 10 % de las células tumorales se le atribuye una puntuación de 2+ y se considera débilmente positiva o ambigua. Cuando la tinción de la membrana es débil, que es el caso en menos de un 10 % de células tumorales, o es incompleta, a la muestra se le atribuye una puntuación de 1+0 y se considera negativa para HER2. Los tumores que puntúan 3+ en el análisis de IHC, es decir cuando existe una fuerte sobreexpresión de la proteína HER2 en la superficie de la célula tumoral, se informan a un médico para un posible tratamiento con una terapia específica para HER2.

Dado que la IHC solamente es semicuantitativa, y mide la sobreexpresión de la superficie celular de la proteína HER2, puede ser inexacta y no siempre proporciona una lectura precisa. En particular, puede ser difícil para identificar tumores de forma correcta que son débilmente positivos para expresión de HER2 mediante IHC, es decir tumores que consiguen una puntuación 2+ en el análisis. Para la aclaración del estado de HER2 de tales tumores, algunas muestras se someten a ensayo adicional, por ejemplo mediante Hibridación *In Situ* con Fluorescencia (FISH), para determinar el nivel de amplificación genética de HER2 en la muestra de tumor. Se conocen diversos métodos para realizar FISH. En los métodos en los que el número de copias del gen HER2 se compara con un control interno tal como CEP17, en el que la puntuación de FISH es inferior a dos, en otras palabras, la proporción de HER2/CEP17 es inferior a 2, se dice que el estado del gen HER2 no está amplificado y el tumor se considera negativo para HER2. cuando la puntuación de FISH es igual o superior a 2, se dice que el estado del gen HER2 está amplificado, y el tumor se considera positivo para HER2 y se informa a un médico para un posible tratamiento con una terapia específica para HER2.

Sin embargo, a pesar de estas múltiples fases de ensayo para tumores positivos para HER2, no todos los tumores identificados como positivos para HER2 responden a las terapias actuales específicas para HER2. Por lo tanto,

5 todavía existe una necesidad en la técnica de tratamientos para pacientes con tumores positivos para HER2, así como medios para identificar pacientes que probablemente se benefician de tales terapias. Además, como se ha mencionado anteriormente, la resistencia adquirida a terapias conocidas para HER2, tales como trastuzumab, significa que existe la necesidad en la técnica de terapias adecuadas para el tratamiento de tales cánceres positivos para HER2 resistentes.

10 Algunos fragmentos de Fc de unión a antígeno (también denominados Fcab™ [fragmento Fc con Unión a Antígeno]) que comprenden por ejemplo un dominio de Fc modificado por IgG1 que se une a HER2 con una afinidad elevada se describen en el documento WO 2009/132876 A1 y el documento WO 2009/000006 A1. Se ha mostrado que tales Fcab tienen propiedades favorables, tales como vidas medias de aproximadamente 60 horas en ratones.

Exposiciones y descripción detallada de la invención

15 Los presentes inventores han descubierto que un miembro de unión específico que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio constante, por ejemplo el dominio CH3, del miembro de unión específico se puede usar para tratar cánceres con un número de copias del gen HER2 superior o igual a 10 por célula tumoral. Los presentes inventores también han descubierto que tales miembros de unión específica se pueden usar para tratar cánceres con niveles elevados de ARNm de HER2. En particular, tales miembros de unión específica se pueden usar para tratar cánceres resistentes al tratamiento con 20 tratamientos específicos para HER2 conocidos, tales como monoterapia con trastuzumab, o tratamiento con trastuzumab en combinación con pertuzumab.

25 Como se ha explicado anteriormente, se sabe que HER2 se expresa en un número de diferentes cánceres. Hay más datos disponibles sobre el cáncer de mama que sobre otros cánceres conocidos porque expresan HER2, y esto es así porque quizás es el cáncer positivo para HER2 mejor estudiado. La mayoría de los datos que están disponibles para tumores que tienen una puntuación de IHC de 3+. Hoff *et al.* (2002) determinaron que un 8 % de todos los pacientes con cáncer de mama tenían un número de copias de genes superior o igual a 10. En el ensayo de cáncer de mama adyuvante más grande de trastuzumab (el ensayo HERA), el número de copias de genes de los tumores se evaluó en 2071 (61 %) pacientes mediante FISH. De esos pacientes, un número de copias de genes superior o 30 igual a 10 se identificó en aproximadamente un 65 % de los pacientes. Esto representa aproximadamente un 13 % de todos los pacientes con cáncer de mama (Dowsett *et al.*, 2009). Aunque el número de copias del gen HER2 se ha estudiado en algunos ensayos clínicos, hay poca información disponible sobre el nivel correspondiente de ARNm de HER2 en estos cánceres. Sin embargo, se sabe que un aumento del número de las copias de genes en una célula a menudo da como resultado una expresión mayor de ese gen, y por lo tanto un aumento del nivel de ARNm codificado por ese gen. En consecuencia, también se espera que algunos pacientes con cánceres con un número elevado de copias del gen HER2 por célula tumoral (es decir igual o mayor que 10), tengan niveles elevados de ARNm de HER2.

40 Por lo tanto, existe un número significativo de pacientes que padecen cánceres con un GCN de HER2 superior o igual a 10 por célula tumoral, que se beneficiarían del tratamiento con un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión al antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio constante, por ejemplo el dominio CH3, del miembro de unión específica, o un miembro de unión específica que compite con tal miembro de unión específica por la unión a HER2. Lo mismo se aplica con respecto a pacientes que padecen cánceres con niveles elevados de ARNm de HER2.

45 Los presentes inventores han mostrado que el número de copias de genes es predictivo para tratamiento con un miembro de unión específica como se desvela en el presente documento, y no es predictivo de tratamiento con el tratamiento con trastuzumab específico para HER-2 aprobado anteriormente. En el presente documento se describe un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión al antígeno de HER2 modificado por ingeniería 50 genética en una región de bucle estructural de un dominio constante, por ejemplo el dominio CH3, del miembro de unión específica, así como un miembro de unión específica que compite con tal miembro de unión específica por la unión a HER2, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que el cáncer tiene un número de copias del gen HER2 superior o igual a 10 por célula tumoral.

55 En el presente documento también se describe un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión al antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio constante, por ejemplo el dominio CH3, del miembro de unión específica, así como un miembro de unión específica que compite con tal miembro de unión específica por la unión a HER2, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que dicho cáncer tiene un nivel elevado de ARNm de HER2.

60 En un aspecto, la presente invención proporciona un miembro de unión específica que se une a HER2 para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que dicho cáncer tiene un número de copias del gen HER2, por ejemplo un número medio de copias del gen HER2, superior o igual a 10 por célula tumoral, y en el que el miembro de unión específica es:

65

(a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o

5 (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

Un paciente, como se denominan el presente documento, es un paciente humano.

10 Una muestra de tumor obtenida de dicho paciente se puede haber determinado para que tenga un número de copias del gen HER2, por ejemplo un número medio de copias del gen HER2, superior o igual a 10 por célula tumoral. Por lo tanto, la presente invención proporciona un miembro de unión específica que se une a HER2 para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que se ha determinado que una muestra de tumor obtenida de dicho paciente tiene un número medio de copias del gen HER2 superior o igual a 10 por célula tumoral, y en el que el miembro de unión específica es:

15 (a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o

20 (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

Como alternativa, el método puede comprender:

25 (i) determinar el número de copias de genes, por ejemplo el número medio de copias de genes, del gen HER2 por célula tumoral en una muestra de tumor obtenida del paciente; y

(ii) tratar a dicho paciente con dicho miembro de unión específica si el número de copias del gen HER2, por ejemplo el número medio de copias del gen HER2, es mayor por igual a 10 por célula tumoral.

30 Por lo tanto, la presente invención también proporciona un miembro de unión específica que se une a HER2 para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que el método comprende:

(i) determinar el número de copias de genes, por ejemplo el número medio de copias de genes, del gen HER2 por célula tumoral en una muestra de tumor obtenida del paciente; y

35 (ii) tratar a dicho paciente con dicho miembro de unión específica si el número de copias del gen HER2, por ejemplo el número medio de copias del gen HER2, es superior o igual a 10 por célula tumoral;

en el que el miembro de unión específica es:

40 (a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o

(b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

45 Como se ha expuesto anteriormente, la expresión "número de copias del gen HER2", como se usa en el presente documento puede hacer referencia al número medio de copias del gen HER2 por célula tumoral/cancerígena. El número de copias del gen HER2 puede ser superior o igual a 10. Como alternativa, el número de copias del gen HER2 puede ser superior o igual a 11, superior o igual a 12, superior o igual a 13, superior o igual a 14, superior o igual a 15, superior o igual a 16, superior o igual a 17, superior o igual a 18, superior o igual a 19, superior o igual a 20, superior o igual a 21, superior o igual a 22, superior o igual a 23, superior o igual a 24, o superior o igual a 25. En un ejemplo, el número de copias del gen HER2 es mayor de 10. En otro ejemplo, el número de copias del gen HER2 es superior o igual a 11. En otro ejemplo, el número de copias del gen HER2 es superior o igual a 12. En otro ejemplo, el número de copias del gen HER2 es superior o igual a 13. En otro ejemplo, el número de copias del gen HER2 es superior o igual a 14. En un ejemplo adicional, el número de copias del gen HER2 es superior o igual a 15. En otro ejemplo, el número de copias del gen HER2 es superior o igual a 16. En otro ejemplo, el número de copias del gen HER2 es superior o igual a 17. En otro ejemplo, el número de copias del gen HER2 es superior o igual a 18. En otro ejemplo, el número de copias del gen HER2 es superior o igual a 19. En otro ejemplo, el número de copias del gen HER2 es superior o igual a 20. En un ejemplo adicional, el número de copias del gen HER2 es superior o igual a 23. En otro ejemplo adicional más, el número de copias del gen HER2 es superior o igual a 25. Preferentemente, el número de copias del gen HER2, por ejemplo el número medio de copias del gen HER2, es superior o igual a 15.

65 Preferentemente, el número de copias del gen HER2, por ejemplo el número medio de copias del gen HER2, es superior o igual a 10, en el que el número de copias de genes se determina mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

Preferentemente, el número de copias del gen HER2, por ejemplo el número medio de copias del gen HER2, es superior o igual a 18, en el que el número de copias de genes se determina mediante FISH.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un miembro de unión específica que se une a HER2 para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que dicho cáncer tiene un nivel elevado de ARNm de HER2, y en el que el miembro de unión específica es:

- 10 (a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
 (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

15 Una muestra de tumor obtenida de dicho paciente se puede haber determinado para que tenga un nivel elevado de ARNm de HER2. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un miembro de unión específica que se une a HER2 para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que una muestra de tumor obtenida de dicho paciente se ha determinado para que tenga un nivel elevado de ARNm de HER2, y en el que el miembro de unión específica es:

- 20 (a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
 (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

25 Como alternativa, el método puede comprender:

- 30 (i) determinar el nivel de ARNm de HER2 en una muestra de tumor obtenida del paciente; y
 (ii) tratar a dicho paciente con dicho miembro de unión específica si el nivel de ARNm de HER2 es elevado.

Por lo tanto, la presente divulgación también proporciona un miembro de unión específica que se une a HER2 para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que el método comprende:

- 35 (i) determinar el nivel de ARNm de HER2 en una muestra de tumor obtenida del paciente; y
 (ii) tratar a dicho paciente con dicho miembro de unión específica si el nivel de ARNm de HER2 es elevado;

en el que el miembro de unión específica es:

- 40 (a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
 (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

45 Algunos niveles de ARNm que codifican una proteína específica en una muestra se pueden medir de una forma indirecta a través de cuantificación, mediante PCR cuantitativa, las copias de ADNc derivadas del ARNm en la muestra mediante PCR de transcripción inversa (RT-PCR), con respecto a las copias de ADNc de una referencia, preferentemente un gen constitutivo. El gen de referencia tiene un perfil normal a través de diversos tipos de tejido/muestra y se usa como un patrón. El nivel de ARNm de HER2 en un tumor/cáncer o muestra de tumor, como se denomina en el presente documento, se refiere preferentemente al nivel de ARNm de HER2 como se refleja con el número de copias de ADNc de HER2 en el tumor/cáncer o muestra de tumor, determinado por RT-PCR seguido de PCR cuantitativa, con respecto al nivel de ARNm de un gen de referencia (por ejemplo, gen constitutivo), como se refleja mediante el número de copias de ADNc de un gen de referencia, determinado por RT-PCR seguido de PCR cuantitativa, en el tumor/cáncer o muestra de tumor, respectivamente. El número de copias de ADNc se puede determinar a partir de datos de PCR cuantitativa usando la versión 2.0 del Software CopyCaller™ (Life Technologies), u otro software equivalente que podría ser conocido por la persona experta. El Software CopyCaller™ realiza un análisis de cuantificación relativa del umbral del ciclo comparativo el número de copias del ADNc de HER2 con respecto al número de copias del ADNc de un gen constitutivo. Opcionalmente, el número de copias de ADNc se puede normalizar por referencia a una muestra de ADNc de referencia, tal como una muestra de ADNc obtenida de una combinación de 10 líneas de células humanas que tiene no se espera que tengan dos copias del gen HER2 por célula (LifeTechnologies, Software CopyCaller - Manual del Usuario).

65 Un nivel elevado de ARNm de HER2 en un tumor/cáncer o muestra de tumor, como se denomina en el presente documento, por lo tanto se refiere preferentemente a un nivel elevado de ARNm de HER2 como se refleja mediante un número elevado de copias de ADNc de HER2 en el tumor/cáncer o muestra de tumor, como se determina mediante RT-PCR seguido de PCR cuantitativa, con respecto al nivel de ARNm de un gen de referencia, como se

refleja mediante el número de copias de ADNc del gen de referencia, como se determina mediante RT-PCR seguido de PCR cuantitativa, en el tumor/cáncer o muestra de tumor, respectivamente. De forma específica, se usa PCR de transcripción inversa para transcribir el ARNm del gen HER2 o el gen de referencia en una muestra de tumor con respecto al ADNc, que a continuación se cuantifica usando qPCR. El gen de referencia es preferentemente un gen constitutivo. En un ejemplo preferente, el gen de referencia es proteína de unión a TATA (TBP) pero en la técnica también se conocen otros genes de referencia adecuados. El nivel de ARNm de HER2 en tumor/cáncer o muestra de tumor se puede normalizar con respecto al nivel de ARNm de HER2 en una muestra de célula de control conocida porque tiene dos copias del gen HER2 por célula. En particular, el nivel de ARNm de HER2 en tumor/cáncer o muestra de tumor, como se refleja mediante el número de copias de ADNc de HER2 en el tumor/cáncer o muestra de tumor, determinado por RT-PCR seguido de PCR cuantitativa, se puede normalizar con respecto al nivel de ARNm de HER2 como se refleja mediante el número de copias de ADNc de HER2, determinado por RT-PCR seguido de PCR cuantitativa, en una muestra de célula de control conocida porque tiene dos copias del gen HER2 por célula. El nivel de ARNm de HER2 de la muestra de control es preferentemente el nivel de ARNm de HER2 como se refleja mediante el número de copias de ADNc en la muestra de control, como se determina mediante RT-PCR seguido de PCR cuantitativa, con respecto al nivel de ARNm de un gen de referencia, como se refleja mediante el número de copias de ADNc del gen de referencia, como se determina mediante RT-PCR seguido de PCR cuantitativa, en la muestra de control. El gen de referencia es preferentemente el mismo gen de referencia que el que se usa para determinar el nivel de ARNm de HER2 en el tumor/cáncer o muestra de tumor, por ejemplo TBP.

Un nivel elevado de ARNm de HER2 en un tumor/cáncer o muestra de tumor, como se denomina en el presente documento, por lo tanto se refiere preferentemente a un nivel elevado de ARNm de HER2 como se refleja mediante un número elevado de copias de ADNc de HER2 en el tumor/cáncer o muestra de tumor determinado por RT-PCR seguido de PCR cuantitativa, con respecto al nivel de ARNm de un gen de referencia, como se refleja mediante el número de copias de ADNc del gen de referencia determinado por RT-PCR seguido de PCR cuantitativa, en el tumor/cáncer o muestra de tumor, respectivamente. Un nivel elevado de ARNm de HER2 en un tumor/cáncer o muestra de tumor puede hacer referencia o se corresponde con un número de copias de ADNc de HER2 superior o igual a 75, superior o igual a 80, superior o igual a 90, superior o igual a 100, superior o igual a 110, superior o igual a 120, superior o igual a 130, superior o igual a 140, superior o igual a 150, superior o igual a 160, superior o igual a 168, superior o igual a 170, superior o igual a 180, superior o igual a 190, superior o igual a 200, superior o igual a 210, superior o igual a 220, superior o igual a 229, o superior o igual a 248 en una muestra de dicho cáncer/tumor con respecto al número de copias de ADNc de un gen de referencia en dicha muestra, en el que el número de copias de ADNc de HER2 y el gen de referencia en la muestra se determina mediante RT-PCR seguido de PCR cuantitativa. Un nivel elevado de ARNm de HER2 en un tumor/cáncer o muestra de tumor puede hacer referencia o se corresponde con un número de copias de ADNc de HER2 superior o igual a 168 en una muestra de dicho cáncer/tumor con respecto al número de copias de ADNc de un gen de referencia en dicha muestra, en el que el número de copias de ADNc de HER2 y el gen de referencia en la muestra se determina mediante RT-PCR seguido de PCR cuantitativa. Un nivel elevado de ARNm de HER2 en un tumor/cáncer o muestra de tumor puede hacer referencia o se corresponde con un número de copias de ADNc de HER2 superior o igual a 248 en una muestra de dicho cáncer/tumor con respecto al número de copias de ADNc de un gen de referencia en dicha muestra, en el que el número de copias de ADNc de HER2 y el gen de referencia en la muestra se determina mediante RT-PCR seguido de PCR cuantitativa. Preferentemente, un nivel elevado de ARNm de HER2 en un tumor/cáncer o muestra de tumor puede hacer referencia o se corresponde con un número de copias de ADNc de HER2 superior o igual a 200 en una muestra de dicho cáncer/tumor con respecto al número de copias de ADNc de un gen de referencia en dicha muestra, en el que el número de copias de ADNc de HER2 y el gen de referencia en la muestra se determina mediante RT-PCR seguido de PCR cuantitativa. Más preferentemente, un nivel elevado de ARNm de HER2 en un tumor/cáncer o muestra de tumor puede hacer referencia o se corresponde con un número de copias de ADNc de HER2 superior o igual a 229 en una muestra de dicho cáncer/tumor con respecto al número de copias de ADNc de un gen de referencia en dicha muestra, en el que el número de copias de ADNc de HER2 y el gen de referencia en la muestra se determina mediante RT-PCR seguido de PCR cuantitativa.

Además del límite inferior que se ha establecido anteriormente, un nivel elevado de ARNm de HER2 en un tumor/cáncer o muestra de tumor puede hacer referencia o se corresponde con un número de copias de ADNc de HER2 inferior o igual a 820, inferior o igual a 850, inferior o igual a 900, inferior o igual a 950, inferior o igual a 1000, inferior o igual a 1100, inferior o igual a 1200, inferior o igual a 1300, inferior o igual a 1400, inferior o igual a 1500, inferior o igual a 1600, inferior o igual a 1700, inferior o igual a 1800, o inferior o igual a 1900 en una muestra de dicho cáncer/tumor con respecto al número de copias de ADNc de un gen de referencia en dicha muestra, en el que el número de copias de ADNc de HER2 y el gen de referencia en la muestra se determina mediante RT-PCR seguido de PCR cuantitativa. Preferentemente, un nivel elevado de ARNm de HER2 en un tumor/cáncer o muestra de tumor puede hacer referencia o se corresponde con un número de copias de ADNc de HER2 inferior o igual a 820 en una muestra de dicho cáncer/tumor con respecto al número de copias de ADNc de un gen de referencia en dicha muestra, en el que el número de copias de ADNc de HER2 y el gen de referencia en la muestra se determina mediante RT-PCR seguido de PCR cuantitativa.

Preferentemente, un nivel elevado de ARNm de HER2 en un tumor/cáncer o muestra de tumor puede hacer referencia o se corresponde con un número de copias de ADNc de HER2 superior o igual a 200 and inferior o igual a

820 en una muestra de dicho cáncer/tumor con respecto al número de copias de ADNc de un gen de referencia en dicha muestra, en el que el número de copias de ADNc de HER2 y el gen de referencia en la muestra se determina mediante RT-PCR seguido de PCR cuantitativa. Más preferentemente, un nivel elevado de ARNm de HER2 en un tumor/cáncer o muestra de tumor puede hacer referencia o se corresponde con un número de copias de ADNc de HER2 superior o igual a 229 and inferior o igual a 820 en una muestra de dicho cáncer/tumor con respecto al número de copias de ADNc de un gen de referencia en dicha muestra, en el que el número de copias de ADNc de HER2 y el gen de referencia en la muestra se determina mediante RT-PCR seguido de PCR cuantitativa.

Un cáncer como se denomina en el presente documento puede ser un cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no microcíticas), cáncer de estómago, o cáncer de endometrio. Se ha mostrado que todos estos cánceres sobreexpresan a HER2. Preferentemente, el cáncer es cáncer gástrico, cáncer de mama, o cáncer colorrectal. Más preferentemente, el cáncer es cáncer gástrico o cáncer de mama. En una realización preferente, el cáncer es cáncer gástrico. El cáncer gástrico, como se denomina en el presente documento, incluye cáncer de esófago. En otra realización preferente, el cáncer es cáncer de mama. El número de copias del gen HER2 del cáncer es como se ha establecido anteriormente. tal cáncer se puede denominar positivo para HER2 (HER2+) o que sobreexpresa a HER2. Por lo tanto, un cáncer, como se denomina en el presente documento, puede ser positivo para HER2. Además, o como alternativa, un cáncer como se denomina en el presente documento puede sobreexpresar a HER2. Si un cáncer es positivo para HER2 o sobreexpresa a HER2, por ejemplo, se puede determinar inicialmente usando inmunohistoquímica (IHC), seguido opcionalmente de métodos tales como qPCR como se ha establecido anteriormente.

Los presentes inventores han descubierto que un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión al antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio constante, por ejemplo el dominio CH3, del miembro de unión específica se puede usar para tratar cánceres que son resistentes o insensibles al tratamiento con trastuzumab y/o trastuzumab más pertuzumab. El cáncer puede ser intrínsecamente resistente o insensible al tratamiento con trastuzumab y/o trastuzumab más pertuzumab, o puede haber adquirido resistencia o insensibilidad al tratamiento con trastuzumab y/o trastuzumab más pertuzumab. El cáncer puede ser un cáncer gástrico que es resistente o insensible al tratamiento con trastuzumab y/o trastuzumab más pertuzumab. Como alternativa, el cáncer puede ser un cáncer de mama que es resistente o insensible al tratamiento con trastuzumab y/o trastuzumab más pertuzumab. Algunos métodos para determinar si un cáncer es resistente o insensible al tratamiento con trastuzumab y/o trastuzumab más pertuzumab se conocen bien en la técnica y serían evidentes para la persona experta. Por ejemplo, un cáncer de mama que es resistente al tratamiento con trastuzumab puede presentar evolución en una la primera reevaluación radiológica a las 8-12 semanas o dentro de 3 meses después del tratamiento de primera línea con trastuzumab con o sin quimioterapia en el entorno metastásico o nuevas apariciones diagnosticadas durante o dentro de 12 meses después de trastuzumab adyuvante. Un cáncer de mama que es resistente al trastuzumab puede presentar evolución de la enfermedad después de dos o más líneas de regímenes que contienen trastuzumab que inicialmente consiguieron respuesta o estabilización de la enfermedad en la primera evaluación radiológica (Wong *et al.*, 2011).

Además, o como alternativa, un paciente como se denomina en el presente documento puede haber presentado una respuesta inadecuada al tratamiento con trastuzumab y/o trastuzumab más pertuzumab. Una respuesta inadecuada al tratamiento con trastuzumab y/o trastuzumab más pertuzumab puede hacer referencia a una falta de retraso del crecimiento del tumor, o retraso insuficiente del crecimiento del tumor, cuando el paciente se trató con trastuzumab y/o trastuzumab más pertuzumab. Como alternativa, un paciente que presentada una respuesta inadecuada a trastuzumab y/o trastuzumab más pertuzumab puede hacer referencia a un paciente quien había interrumpido el tratamiento con trastuzumab y/o trastuzumab más pertuzumab debido a efectos adversos o sucesos adversos resultantes del tratamiento con trastuzumab y/o trastuzumab más pertuzumab, tales como efectos secundarios, en particular efectos secundarios graves. Preferentemente, una respuesta inadecuada a trastuzumab y/o trastuzumab más pertuzumab se refiere a una falta de retraso del crecimiento del tumor, o retraso insuficiente del crecimiento del tumor, cuando el paciente se trató con trastuzumab y/o trastuzumab más pertuzumab. Un profesional médico no tendrá dificultad para determinar si un paciente dado ha presentado una respuesta inadecuada al tratamiento con trastuzumab y/o trastuzumab más pertuzumab, ya que los expertos médicos tienen experiencia en juzgar sin tratamiento dado para el cáncer fue o no fue satisfactorio en el caso de un paciente en particular, y por lo tanto se debería o no se debería continuar. Por ejemplo, un periodo largo de enfermedad estable se puede considerar un estado clínico favorable si una carga de enfermedad y síntomas clínicos del paciente son ligeros al comienzo del tratamiento, mientras que si la carga de enfermedad es elevada y los síntomas clínicos son significativos al comienzo del tratamiento, entonces la enfermedad estable se puede considerar una respuesta inadecuada.

La expresión "miembro de unión específica" describe un miembro de un par de moléculas que se unen de forma específica entre sí. Un miembro de unión específica puede ser natural o se puede producir parcial o totalmente de forma sintética. Un miembro de unión específica normalmente comprende una molécula que tiene sitio de unión a antígeno. Por ejemplo, un miembro de unión específica puede ser una molécula de anticuerpo, o fragmento del mismo, que comprende un sitio de unión a antígeno. Un miembro de unión específica también puede ser un armazón de proteína que no es anticuerpo que se une de forma específica a un antígeno, tal como una molécula que comprende y de similar al de la inmunoglobulina modificada, por ejemplo, un dominio de fibronectina (dominio

de ¹⁰Fn3). En la técnica están disponibles diversos métodos para obtener anticuerpos, y fragmentos de anticuerpos, frente a un antígeno diana. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, especialmente un anticuerpo monoclonal humano, que se puede obtener de acuerdo con los métodos convencionales bien conocidos por la persona experta en la materia

5 Algunos fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión a antígeno incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de Fab (que consisten en dominios VL, VH, CL y CH1); fragmentos de F(ab')₂ (fragmento divalente que comprende dos fragmentos de Fab unidos); moléculas de Fv de una sola cadena (scFv) (que consisten en un dominio VH y un dominio VL unidos mediante un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar sitio de unión a antígeno; Bird *et al.* [1988] *Science*, 242, 423-426; Huston *et al.* [1988] *PNAS USA*, 85, 5879-5883); dímeros de Fv de una sola cadena biespecíficos (documento PCT/US92/09965); fragmentos de Fv (que consisten en los dominios VL y VH de un solo anticuerpo); fragmentos de dAb (que consisten en un dominio VH o un dominio VL; Ward *et al.* [1989] *Nature* 341, 544-546; McCafferty *et al.*, [1990] *Nature*, 348, 552-554; Holt *et al.* [2003] *Trends in Biotechnology* 21, 484-490); fragmentos de Fd (que consisten en los dominios VH y CH1); diacuerpos (fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos mediante fusión genética; documento WO94/13804; Holliger *et al.* [1993a], *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448); y fragmentos de Fc de unión a antígeno.

20 Algunos fragmentos de Fc de unión a antígeno comprenden un sitio de unión a antígeno modificado por ingeniería genética en una o más regiones de bucle de un dominio constante del fragmento Fc, por ejemplo el dominio CH₂ o CH₃. La preparación de fragmentos de Fc de unión a antígeno se describe en los documentos WO 2006/072620 y WO2009/132876. Un miembro de unión específica para su uso en la presente invención es preferentemente, o comprende, un fragmento Fc de unión a antígeno, en la técnica también denominado FcabTM. Más preferentemente, un miembro de unión específica para su uso en la presente invención es un fragmento Fc de unión a antígeno. El miembro de unión específica puede ser un fragmento Fc de unión a antígeno de IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM. Más preferentemente, un miembro de unión específica como se denomina en el presente documento es un fragmento Fc de unión a antígeno de IgG1.

30 Algunos fragmentos de Fc de unión a antígeno se pueden incorporar en moléculas de inmunoglobulina. Por lo tanto, un miembro de unión específica para su uso en la presente invención puede ser una molécula de IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM que comprende un sitio de unión a antígeno en la región Fc. Tales moléculas comprenden preferentemente un segundo sitio de unión basado en CDR en la región variable de la molécula, y por lo tanto son biespecíficas. En particular, el miembro de unión específica para su uso en la presente invención puede ser una molécula de IgG1 que comprende un sitio de unión a antígeno en la región Fc.

35 Un miembro de unión específica como se denomina en el presente documento tiene preferentemente un peso molecular (PM) de 60 kD o inferior, más preferentemente de 55 kD o inferior, 54 kD o inferior, o 53 kD o inferior. El miembro de unión específica H561-4 que se desvela el presente documento tiene un PM de aproximadamente 53 kD. El miembro de unión específica H561-4 también se conoce como FS102.

40 Un miembro de unión específica, como se denomina en el presente documento, puede comprender un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH₃ del miembro de unión específica, en el que el sitio de unión a antígeno de HER2 comprende o contiene las secuencias de aminoácido FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14). Como alternativa, un miembro de unión específica puede comprender un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH₃ de un miembro de unión específica, en la que el sitio de unión a antígeno HER2 contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), NGQPE (SEQ ID NO: 13), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14).

50 Un miembro de unión específica, como se denomina en el presente documento, puede comprender un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH₃ del miembro de unión específica, en la que el sitio de unión a antígeno de HER2 comprende la secuencia de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12) y la secuencia de aminoácidos DRRRWTA (SEQ ID NO: 14). En particular, un miembro de unión específica, como se denomina en el presente documento, puede comprender un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH₃ del miembro de unión específica, en la que el sitio de unión a antígeno de HER2 comprende la secuencia de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12) en el bucle AB, y la secuencia de aminoácidos DRRRWTA (SEQ ID NO: 14) en el bucle EF del dominio CH₃. Preferentemente, un miembro de unión específica, como se denomina en el presente documento, comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH₃ del miembro de unión específica, en la que el sitio de unión a antígeno de HER2 comprende las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12) y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14), en la que la SEQ ID NO: 12 está situada en los restos 14-18 del bucle AB del dominio CH₃, y la SEQ ID NO: 14 está situada en los restos 92-98 del bucle EF del dominio CH₃, y en la que los restos se numeran de acuerdo con el esquema de numeración de IMGT (ImMunoGeneTics). En una realización preferente adicional, un miembro de unión específica, como se denomina en el presente documento, comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH₃ del miembro de unión específica, en el que el sitio de unión a antígeno de HER2 comprende las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ

ID NO: 12) y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14), en el que la SEQ ID NO: 12 está situada en los restos 381-385, y la SEQ ID NO: 14 está situada en los restos 440-450 del bucle EF del dominio CH3, y en el que los restos se numeran de acuerdo con KABAT (Kabat *et al.*, 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4th Edition. US Department of Health and Human Services, y actualizaciones del mismo, disponibles ahora en Internet en immuno.bme.nwu.edu o encuentran "Kabat" usando cualquier buscador en internet).

Un miembro de unión específica, como se denomina en el presente documento, preferentemente comprende el dominio CH3 de la SEQ ID NO: 11. Un miembro de unión específica puede comprender adicionalmente el dominio CH2 de la SEQ ID NO: 10. Un miembro de unión específica como se denomina en el presente documento preferentemente comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8. Más preferentemente, un miembro de unión específica como se denomina en el presente documento es un dímero de un polipéptido de la SEQ ID NO: 8. Por ejemplo, el miembro de unión específica puede ser un dímero formado por dos polipéptidos de la SEQ ID NO: 8, tal como un dímero que consiste en dos polipéptidos, en el que cada polipéptido consiste en la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 8 (un miembro de unión específica de este tipo de cambio se denomina H561-4 en el presente documento).

Anteriormente se ha informado de la pérdida de los restos de lisina C-terminal (K) o lisina C-terminal y lisina adyacente (GK) del dominio CH3 que se produce durante la preparación de inmunoglobulinas. Se cree que este denominado 'recorte C-terminal' es un fenómeno común que no tiene implicaciones funcionales para estas microvariantes (Beck *et al.* 2013). Se espera que el recorte C-terminal se pueda producir durante la preparación de H561-4. El dominio CH3 de H561-4, que incluye los restos de lisina y glicina C-terminales que se pueden someter a recorte C-terminal se muestra en la SEQ ID NO: 11, y también está presente por ejemplo en la SEQ ID NO: 8 como se indica en la secuencia informal que se enumeran a continuación.

Por lo tanto sigue que un miembro de unión específica, como se denomina en el presente documento puede comprender el dominio CH3 de la SEQ ID NO: 11, o el dominio CH3 de la SEQ ID NO: 11 menos uno o dos restos C-terminales (por ejemplo, los restos de lisina C-terminal o lisina y glicina C-terminales). Un miembro de unión específica, como se denomina en el presente documento, puede comprender la secuencia de la SEQ ID NO: 8, o la secuencia de la SEQ ID NO: 8 menos uno o dos restos C-terminales (por ejemplo, los restos de lisina o lisina y glicina C-terminales). Se debería interpretar que cualquier referencia a las SEQ ID NO: 8 y 11 como se usa en el presente documento se debería interpretar también se aplica a estas secuencias que carecen de uno o dos de los restos de aminoácido C-terminales (por ejemplo, los restos de lisina o lisina y glicina C-terminales). La referencia a un dominio CH3 como se denomina en el presente documento incluye un dominio CH3 que pierde uno o dos restos de aminoácidos C-terminales (por ejemplo, los restos de lisina o lisina y glicina C-terminales).

En la presente invención también se pueden usar algunas variantes de tales miembros de unión específica. Por ejemplo, un miembro de unión específica, como se denomina en el presente documento, puede comprender un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica, en el que el sitio de unión a antígeno de HER2 comprende o contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14) con 3, 2 o 1 sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos. Una sustitución de aminoácido puede ser una sustitución de aminoácido conservativa. Como alternativa, un miembro de unión específica puede comprender un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 de un miembro de unión específica, en el que el sitio de unión a antígeno de HER2 contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), NGQPE (SEQ ID NO: 13), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14) con 3, 2 o 1 sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos. Algunas variantes también incluyen las que comprenden una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % a la SEQ ID NO: 8. Las alteraciones normalmente no dan como resultado pérdida de función, de modo que un miembro de unión específica que comprende una secuencia de aminoácidos alterada de este modo puede retener la capacidad para unirse a HER2. Por ejemplo, se puede unir a HER2 con la misma afinidad que un miembro de unión específica en el que la sustitución no se realiza.

Un miembro de unión específica, que compite con un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14), o un miembro de unión específica como se ha establecido anteriormente, por la unión a HER2, comprende preferentemente un sitio de unión antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una o más, preferentemente dos, regiones de bucle estructural de un dominio constante del miembro de unión específica. Más preferentemente, tal miembro de unión específica comprende un sitio de unión antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una o más, preferentemente dos, regiones de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica. Los bucles estructurales en el dominio CH3 se localizan en los restos 7-21 (bucle AB), 25-39 (bucle BC), 41-81 (bucle CD), 83-85 (bucle DE), 89-103 (bucle EF) y 106-117 (bucle FG), en los que los restos se numeran de acuerdo con el esquema de numeración de IMGT (ImMunoGeneTics) (documento WO 2006/072620 A1). Todavía más preferentemente, tal miembro de unión específica comprende un sitio de unión antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en las regiones AB y EF de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica. En particular, tal miembro de unión específica puede comprender un sitio de unión antígeno de

HER2 modificado por ingeniería genética en los restos 14-18 y 92-98 del dominio CH3 del miembro de unión específica, en el que los restos se numeran de acuerdo con el esquema de numeración de IMGT. Los restos 14-18 se sitúan en el bucle AB y los restos 92-98 se sitúan en el bucle EF del dominio CH3. Tal miembro de unión específica puede comprender un sitio de unión antigénico de HER2 modificado por ingeniería genética en los restos 381-385 y 440-450 del miembro de unión específica, en el que los restos se numeran de acuerdo con KABAT. Los restos 381-385 se sitúan en el bucle AB y los restos 440-450 se sitúan en el bucle EF del dominio CH3. Como alternativa, tal miembro de unión específica puede comprender un sitio de unión antigénico de HER2 modificado por ingeniería genética en las regiones de bucle estructural AB, CD, y EF de un dominio CH3 del miembro de unión específica. El miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antigénico de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14), con el que el miembro de unión específica compite por la unión a HER2, es preferentemente un dímero de un polipéptido de la SEQ ID NO: 8.

Algunos métodos adecuados para determinar si dos miembros de unión específica compiten por la unión a la misma diana, en este caso HER2, se conocen bien en la técnica y serían evidentes para la persona experta. Tales métodos incluyen métodos de competición que usan resonancia de plasmón superficial (SPR), ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima (ELISA), separación de células activadas por fluorescencia (FACS), o inmunocitoquímica. Los métodos de resonancia de plasmón superficial (SPR) incluyen BIAcore. Por lo tanto, un miembro de unión específica que compite con un segundo miembro de unión específica por la unión a HER2, puede competir con el segundo miembro de unión específica por la unión a HER2, como se determina usando resonancia de plasmón superficial (SPR) (por ejemplo, BIAcore), un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), separación de células activadas por fluorescencia (FACS), o inmunocitoquímica. Preferentemente, un miembro de unión específica que compite con un segundo miembro de unión específica por la unión a HER2, compite con el segundo miembro de unión específica por la unión a HER2, como se determina usando resonancia de plasmón superficial (SPR), por ejemplo BIAcore. Como se muestra en el Ejemplo 1 del presente documento, trastuzumab y pertuzumab no compiten con el miembro de unión específica H561-4, que comprende un sitio de unión antigénico de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de su dominio CH3 que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14), por la unión a HER2.

Para los métodos de competición enumerados anteriormente, el HER2 se inmoviliza en la superficie de chip (BIAcore), en una placa (ELISA), o se presenta en una superficie celular (FACS e inmunocitoquímica). Uno de los dos miembros de unión específica a comparar se incubaba a continuación con el HER2 inmovilizado durante un periodo de tiempo y a una concentración que conducía a saturación del antigénico de HER2, bloqueando de este modo todos los epítopos de HER2 a los que se une este miembro de unión específica. Después, el segundo miembro de unión específica se incubaba con el HER2 inmovilizado. La unión del segundo miembro de unión específica a HER2 indica que los miembros de unión específica se unen a diferentes epítopos en HER2, mientras que si la segunda unión no se une al HER2 inmovilizado, esto indica que el segundo miembro de unión específica compite con el primer miembro de unión específica por la unión a HER2, y que los dos miembros de unión específica se unen (o se solapan) a los mismos epítopos en HER2.

En ciertas realizaciones, un miembro de unión inhibe la unión de H561-4 a HER2 en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más, como se determina, por ejemplo, mediante BIAcore, ELISA o FACS. En ciertas realizaciones, H561-4 inhibe la unión del miembro de unión a HER2 en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más, como se determina, por ejemplo, mediante BIAcore, ELISA o FACS. En ciertas realizaciones, un miembro de unión inhibe la unión de H561-4 a HER2 en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más, y H561-4 inhibe la unión del miembro de unión a HER2 en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más, como se determina, por ejemplo, mediante BIAcore, ELISA o FACS (es decir, la competición se realiza de ambas formas).

En ciertas realizaciones, un miembro de unión compite por la unión a HER2 con H561-4, pero no con trastuzumab o pertuzumab. En ciertas realizaciones, un miembro de unión no inhibe la unión de trastuzumab o pertuzumab a HER2 en más de un 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o inferior, como se determina, por ejemplo, mediante BIAcore, ELISA o FACS. En ciertas realizaciones, trastuzumab o pertuzumab no inhiben la unión de H561-4 a HER2 en más de un 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o inferior, como se determina, por ejemplo, mediante BIAcore, ELISA o FACS. En ciertas realizaciones, un miembro de unión inhibe la unión de H561-4 a HER2 y/o H561-4 inhibe la unión del miembro de unión en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más, pero no inhibe la unión de trastuzumab o pertuzumab y/o el HER2 y/o trastuzumab o pertuzumab no inhibe la unión de H561-4 a HER2 en más de un 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o inferior, como se determina, por ejemplo, mediante BIAcore, ELISA o FACS. Por ejemplo, un miembro de unión inhibe la unión de H561-4 a HER2 y/o H561-4 inhibe la unión del miembro de unión en al menos un 50 %, pero no inhibe la unión de trastuzumab o pertuzumab a HER2 y/o trastuzumab o pertuzumab no inhibe la unión de H561-4 a HER2 en más de un 50 %, como se determina, por ejemplo, mediante BIAcore, ELISA o FACS. En otro ejemplo, un miembro de unión inhibe la unión de H561-4 a HER2 y/o H561-4 inhibe la unión del miembro de unión en al menos un 90 %, pero no inhibe la unión de trastuzumab o pertuzumab a HER2 y/o trastuzumab o pertuzumab no inhibe la unión de H561-4 a HER2 en más de un 10 %, como se determina, por ejemplo, mediante BIAcore, ELISA o FACS.

Un miembro de unión específica como se denomina en el presente documento se puede unir al HER2 dimérico. El miembro de unión específica se puede unir al HER2 dimérico con una afinidad de 1 nM, o una afinidad que es más elevada. El miembro de unión específica se puede unir preferentemente a HER2 dimérico en comparación con HER2 monomérico. Preferentemente, el miembro de unión específica se une al mismo epítipo en el dominio de extracelular de HER2 como un dímero de un polipéptido de la SEQ ID NO: 8. El epítipo puede ser un epítipo conformacional, es decir no lineal. El epítipo puede alcanzar los dominios 1 y 3 de HER2. El epítipo puede comprender, o consistir en, las SEQ ID NO: 15, 16 y 17. El epítipo puede comprender, o consistir en, los aminoácidos 13 a 27, 31 a 45, y 420 a 475 del dominio de extracelular de HER2. Como alternativa, el epítipo se puede localizar dentro de las SEQ ID NO: 15, 16 y 17, o los aminoácidos 13 a 27, 31 a 45, y 420 a 475 del dominio de extracelular de HER2. La secuencia del dominio de extracelular de HER2 se muestra en la SEQ ID NO: 18.

En la técnica se conocen bien algunos métodos para determinar si dos miembros de unión específica se unen al mismo epítipo y serían evidentes para la persona experta. Tales métodos incluyen Pepscan, espectrometría de masas con intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-MS), y cristalografía de rayos X. En estudios de formación de mapas de epítopos, un antígeno, en este caso HER2, se puede dividir en regiones pequeñas, es decir péptidos o dominios, y a continuación se puede someter a ensayo por la unión al miembro de unión específica. Las regiones que muestran unión se pueden usar para deducir el epítipo unido mediante el miembro de unión específica. La comparación de las regiones que se unen a los miembros de unión específica diferentes se puede usar para comparar epítopos. Como alternativa, se pueden realizar mutaciones en el antígeno, aquí HER2, y a continuación someter a ensayo la unión a un miembro de unión específica. Se indica que algunas mutaciones de restos que provocan una pérdida de unión forman parte del epítipo unido mediante el miembro de unión específica. Sin embargo, se debe tener cuidado para asegurar que una mutación no provoca una pérdida general en la estructura del HER2. En cristalografía de rayos X, el antígeno, aquí HER2, y el miembro de unión específica se cristalizan como un complejo. Los datos del cristal se usan a continuación para determinar el epítipo unido mediante el miembro de unión específica. Los epítopos de HER2 unidos mediante dos miembros de unión específica diferentes se pueden comparar a continuación.

En la técnica se conocen bien algunos métodos para determinar el número de copias del gen HER2 y serían evidentes para la persona experta. Por ejemplo, el número de copias del gen HER2 se puede determinar usando hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), hibridación *in situ* cromogénica (CISH), o reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Un estudio anterior informaba que el GCN de HER2 determinado por CISH y FISH se correlaciona en gran medida como se muestra mediante análisis de regresión lineal (García-Caballero *et al.*, 2010). Algunos estudios adicionales demostraban que el estado de amplificación de HER2 determinado por los dos métodos también tiene una fuerte correlación (Arnould *et al.*, 2012; Mollerup *et al.*, 2012). Por lo tanto, se espera que el GCN de HER2 determinado por CISH sea similar al GCN determinado por FISH. Preferentemente, el número de copias del gen HER2 se determina usando FISH. Del mismo modo, en la técnica se conocen algunos métodos para determinar los niveles de ARNm de HER2 y deberían ser evidentes para la persona experta. Por ejemplo, el nivel de ARNm de HER2 se puede determinar usando PCR de transcripción inversa (RT-PCR) seguido de PCR cuantitativa (qPCR). La sobreexpresión del gen HER2 se puede medir mediante inmunohistoquímica (IHC) para determinar la cantidad de HER2 expresado en la superficie celular.

FISH usa sondas etiquetadas con fluorescencia para detectar secuencias de ADN en particular en muestras de tejido mediante microscopía de fluorescencia. FISH se usa para determinar de forma cuantitativa la amplificación del gen HER2 en muestras de ensayo de tejido de cáncer fijado con formalina, embebido en parafina (FFPE) usando sondas específicas que se hibridan con secuencias de HER2. Existen diferentes métodos aprobados por la FDA para realizar FISH para determinar el GCN de HER2 (Press *et al.*, 2002). En un método, los números tanto de HER2 como del cromosoma 17 se miden y se comparan, para determinar el GCN medio de HER2 por célula tumoral en las muestras. Las sondas CEP17 (sondas de recuento de cromosomas, que son sondas de ADN etiquetadas directamente con fluorescencia específicas para la secuencia de ADN del satélite alfa en la región centromérica del cromosoma 17) se pueden usar en este ensayo con un control interno para aneuploidía cromosómica. El gen HER2 y CEP17 se etiqueta con diferentes fluoróforos y se pueden visualizar usando filtros específicos para el microscopio. La medida de la amplificación del gen HER2 se basa en la proporción entre el número de copias de HER2 con respecto a las copias de CEP17 y se hace recuento con microscopio, eliminando de este modo la aneuploidía del cromosoma 17 como una fuente de aumento del GCN de HER2. Cuando, por ejemplo, la proporción es igual o superior a 10, el GCN medio de HER2 por célula tumoral/cancerígena es superior o igual a 10. Un número de copias del gen HER2, o número medio de HER2, por célula tumoral/cancerígena, como se denomina en el presente documento, por lo tanto puede excluir cualquier aumento en el número de copias del gen HER2 debido a la aneuploidía cromosómica, en particular aneuploidía del cromosoma 17. Como alternativa, en un método preferente, el número total de copias del gen HER2 se puede determinar mediante recuento directo de las señales de HER2 sin normalización con respecto a la señal de CEP17. Este método es preferente porque el recuento del número total de copias del gen HER2 fue evitar resultados de falso positivo o falso negativo debidos a la pérdida o aumento de la región pericentromérica del cromosoma 17 que se observa más normalmente que la polisomía verdadera (duplicación de todo el cromosoma) que puede dar como resultado alteraciones en la proporción de HER2/CEP17 (Wolff *et al.*, 2013; Hanna *et al.*, 2014). Como una alternativa adicional, se puede realizar FISH usando solamente una sonda de HER2 en FFPE como un método indirecto para localización del gen HER2 (Press *et al.*, 2002).

Se ha encontrado que el número de copias de genes obtenidas por FISH y qPCR para un tumor en particular es altamente correlativo (véase el Ejemplo 9). Por lo tanto, es posible la conversión entre valores de GCN obtenidos mediante diferentes métodos, (por ejemplo, FISH y qPCR).

5 También se proporciona el uso de un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión al antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio constante, por ejemplo el dominio CH3, del miembro de unión específica, así como un miembro de unión específica que compite con tal miembro de unión específica por la unión a HER2, en la preparación de un medicamento para tratamiento de cáncer en un paciente, en el que el cáncer tiene un número de copias del gen HER2, por ejemplo un número medio de copias del gen HER2, superior o igual a 10 por célula tumoral, y/o en el que el cáncer tiene un nivel elevado de ARNm de HER2.

15 La presente invención también proporciona el uso de un miembro de unión específica que se une a HER2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que dicho cáncer tiene un número de copias del gen HER2, por ejemplo un número medio de copias del gen HER2, superior o igual a 10 por célula tumoral, y/o el cáncer tiene un nivel elevado de ARNm de HER2, y en el que el miembro de unión específica es:

- 20 (a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

25 También se proporciona el uso de un miembro de unión específica que se une a HER2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que se ha determinado que una muestra de tumor obtenida de dicho paciente tiene un número medio de copias del gen HER2 superior o igual a 10 por célula tumoral, y/o en el que se ha determinado que una muestra de tumor obtenida de dicho paciente tiene un nivel elevado de ARNm de HER2, y en el que el miembro de unión específica es:

- 30 (a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- 35 (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

Además se proporciona el uso de un miembro de unión específica que se une a HER2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en un paciente, tratamiento que comprende:

- 40 (i) determinar el número de copias de genes, por ejemplo el número medio de copias de genes, del gen HER2 por célula tumoral en una muestra de tumor obtenida del paciente; y
- (ii) tratar a dicho paciente con dicho miembro de unión específica si el número de copias del gen HER2, por ejemplo el número medio de copias del gen HER2, es superior o igual a 10 por célula tumoral;

45 en el que el miembro de unión específica es:

- 50 (a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

También se proporciona el uso de un miembro de unión específica que se une a HER2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en un paciente, tratamiento que comprende:

- 55 (i) determinar el nivel de ARNm de HER2 en una muestra de tumor obtenida del paciente; y
- (ii) tratar a dicho paciente con dicho miembro de unión específica si el nivel de ARNm de HER2 es elevado; en el que el miembro de unión específica es:

- 60 (a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

65

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que dicho cáncer tiene un número de copias del gen HER2, por ejemplo un número medio de copias del gen HER2, superior o igual a 10 por célula tumoral, y en el que el método comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de:

- 5 a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- 10 (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

Se puede haber determinado que una muestra de tumor obtenida de dicho paciente tiene un número de copias del gen HER2, por ejemplo un número medio de copias del gen HER2, superior o igual a 10 por célula tumoral. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que se ha determinado que una muestra de tumor obtenida de dicho paciente tiene un número medio de copias del gen HER2 superior o igual a 10 por célula tumoral, and en el que el método comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de:

- 20 a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- 25 (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

25 Como alternativa, el método puede comprender:

- 30 (i) determinar el número de copias de genes, por ejemplo el número medio de copias de genes, del gen HER2 por célula tumoral en una muestra de tumor obtenida del paciente; y
- (ii) tratar a dicho paciente con dicho miembro de unión específica si el número de copias del gen HER2, por ejemplo el número medio de copias del gen HER2, es superior o igual a 10 por célula tumoral.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que el método comprende:

- 35 (i) determinar el número de copias de genes, por ejemplo el número medio de copias de genes, del gen HER2 por célula tumoral en una muestra de tumor obtenida del paciente; y
- (ii) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del miembro de unión específica al paciente si el número de copias del gen HER2, por ejemplo el número medio de copias de genes, es superior o igual a 10 por célula tumoral, en el que el miembro de unión específica es:
- 40 a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- 45 (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que dicho cáncer tiene un nivel elevado de ARNm de HER2, y en el que el método comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de:

- 50 a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- 55 (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un miembro de unión específica que se une a HER2 para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que dicho cáncer tiene un nivel elevado de ARNm de HER2, y en el que el miembro de unión específica es:

- 60 (a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- 65 (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

Se puede deber determinado que las muestras de tumor obtenidas de dicho paciente tienen niveles elevados de ARNm de HER2. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que se ha determinado que una muestra de tumor obtenida de dicho paciente tiene un nivel elevado de ARNm de HER2, y en el que el método comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de:

- a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

Como alternativa, el método puede comprender:

- (i) determinar el nivel de ARNm de HER2 en una muestra de tumor obtenida del paciente; y
- (ii) tratar a dicho paciente con dicho miembro de unión específica si los niveles de ARNm de HER2 son elevados.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que el método comprende:

- (i) determinar el nivel de ARNm de HER2 en una muestra de tumor obtenida del paciente; y
- (ii) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del miembro de unión específica al paciente si el nivel de ARNm de HER2 es elevado, en el que el miembro de unión específica es:

- a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.

Los miembros de unión específica que se describen en el presente documento se diseñan para su uso en métodos de tratamiento de pacientes, preferentemente pacientes humanos. Algunos miembros de unión específica normalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del miembro de unión específica. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento, y para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del principio activo, un excipiente, un vehículo, un tampón, un estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables muy conocidos por los expertos en la materia. Tales materiales no deberían ser tóxicos y no deberían interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza exacta del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser mediante inyección, por ejemplo, intravenosa o subcutánea. El miembro de unión específica se puede administrar por vía intravenosa, o por vía subcutánea.

Las composiciones farmacéuticas líquidas por lo general comprenden un vehículo líquido tal como agua, vaselina, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. También se puede incluir solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio del malestar, el principio activo estará en forma de una solución acuosa apirógena, parenteralmente aceptable, y tiene un pH, una isotonicidad y una estabilidad adecuados. Las personas con experiencia relevante en la materia serán muy capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como Inyección de Cloruro Sódico, Inyección de Ringer, Inyección de Ringer Lactada. Si fuera necesario, se pueden usar conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/o otros aditivos. Los expertos en la materia conocen muchos métodos para la preparación de formulaciones farmacéuticas. Véase por ejemplo Robinson ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Una composición que comprende un conjugado de acuerdo con la presente invención se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, de forma simultánea o de forma secuencial o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos, dependiendo de la afección a tratar. Por ejemplo, un miembro de unión específica para uso en la invención se puede usar en combinación con un agente terapéutico existente para la enfermedad a tratar. Por ejemplo, como miembro de unión específica se puede administrar en combinación con acetato de abitaterona (Zytiga), afatinib, aflibercept, anastrozol, bevacizumab, bicalutamida, inhibidores de BRAF, carboplatino, capecitabina, cetuximab, cisplatino, crizotinib, ciclofosfoamida, docetaxel, doxorubicina liposomal pegilada, enzalutamida (XTANDI), epirubicina, mesilato de eribulina, erlotinib, etopósido, everolimus, exemestano, FOLFIRI, FOLFOX, fluoracilo, 5-fluorouracilo, flutamida, fulvestrant, gefitinib, gemcitabina, goserelina, inhibidores de la ruta de hedgehog, irenotecán, ixabepilona, lapatinib, letrozol, leucovorina, leuprorelina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, nanopartículas de paclitaxel unidas a albúmina, panitumumab, pemetrexed, pertuzumab, prednisona, dicloruro de radio Ra 223 (Inyección de Xofigo), ramucirumab, regorafenib, S-1, tamoxifeno, topotecán,

trastuzumab DM-1, triptorelina, o vinorelbina.

La administración se puede realizar en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar beneficio a un paciente. Tal beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. Por lo tanto "tratamiento" de una enfermedad especificada se refiere a mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la tasa y periodo de tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se está tratando, el paciente en particular que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración de la composición, el tipo de conjugado, el método de administración, la programación de administración y otros factores conocidos por los expertos en medicina. La prescripción del tratamiento, por ejemplo decisiones sobre dosificación etc., está dentro de la responsabilidad de los expertos generales y los doctores en medicina, y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o evolución de una enfermedad que se está tratando. En la técnica se conocen bien algunas dosis apropiadas de anticuerpo (Ledermann *et al.* (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664; y Bagshawe *et al.* (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922). Se pueden usar dosificaciones específicas indicadas en el presente documento, o en la *Physician's Desk Reference* (2003) si fuera apropiado para el tipo de medicamento que se está administrando. Una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis adecuada de un miembro de unión específica se puede determinar por comparación de su actividad *in vitro* y su actividad *in vivo* en un modelo animal. Se conocen algunos métodos para extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones y otros animales de ensayo para seres humanos. La dosis precisa dependerá del número de factores, que incluyen ya sea el tamaño y la localización de la zona a tratar, y la naturaleza precisa del miembro de unión específica. Los tratamientos se pueden revertir a intervalos diarios, dos veces a la semana, semanalmente o mensualmente, de acuerdo con el criterio del médico. El tratamiento se puede administrar antes, y/o después de cirugía, y se puede administrar o aplicar directamente en el sitio anatómico del tratamiento quirúrgico.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un cáncer en un paciente que es susceptible al tratamiento con:

- (a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2; método que comprende:

- (i) determinar el número de copias de genes, por ejemplo el número medio de copias de genes, del gen HER2 por célula tumoral en una muestra de tumor obtenida del paciente, en la que un número de copias de genes, por ejemplo un número medio de copias de genes, superior o igual a 10 por célula tumoral indica que el cáncer es susceptible de tratamiento con el miembro de unión específica.

Un método para identificar un cáncer en un paciente que es susceptible de tratamiento puede comprender adicionalmente (ii) seleccionar dicho paciente para tratamiento con el miembro de unión específica si el número de copias del gen HER2, por ejemplo el número medio de copias del gen HER2, es superior o igual a 10 por célula tumoral.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para predecir la respuesta de un cáncer al tratamiento con:

- (a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2; método que comprende:

- (i) determinar el número de copias del gen HER2, por ejemplo el número medio de copias del gen HER2, del gen HER2 por célula tumoral en una muestra de tumor obtenida de un paciente, en la que un número de copias de genes, por ejemplo el número medio de copias del gen HER2, superior o igual a 10 por célula tumoral indica que el cáncer es susceptible de tratamiento con el miembro de unión específica, y en la que el número de copias de genes, por ejemplo el número medio de copias del gen HER2, inferior a 10 por célula tumoral indica que el cáncer no es susceptible de tratamiento con el miembro de unión específica.

Un método para predecir la respuesta de un cáncer al tratamiento puede comprender adicionalmente:

- (ii) seleccionar dicho cáncer para tratamiento con el miembro de unión específica si el número de copias del gen HER2, por ejemplo el número medio de copias del gen HER2, es superior o igual a 10 por célula tumoral.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un cáncer en un paciente que es susceptible de tratamiento con:

(a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o

5 (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2; método que comprende:

(i) determinar el nivel de ARNm de HER2 en una muestra de tumor obtenida del paciente, en la que un nivel elevado de ARNm de HER2 indica que el cáncer es susceptible de tratamiento con el miembro de unión específica.

10 Un método para identificar un cáncer en un paciente que es susceptible de tratamiento puede comprender adicionalmente (ii) seleccionar dicho paciente para tratamiento con el miembro de unión específica si el nivel de ARNm de HER2 de la muestra de tumores es elevado.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para predecir la respuesta de un cáncer a tratamiento con:

(a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o

20 (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2; método que comprende:

25 (i) determinar el nivel de ARNm de HER2 en una muestra de tumor obtenida de un paciente, en la que un nivel elevado de ARNm de HER2 en la muestra de tumor indica que el cáncer es susceptible de tratamiento con el miembro de unión específica.

Un método para predecir la respuesta de un cáncer a tratamiento puede comprender adicionalmente:

30 (ii) seleccionar dicho cáncer para tratamiento con el miembro de unión específica si el nivel de ARNm de HER2 en la muestra de tumor es elevado.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona un miembro de unión específica que se une a HER2, en el que el miembro de unión específica es un dímero de un polipéptido de la SEQ ID NO: 8. Por ejemplo, el miembro de unión específica puede ser un dímero formado por dos polipéptidos de la SEQ ID NO: 8, tal como un dímero que consiste en dos polipéptidos, en el que cada polipéptido consiste en la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 8 (tal miembro de unión específica también se denomina H561-4 en el presente documento).

40 También se proporciona una composición farmacéutica que comprende el miembro de unión específica de la invención. La composición farmacéutica puede comprender el miembro de unión específica de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. También se proporciona un ácido nucleico que codifica el miembro de unión específica de la invención. Preferentemente, el ácido nucleico compendio consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 1. Esta secuencia de nucleótidos se ha optimizado para expresión en células de Ovario de Hámster Chino (CHO) pero la persona experta no tendría dificultad para diseñar otras secuencias de nucleótidos que codifiquen el miembro de unión específica de la invención. También se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico que codifica el miembro de unión específica de la invención, como es una célula hospedadora que comprende un vector o ácido nucleico de la invención.

50 La presente invención también proporciona un método para producir el miembro de unión específica de la invención, que comprende el cultivo de la célula hospedadora recombinante de la invención en condiciones para producción del miembro de unión específica. El método puede comprender adicionalmente aislar y/o purificar el miembro de unión específica. El método también puede comprender la formulación del miembro de unión específica en una composición farmacéutica.

55 **Breve Descripción de las Figuras**

60 La **Figura 1** muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de H561-4 (H561-4) del fragmento Fc de unión a antígeno con la secuencia de aminoácidos de IgG1 de tipo silvestre (WT) en la misma región. Los aminoácidos se numeran de acuerdo con Kabat - la numeración de Kabat se muestra por encima de las secuencias alineadas (Nota: la numeración de Kabat no tiene los restos 293-294, 297-298, 315-316, 356,362, 380, 403-404, 409, 412-413, 429, 431-431 en IgG1). Parte del bucle AB se muestra en negrita, y parte del bucle EF se muestra inédita y con doble subrayado.

65 La **Figura 2** demuestra que H561-4 se une a un epítipo diferente en HER2 que trastuzumab o pertuzumab. La **Figura 2A** muestra un análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) de competición de epítopos de trastuzumab y H561-4 usando BIAcore. Un chip de CM5 BIAcore revestido con 1000 RU de HER2 ECD se saturó

con trastuzumab (TR) mediante inyección de 10 µg/ml de trastuzumab durante 3 min seguido de una segunda inyección de trastuzumab a 10 µg/ml que muestra que el chip de HER2 se satura con trastuzumab después de la primera inyección (línea de puntos de color negro). Un chip de CM5 BIAcore revestido con 1000 RU de HER2 ECD se saturó con trastuzumab mediante inyección de 10 µg/ml de trastuzumab durante 3 min seguido de una segunda inyección de una mezcla de H561-4 (10 µg/ml) y trastuzumab (10 µg/ml) que muestra que cuando un chip de HER2 se satura con trastuzumab H561-4 todavía es capaz de unirse (línea continua de color negro). Un chip de CM5 BIAcore revestido con 1000 RU de HER2 ECD se saturó con H561-4 mediante inyección de 10 µg/ml de H561-4 durante 3 min seguido de una segunda inyección de H561-4 (10 µg/ml) que muestra que el chip de HER2 se satura con H561-4 después de la primera inyección (línea discontinua de color negro). Un chip de CM5 BIAcore revestido con 1000 RU de HER2 ECD se saturó con H561-4 mediante inyección de 10 µg/ml de H561-4 durante 3 min seguido de una segunda inyección de una mezcla de trastuzumab (10 µg/ml) y H561-4 (10 µg/ml) que muestra que cuando un chip de HER2 se satura con H561-4 trastuzumab todavía es capaz de unirse (línea de color negro discontinua ancha). La **Figura 2B** muestra un análisis de SPR de competición de epítomos de pertuzumab (PE) y H561-4 usando Octet. Una punta revestida con estreptavidina se cargó mediante incubación en biot-HER2 durante 30 min y a continuación se lavó durante 1 minuto en tampón. HER2 se saturó con pertuzumab mediante incubación de pertuzumab 325 nM durante 30 min seguido de una segunda incubación de pertuzumab a 325 nM que muestra que la punta revestida con HER2 se satura con pertuzumab después de la primera incubación (línea de color gris). Una punta revestida con estreptavidina se cargó mediante incubación en biot-HER2 durante 30 min, y a continuación se lavó durante 1 minuto en tampón. HER2 se saturó con pertuzumab mediante incubación de pertuzumab 325 nM durante 30 min seguido de una segunda incubación de H561-4 a 325 nM y pertuzumab a 325 nM que muestra que una punta revestida con HER2 saturada con pertuzumab todavía es capaz de unirse a H561-4 (línea de color negro). La **Figura 2C** muestran la región de unión predicha de H561-4 (dominio transmembrana 1 y 3 de etiquetado de color negro) en el dominio extracelular de HER2. El epítipo de unión de H561-4 se predijo usando tecnología Pepscan CLIPS (Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds). Los dominios HER2 se indican con números romanos. La tabla en la Figura 2C indica las secuencias lineales predichas para cada uno de los epítomos de unión de H561-4, que en conjunto forman los dominios transmembrana 1 y 3 de bolsillo de unión.

La **Figura 3** demuestra que H561-4 induce apoptosis y conduce a internalización y degradación de HER2. La **Figura 3A** muestra que el tratamiento con H561-4 de células SKBr3 provocaba una reducción en el número total de células y en el porcentaje de células viables. La tinción con PI y Anexina V mostraba un aumento de las células apoptóticas y necróticas tardías después de tratamiento con H561-4. La **Figura 3B** muestra que el tratamiento con H561-4 de células SKBr3 provocaba una reducción de HER2 total y de HER2 fosforilado. La **Figura 3C** muestra que el tratamiento con H561-4 de células SKBr3 provocaba una reducción de HER2 de superficie celular y de HER2 total. Una reducción en Her2 de este tipo no se observó en células SKBr3 tratadas con trastuzumab, fragmento Fc de unión a antígeno de tipo silvestre (WT) (SEQ ID NO: 19), o un control de IgG1 (IgG), o célula sin tratar. La **Figura 3D** muestra que la actividad de la caspasa 3/7 se induce mediante tratamiento con H561-4 de células SKBr3 pero no mediante tratamiento de células SKBr3 con trastuzumab, fragmento Fc de unión a antígeno de wt, y/o control de IgG1 (ctrl).

La **Figura 4** demuestra la eficacia del tratamiento con H561-4 del paciente humano derivado de modelos de xenoinjerto tumoral (PDX) con números de copias del gen HER2 superiores o iguales a 10. La **Figura 4A** muestra datos de respuesta tumoral *in vivo* de tumor gástrico (GXF281) con un número elevado de copias del gen HER2 (GCN de HER2 = 15 copias por célula). Las flechas indican los días de tratamiento. La **Figura 4B** muestra datos de respuesta tumoral *in vivo* de tumor gástrico (GXA3039) con número elevado de copias del gen HER2 (GCN de HER2 = 25 copias por célula). Las flechas indican los días de tratamiento. La **Figura 4C** muestra datos de respuesta tumoral *in vivo* de tumor colorrectal (CXF1991) con número elevado de copias del gen HER2 (GCN de HER2 = 32 copias por célula). Las flechas indican los días de tratamiento. La **Figura 4D** muestra datos de respuesta tumoral *in vivo* de tumor colorrectal (CXF2102) con número elevado de copias del gen HER2 (GCN de HER2 = 35 copias por célula). Las flechas indican los días de tratamiento. La **Figura 4E** muestra datos de respuesta tumoral *in vivo* de tumor gástrico (GXA3054) con número elevado de copias del gen HER2 (GCN de HER2 = 76 copias por célula). Las flechas indican los días de tratamiento. La **Figura 4F** muestra datos de respuesta tumoral *in vivo* de tumor gástrico (GXA3038) con número elevado de copias del gen HER2 (GCN de HER2 = 29 copias por célula). Las flechas indican los días de tratamiento. La **Figura 4G** muestra datos de respuesta tumoral *in vivo* de tumor de mama (HBCx-13B) con número elevado de copias del gen HER2 (GCN de HER2 = 23 copias por célula). Las flechas indican los días de tratamiento. La **Figura 4H** muestra datos de respuesta tumoral *in vivo* de tumor gástrico (GA0060) con número elevado de copias del gen HER2 (GCN de HER2 = 43 copias por célula). Las flechas indican los días de tratamiento. Las barras de error en las Figuras 4A-H representan el error típico de la media (ETM).

La **Figura 5** muestra que H561-4 supera la resistencia de trastuzumab más pertuzumab (TR+PE) en modelo de PDX gástrico de GXF281 (GCN de HER2 por célula = 25). Los ratones se trataron por vía intravenosa (i.v.) con compuestos enumerados en la leyenda ("/" separa los compuestos de dosificación del primer ciclo de tratamiento de los del segundo ciclo). Las flechas indican el programa de dosificación. Después de que los tumores implantados alcanzarán el volumen medio de 100 mm³, estos se trataron con 4 dosis semanales de terapia de combinación con TR+PE (o 4 dosis semanales de H561-4 como un control). Los tumores tratados con TR+PE

continuaron creciendo aunque a una tasa menor. Un intervalo de 33 días se implementó para permitir la eliminación de estos anticuerpos antes del segundo ciclo de dosificación. Después del intervalo, si el volumen medio del tumor alcanzaba un tamaño superior a 500 mm³, los ratones se volvían a dosificar semanalmente con TR+PE o con H561-4. Las barras de error representan el error típico de la media (ETM).

La **Figura 6** muestra un diagrama de dispersión de los valores de T/C de tratamiento con H561-4 y trastuzumab en modelos de PDX con números de copias del gen HER2 (GCN) superiores o iguales a 10, en comparación con modelos de PDX con GCN inferiores a 10. Los valores de P se calcularon mediante el ensayo T para muestras no relacionadas o independientes usando el software Graphpad prism.

La **Figura 7** muestra un diagrama de dispersión de los valores de T/C de tratamiento con H561-4 y trastuzumab en modelos de PDX con los niveles de ARNm de HER2 (ARNm) superiores o iguales a 200, en comparación con modelos de PDX con niveles de ARNm inferiores a 200. Los valores de P se calcularon mediante el ensayo T para muestras no relacionadas o independientes usando el software Graphpad prism.

La **Figura 8** muestra un diagrama de dispersión de los valores de T/C de tratamiento con H561-4 y trastuzumab en modelos de PDX con GCN de HER2 superiores a 10 en comparación con modelos de PDX con GCN inferior a 10. Los valores de T/C se calcularon usando la ecuación T/C actualizada. Los valores de P se calcularon mediante el ensayo T para muestras no relacionadas o independientes usando el software Graphpad prism.

La **Figura 9** muestra un diagrama de dispersión de los valores de T/C de tratamiento con H561-4 y trastuzumab en modelos de PDX con el nivel de ARNm de HER2 superior o igual a 200 en comparación con modelos de PDX con el nivel de ARNm de HER2 inferior a 200. Los valores de T/C se calcularon usando la ecuación T/C actualizada. Los valores de P se calcularon mediante el ensayo T para muestras no relacionadas o independientes usando el software Graphpad prism.

La **Figura 10** muestra un diagrama de dispersión de los valores de T/C de tratamiento con H561-4 y trastuzumab en modelos de PDX con GCN de HER2 superior a 18 como se determina mediante FISH en comparación con modelos de PDX con GCN inferior a 18. Los valores de P se calcularon mediante el ensayo T para muestras no relacionadas o independientes usando el software Graphpad prism.

La **Figura 11** muestran diagramas de dispersión del número de copias de genes determinado por FISH y qPCR en cada uno de los 17 modelos de tumor de PDX. Los GCN determinado por los dos métodos son altamente correlativos basándose en el análisis de correlación (Pearson $r = 0,90$; $p < 0,0001$; 95 % de CI = 0,74-0,96).

La **Figura 12** muestra un diagrama de dispersión de los valores de T/C de tratamiento con H561-4 y trastuzumab en modelos de PDX con sobreexpresión de proteína HER2 positiva en comparación con modelos de PDX con sobreexpresión de proteína HER2 negativa. Los valores de P se calcularon mediante el ensayo T para muestras no relacionadas o independientes usando el software Graphpad prism.

Cuando “y/o” se usa en el presente documento se va a tomar como divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo “A y/o B” se va a tomar como divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se expusiera de forma individual en el presente documento.

A menos que el contexto lo indique de otro modo, las descripciones y definiciones de las características que se han expuesto anteriormente no se limitan a ningún aspecto o realización de la invención en particular y se aplican del mismo modo a todos los aspectos y realizaciones que se describen.

A continuación se ilustrarán ciertos aspectos y realizaciones de la invención a modo de ejemplo y con referencia a las figuras que se han descrito anteriormente.

Ejemplos

Ejemplo 1 – H561-4 se une a un epítipo diferente en HER2 que trastuzumab o pertuzumab

Se usó resonancia de plasmón superficial (SPR) para determinar si H561-4 compite con los anticuerpos anti-HER2 conocidos, trastuzumab y pertuzumab, por la unión a HER2.

Competición con trastuzumab

Se usó un BIAcore 3000 (GE healthcare) para determinar si H561-4 se podía unir a un chip revestido con HER2 humano que se saturó con trastuzumab (TR) y viceversa. Un CM5 chip se revistió con 1000 RU predominio extracelular (ECD) de HER2 humano (BenderMed Systems) usando acoplamiento de amina convencional, los experimentos se realizaron usando un caudal de 20 µl/min en tampón de HBS-P (GE Healthcare), y la superficie de HER2 se regeneró usando MgCl₂ 4 M. El primer compuesto de unión a HER2 (H561-4 o trastuzumab) se inyectó a

10 $\mu\text{g/ml}$ durante 3 min y a continuación el segundo compuesto de unión a HER2 (trastuzumab o H561-4) se inyectó durante 3 min la segunda inyección se realizó en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ del primer compuesto para eliminar la disociación del compuesto 1 durante la segunda inyección) seguido de disociaciones tampón (Figura 2A). En el caso en el que las inyecciones 1 y 2 eran el mismo compuesto (trastuzumab seguido de trastuzumab o H561-4 seguido de H561-4) se observaba poca o ninguna unión en la segunda inyección, lo que muestra que la superficie de unión a HER2 estaba saturada en ambos casos. La Tabla 1 que sigue a continuación muestra la respuesta (RU) observada con las diferentes combinaciones de inyecciones:

La Tabla 1 muestra que la respuesta de unión de H561-4 en un chip de HER2 saturado con trastuzumab (246 RU) es similar a la de la unión de H561-4 en una superficie de HER2 desnudo (253-254 RU), lo que indica que H561-4 no compite con trastuzumab por la unión a HER2.

Inyección 1	Respuesta (RU)	Inyección 2	Respuesta adicional (RU)
Trastuzumab	794	Trastuzumab	20
Trastuzumab	771	H561-4 (+Trastuzumab)	246
H561-4	254	H561-4	0
H561-4	253	Trastuzumab (H561-4)	746

El mismo resultado se observó cuando la serie de inyección se invirtió porque la respuesta de unión de trastuzumab en una superficie saturada con H561-4 (746 RU) es similar para que se produce en la unión a una superficie de HER2 desnudo (771-794 RU).

Competición con Pertuzumab

Un Octet (ForteBio) se usó para determinar si H561-4 se podía unir para una punta revestida con HER2 humano que se saturaba con pertuzumab (PE) y viceversa. Todas las etapas se realizaron a 1000 rpm en tampón cinético (ForteBio). Una punta revestida con Estreptavidina (ForteBio) se revistió mediante incubación en 50 $\mu\text{g/ml}$ de biot-HER2 durante 30 mins, a continuación, la punta se lavó en tampón durante 1 min y a continuación se incubó en pertuzumab 325 nM durante 30 mins para saturar todos los sitios de unión a pertuzumab y a continuación se transfirió inmediatamente en una mezcla de H561-4 (325 nM) y pertuzumab (325 nM) y se incubó durante 30 mins antes de disociación en tampón durante 10 mins. Como un control para asegurar que todos los sitios de unión a pertuzumab estaban ocupados, una punta recién preparada se usó a continuación para repetir el experimento usando Pertuzumab (325 nM) en la primera etapa y pertuzumab (325 nM) solamente en la segunda etapa (Figura 2B). En el caso de que ambas etapas eran pertuzumab, se observó poca o ninguna unión adicional en la segunda etapa lo que muestra que la superficie de unión a HER2 se saturaba con pertuzumab. La Tabla 2 que sigue a continuación muestra la respuesta (RU) observada con las diferentes combinaciones de inyecciones:

La Tabla 2 muestra que la respuesta de unión de H561-4 en un chip de HER2 saturado con pertuzumab (0,41 RU) es significativamente mayor que la respuesta de unión adicional de pertuzumab (0,04 RU), lo que indica que H561-4 no compite con pertuzumab por la unión a HER2.

Incubación 1	Respuesta (RU)	Incubación 2	Respuesta Adicional (RU)
Pertuzumab	1,15	Pertuzumab	0,04
Pertuzumab	1,01	H561-4 (+Pertuzumab)	0,41

Ejemplo 2 – Investigación de la unión de H561-4 a HER2

Comparación de la unión de H561-4 a HER2 monomérico con respecto a dimérico

Se encontró que H561-4 se unía de forma preferente a HER2 dimérico en comparación con HER2 monomérico. Se usaron métodos basados en ELISA y basados en SPR para comparar la unión de H561-4 a HER2 monomérico (dominio extracelular [ECD] de HER2 sin etiqueta) con respecto a HER2 dimérico (ECD de HER2 con etiqueta de Fc, R&D biological). En el formato de ELISA, el HER2 se revistió en una superficie de placa y por lo tanto HER2 inmovilizado, mientras que en los experimentos con BIAcore, el H561-4 se capturó y el HER2 se inyectó como el analitos y por lo tanto era HER2 soluble.

Comparación basada en ELISA de unión de H561-4 ha HER2 monomérico y HER2 dimérico

El HER2 monomérico (ECD de HER2 sin etiqueta) y HER2 dimérico (etiqueta de Fc de ECD de HER2) se inmovilizaron a 2 $\mu\text{g/ml}$ en una placa maxisorp de 96 pocillos (Nunc) en PBS durante una noche a 4 °C. Las placas se bloquearon durante 1 hora con 200 μl de BSA al 5 % en PBS. H561-4 y trastuzumab (Roche) se biotinilaron usando el kit de biotilación de Innova Bioscience (n.º 704-0010) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una serie de dilución de H561-4 biotinilado o trastuzumab biotinilado se preparó en BSA al 5 %. La solución del bloqueo se retiró y 100 μl de la serie de dilución de H561-4 y trastuzumab se añadieron a la placa y se incubó a TA durante 1 hora. La serie de dilución se retiró y la placa se lavó 3x con solución salina tamponada con fosfato con Tween 20

(PBST).

Una dilución a 1:5000 de Estrep-HRP (Abcam ab) se preparó en BSA al 5 % y se añadieron 100 µl se añadió a la placa y se incubó durante 1 hora a TA. A continuación, la placa se lavó 3x con PBST antes de añadir 100 µl de TMB (Roche), y la placa se incubó a TA durante 2 mins. La reacción se detuvo usando 100 µl de H₂SO₄ 2 M y la placa se leyó a 450 nM.

El control de trastuzumab tenía la misma concentración media eficaz máxima (CE₅₀) (1,3 – 1,5 nM) en HER2 monomérico y dimérico, mientras que H561-4 tenía una preferencia de 10 veces para el HER2 dimérico en comparación con HER2 monomérico, como se muestra con los valores de CE₅₀ de 1,7 nM y 20,6 nM, respectivamente. La CE₅₀ se refiere a la concentración del miembro de unión que induce la mitad de una respuesta entre la medida inicial y máxima después de un tiempo de exposición especificado.

Comparación basada en BIAcore de unión de H561-4 a HER2 monomérico y HER2 dimérico

Para capturar el H561-4 en una orientación que permitiera la unión a HER2 soluble, se usó un mAb² anti-EGFR-H561-4 (EGFR/H561-4). Esta molécula es un anticuerpo anti-EGFR con la región Fc modificada para que contenga los núcleos de unión de H561-4 en el dominio CH3. Esta molécula biespecífica de EGFR/HER2 a continuación se capturó en un chip de BIAcore revestido con EGFR a través de la especificidad de unión a EGFR, que se encuentra en las ramas de Fab, permitiendo de ese modo que el dominio CH3 de unión de HER2 se expusiera al analito. Para permitir la comparación con el trastuzumab de mAb anti-HER2, se construyó un fragmento Fc de unión a antígeno de trastuzumab-EGFR (TR/EGFR), biespecífico similar. Este biespecífico comprende el trastuzumab de mAb anti-HER2 con la región Fc modificada para que contenga los bucles de unión de un fragmento Fc de unión a antígeno anti-EGFR en el dominio CH3. Tanto el mAb de EGFR como el fragmento Fc de unión a antígeno de EGFR tienen afinidades de unión similares para EGFR (1 nM). El TR/EGFR se capturó en el chip de EGFR a través la región Fc del fragmento Fc de unión a antígeno de EGFR dejando de este modo que la especificidad de unión de HER2 en las ramas de Fab se expusiera al analito.

Un chip de estreptavidina de BIAcore se inmovilizó con 1000 RU de biot-EGFR. Los experimentos se realizaron usando un caudal de 20 µl/min en tampón HBS-P (GE Healthcare). Las moléculas biespecíficas de EGFR/HER2 se capturaron mediante inyección de 60 µl de 100 mM del mAb², y la superficie de EGFR se regeneró usando NaOH 50 mM. Las series de dilución de monomérico (ECD de HER2 sin etiquetar, en las instalaciones) y dimérico (ECD de HER2 etiquetado con Fc, R&D) se inyectaron como el analito. Los datos se ajustaron usando el modelo de unión a 1:1 de Langmuir.

La Tabla 3 que sigue a continuación muestran los valores de K_D obtenidos mediante los ajustes de los datos a 1:1. H561-4 muestra sumamente una unión débil a HER2 monomérico soluble incluso a concentraciones hasta 1000 nM, mientras que la afinidad a HER2 dimérico es 1 nM. El trastuzumab se une a HER2 monomérico con una afinidad de 1 nM y a HER2 dimérico con una afinidad sub-nM.

	K_D HER2 monomérico	K_D HER2 dimérico
H561-4	> 1 µM	1 nM
Trastuzumab	1 nM	Sub nM (velocidad de disociación fuera del intervalo que se puede ajustar usando BIAcore 2000)

Predicción de epítipo de H561-4 en HER2 usando Pepscan

Usando tecnología CLIPS (Pepscan), se determinó H561-4 para unirse a través de dos dominios de HER2 extracelular. Estos dominios eran los dominios 1 y 3 de HER2, con mapas de epítipos de unión formados con respecto a los aminoácidos 13 a 27 (LPASPETHLDMLRHL) y los aminoácidos 31 a 45 (CQVVQGNLELYLPT) del dominio 1. El dominio 3 tenía un sitio de unión más grande de los aminoácidos 420 a 475 (SLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHHTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTA). En una formación lineal, estos tres epítipos diferentes parecen aleatorios, sin embargo, cuando se visualizan en el formato conformacional, se revela un bolsillo de unión distinto que atraviesa estos dos dominios (Figura 2C).

Los péptidos lineales y CLIPS (Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds) se sintetizaron basándose en la secuencia de aminoácidos de HER2 extracelular usando química de FMOC convencional y se desprotegeron usando ácido trifluórico con neutralizadores. Los péptidos limitados se sintetizaron en armazones químicos para reconstruir epítipos conformacionales, usando tecnología de CLIPS (Timmerman *et al.*, 2007, Functional reconstruction and synthetic mimicry of a conformational epitope using CLIPS™ technology. J MoL Recognit. 20:283-99). Las cadenas laterales de las múltiples cisteínas en los péptidos se acoplaron a moldes de CLIPS reaccionando sobre tarjetas de PEPSCAN de polipropileno en formato de tarjeta de crédito (455 formatos de péptido/tarjeta) con una solución 0,5 mM de molde CLIPS (1,3-bis (bromometil) benceno en bicarbonato de amonio (20 mM, pH 7,9)/acetónitrilo (1:1 [v/v])). Las tarjetas se agitaron suavemente en la solución de 30 a 60 mins a la vez que se cubrían completamente en solución. Por último, las tarjetas se lavaron de forma intensa con exceso de H₂O y se sometieron a ultrasonidos en tampón de interrupción que contenía un 1 por ciento de SDS/0,1 por ciento de beta-

mercaptoetanol en PBS (pH 7,2) a 70 °C durante 30 mins, seguido de proceso de ultrasonidos en H₂O durante otros 45 mins. La unión de anticuerpo a péptido se sometió a ensayo en un ELISA basado en PEPSCAN. Las tarjetas de polipropileno en formato de tarjeta de crédito de 455 pocillos que contenían los péptidos unidos de forma covalente se incubaron con solución de anticuerpo primario por ejemplo que consiste en 1 microgramos/ml diluidos en solución de bloqueo, suero de caballo al 5 %, ovoalbúmina al 5 % (p/v) en PBS/Tween 80 al 1 %.

Después del lavado, los péptidos se incubaron con una dilución a 1:1000 de conjugado de peroxidasa de anticuerpo durante una hora a 25 °C. Después del lavado, el sustrato de peroxidasa sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina (ABTS) y se añadieron 2 microlitros de un 3 por ciento de 11202. Después de una hora, se midió el desarrollo de color. El desarrollo de color se cuantificó con una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) — y un sistema de procesamiento de imágenes (como se describió en primer lugar en Sloodstra *et al.*, 1996, Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries, Molecular Diversity, 1, 87-96).

Por lo tanto, los datos sin procesar eran valores ópticos obtenidos con una cámara CCD. Los valores varían principalmente de 0 a 3000, una escala en una clínica similar de 1 a 3 de un lector de placas de ELISA de 96 pocillos convencionales. En este experimento, los varones obtenidos variaban de 0-380.

La cámara CCD primero tomó una fotografía de la tarjeta antes de la coloración con peroxidasa y a continuación otra fotografía después de la coloración con peroxidasa. Estas dos figuras se restaron entre sí, lo que dio como resultado los datos sin procesar. Esto se copió en la base de datos Peplabtm. A continuación, los valores se copiaron a Excel y este archivo se etiquetó como un archivo de datos sin procesar. Se permitió una manipulación de seguimiento. En ocasiones, un pocillo contiene una burbuja de aire que da como resultado un valor de falso positivo, las tarjetas inspeccionaron de forma manual y cualquier valor causado por una burbuja de aire se puntuó como 0. Los valores positivos se tomaron como una señal de unión (el mapa de epitopo) y se formaron mapas para la secuencia de HER2. Se generaron figuras generadas por ordenador de la proteína HER2 extracelular y se formaron mapas de las señales de unión positivas, que indican las áreas de unión del fragmento Fc de unión a antígeno (Figura 2C).

Ejemplo 3 – H561-4 induce apoptosis y conduce a internalización y degradación única y profunda de HER2

La línea de células SKBr3 de cáncer de mama que sobreexpresa HER2 se usó como un sistema modelo para determinar el mecanismo de acción de H561-4. La línea de células SKBr3 obtuvo en la ATCC (HTB-30) y se cultivó en Medio de 5a McCoy + GlutaMAX (Invitrogen) que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS). El trastuzumab (Roche) se usó como un control en todos los estudios de mecanismo de acción.

H561-4 tiene actividad antiproliferativa en células SKBr3 e induce apoptosis

Las células SKBr3 se sembraron a 7,5 x 10³ células por pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos y se incubaron durante una noche a 37 °C, CO₂ al 5 % con 100 µl por pocillo. Al día siguiente, se añadieron 20 µl de medios que contenían los tratamientos (H561-4 o trastuzumab) para dar una serie de dilución de concentración de H561-4 o trastuzumab. Las células se incubaron con los tratamientos durante 5 días a 37 °C, CO₂ al 5 %. A continuación, las células se tiñeron con una mezcla de 1 µg/ml de tinción de Hoechst final (Sigma Aldrich, H6024), 2,5 µg/ml de Yoduro de Propidio (PI) y Alexa-488 Anexina V a 1:100 (Invitrogen, V13245) en Tampón de Unión de Anexina V (CaCl₂ 12,5 mM, NaCl 140 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4) y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 2 horas. A continuación, las células se leyeron en el ImageXpress Micro (Molecular Devices). Se hizo el recuento del número de células en cada pocillo usando la tinción de Hoechst con un aumento de 4x. Se usó tinción con Anexina V y PI para determinar el porcentaje de células viables (células no teñidas con PI), células apoptóticas iniciales (células teñidas solamente con Anexina V), células apoptóticas tardías (células teñidas con Anexina V y PI) y células necróticas (células teñidas solamente con PI) con un aumento de 40x. A la concentración más elevada sometida a ensayo (300 nM), H561-4 provocó con una reducción de un 37 % reducción en el número de células en comparación con una reducción de un 22 % con trastuzumab. Además, de las células restantes tratadas con H561-4 solamente un 43 % eran viables en comparación con un 79 % para trastuzumab. Esta reducción de células totales y células viables se asoció con un aumento de las células apoptóticas tardías y necróticas (18 % y 35 %, respectivamente) solamente para las células tratadas con H561-4. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 3A.

H561-4 provoca internalización y degradación de HER2

Las células SKBr3 se sembraron a 3,3 x 10⁵ células/ml con 3 ml/pocillo en una placa de 6 pocillos y se incubaron durante una noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Al día siguiente, los medios se cambiaron por medios que contenían FBS al 0,1 % y se incubaron durante al menos 2 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % antes de retirar los medios y reemplazarlos con medios que contenían FBS al 0,1 % y los tratamientos (H561-4 o trastuzumab) a 200 nM. Las células se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 24 h, 48 h o 72 h. Los lisados se recogieron a continuación en hielo: los medios se retiraron y se añadieron 250 µl del tampón de lisis (Tris 10 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, cóctel de proteasa a 1:100 [Calbiochem, 539131], cócteles de fosfatasa a 1:100 [Calbiochem, 524625]). A continuación, las células se rasparon de la superficie del pocillo y 250 µl se incubaron en y hielo durante 15 mins, se centrifugaron a

14.000 rpm durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se recogió para análisis. Las muestras se mezclaron con tampón de carga NuPAGE que contenía β -mercaptoetanol, se incubaron a 95 °C durante 10 mins y a continuación se almacenaron a -20 °C hasta su uso. 20 μ l de las muestras se desarrollaron en un 4-12 % de Bis-Tris SDS PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, la membrana se bloqueó con Marvel al 5 %/TBST y a continuación se investigó para HER2 (Cell signalling, n.º 2248), fosfor-HER2 (Cell Signalling, n.º 2243) o α - β -actin como un control de carga (Sigma A1978). A continuación, las membranas se lavaron y se añadió el anticuerpo secundario apropiado conjugado con HRP (anti-ratón, Jackson ImmunoResearch, o anti-conejo Jackson ImmunoResearch). La membrana se desarrolló usando reactivos de ECL (GE Healthcare, RPN2105) se formaron imágenes. El tratamiento con H561-4 provocó una reducción del HER2 total a las 24 h, con una reducción completa a las 48 h y a las 72 h (Figura 3B). Por el contrario, el tratamiento con trastuzumab no redujo los niveles de HER2 de forma detectable en los puntos temporales estudiados (Figura 3B). El tratamiento con H561-4 también provocó una reducción simultánea de pHER2. Esta reducción en la evidencia las 24 h, con una reducción adicional a las 48 h y sin pHER2 detectable permaneciendo a las 72 h. El tratamiento con trastuzumab solamente causó una ligera reducción de pHER2 en el punto temporal de 72 h (Figura 3B).

A continuación, se usó formación de imágenes con inmunofluorescencia para cuantificar la degradación de HER2. Las células SKBr3 se sembraron en una placa de 96 pocillos a 1×10^4 células/pocillo y se incubaron durante una noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Al día siguiente, los tratamientos (H561-4; trastuzumab [TR]) o los controles, (fragmento Fc de unión a antígeno de tipo silvestre [WT]; o control de isotipo de IgG1, Sigma I5154 [IgG/IgG1 ctrl]) se añadieron a los medios para dar una concentración final de 200 nM.

Las células se incubaron durante 24 h, 48 h o 72 h a 37 °C, CO₂ al 5 %, el sobrenadante se eliminó, y las células se lavaron con PBS antes de fijarlas con formaldehído al 4 % en PBS durante 20 mins. Para la formación de imágenes de superficie celular, la mitad de las células se permeabilizaron a continuación en TritonX100 al 0,1 %/0,1 mg/ml de Glucosa en PBS para formación de imágenes de proteína total. A continuación, las células se lavaron y se bloquearon en FBS al 5 %/PBS durante 1 hora a TA, antes de su incubación durante 1 hora a TA con el anticuerpo primario diluido a 1:100 en PBS (Mouse Anti-Her2 MGR2, Enzo Life Sciences). A continuación, las células se lavaron dos veces y antes de su incubación durante 1 h a TA en la oscuridad con los 5 μ g/ml de anticuerpo secundario (alexa647 anti-ratón, Invitrogen A21237) y 1 μ g/ml de Hoechst (Invitrogen, 33342). A continuación, las células se lavaron y se almacenaron en NaN₃ al 0,05 % en PBS hasta que se leyeron en el ImageXpress Micro (Molecular Devices). El análisis se realizó con formación de imágenes a 40x, la función de puntuación de múltiples ondas se usó para realizar recuento de los núcleos celulares y el número de células con tinción positiva para HER2, y a continuación se calculó el porcentaje de células positivas para HER2.

El tratamiento con H561-4 de células SKBr3 a 200 nM dio como resultado una disminución de HER2 tanto de superficie celular como total. La reducción de los niveles de HER2 era detectable después de 24 horas de tratamiento en puntos temporales en aumento (48 horas y 72 horas) (Figura 3C). El tratamiento con el anticuerpo de control, trastuzumab, no dio como resultado una disminución detectable de los niveles de HER2 (Figura 3C).

El tratamiento con H561-4 causa apoptosis dependiente de caspasa

Las células SKBr3 se sembraron a $7,5 \times 10^4$ células/ml en una placa de 96 pocillos con 100 μ l por pocillos se incubaron durante una noche a 37 °C y CO₂ al 5 %. Los tratamientos al día siguiente (H561-4, trastuzumab, fragmento Fc de unión a antígeno de tipo silvestre (WT) o control isotipo de IgG1) se añadieron a los pocillos en medios para dar concentraciones finales de 1000 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM y 0,01 nM, más controles sin tratar. Las células se incubaron durante 5 días a 37 °C and CO₂ al 5 % antes de medir la actividad de caspasa 3/7 usando el ensayo de Promega Caspasa-Glo 3/7. Se añadieron 50 μ l de reactivo Caspasa 3/7 Glo en cada pocillo, se mezclaron y a continuación la placa se incubó a TA durante 2 horas antes de medir la luminiscencia medido usando el lector de microplacas Synergy 4 (BIOTEK).

El tratamiento con H561-4 de células SKBr3 dio como resultado una inducción dependiente de la dosis significativa de la actividad de Caspasa 3/7 (Figura 3D). El tratamiento con el anticuerpo de control, trastuzumab, no dio como resultado un aumento detectable en la actividad de caspasa 3/7, ni lo hizo el tratamiento con el fragmento Fc de unión a antígeno de WT o control de isotipo de IgG1.

En resumen, los resultados mencionados anteriormente demuestran que el tratamiento con H561-4 de células SKBr3 inducía la apoptosis y daba como resultado internalización y degradación de HER2.

Ejemplo 4 – Estudios de eficacia *in vivo*: tratamiento con H561-4 de modelos de xenoinjerto de tumor derivado de paciente humano (PDX) con números de copias del gen HER2 superiores o iguales a 10

La eficacia *in vivo* de H561-4 en modelos tumorales que expresan HER2 con números de copias de genes superiores o iguales a 10 se evaluó usando ratones portadores de tumores de xenoinjerto derivado de paciente humano. Se usaron ratones inmunodeficientes que permitían el xenotrasplante y crecimiento de tumores humanos. A los ratones se les implantaron tumores a aproximadamente 5-7 semanas de edad aparte del modelo de PDX de GA0060 en el que los ratones fueron implantados a aproximadamente 6-8 semanas. El trabajo de GA0060 lo realizó

Crown BioScience que usa un procedimiento experimental ligeramente diferente al de las organizaciones de investigación clínica usado para los otros modelos de PDX. Cualquier diferencia en el procedimiento experimental de Crown BioScience se identifica a continuación. Todos los experimentos estaban aprobados por las autoridades locales y se realizaron de acuerdo con todas las leyes y directrices internacionales, nacionales y locales aplicables. Solamente se seleccionaron animales con una salud incuestionable para entrar en los procedimientos de ensayo. Se permitió que los ratones y aclimataran durante un periodo de al menos siete días después de su llegada y antes del inicio de cualquier experimento. El xenoinjerto de tumor usado como un tumor de ensayo en este estudio se derivó de una muestra de ensayo quirúrgico de un paciente que se implantó directamente por vía subcutánea en ratones atómicos, de ahí la denominación de “xenoinjerto de tumor derivado de parte” (PDX). Se obtuvieron fragmentos de tumores a partir de xenoinjertos en pasos en serie en ratones atómicos. Después de eliminarlos de los ratones donantes, los tumores se cortaron en fragmentos (2-5 mm de diámetro o 2-4 mm de diámetro para GA0060) y a continuación se usaron para implante subcutáneo unilateral en el costado de los ratones. En el momento de la clasificación de forma aleatoria, los animales portadores de tumores se estratificaron en los diversos grupos de acuerdo con el volumen tumoral. Para la clasificación de forma aleatoria solamente se consideraron los ratones que portan un tumor de tamaño apropiado (50 mm³ a 250 mm³, o 100 mm³ a 300 mm³ para GA0060).

Los ratones se clasificaron de forma aleatoria cuando el número requerido de ratones se calificaban para la clasificación de forma aleatoria. El día de la clasificación de forma aleatoria se denominó día 0. El primer día de dosificación también era el día 0. Los animales se sacrificaban si su tumor superaba un volumen de 2000 mm³. Si un animal se sacrificaba debido a la carga tumoral, entonces la última observación realizada (LOCF) se usaba para valores posteriores de volumen tumoral.

Para todos los modelos de PDX aparte del modelo de GA0060 PDX, las muestras de anticuerpo se diluyeron hasta 1 mg/ml en PBS y se administraron a 10 mg/kg. El régimen de dosificación fue cualquiera de una vez a la semana o dos veces a la semana dependiendo del estudio. El volumen del tumor absoluto (ATV) como se determina mediante medida de dos dimensiones con un calibre un día después del implante del tumor y a continuación dos veces a la semana (es decir, los mismos días en los que se pesaban los ratones). Los volúmenes del tumor se calcularon de acuerdo con la fórmula: $(a \times b^2) \times 0,5$, en la que **a** representa el diámetro mayor del tumor y **b** el diámetro del tumor perpendicular. La inhibición tumoral para un día en particular (T/C en %) se calculó a partir de la proporción de los valores del volumen tumoral absoluto medio (es decir, crecimiento medio de los tumores) de los grupos de ensayo con respecto a los de control multiplicado por 100 %.

$$T/C (\text{Día}_x) [\%] = \frac{\text{Volumen tumoral medio del grupo de ensayo el Día}_x - \text{Volumen tumoral medio del grupo de ensayo el Día}_0}{\text{Volumen tumoral medio del grupo de control el Día}_x - \text{Volumen tumoral medio del grupo de control el Día}_0} \times 100$$

El Día x representa cualquier día en el que se observó la T/C mínima (óptima). El Día 0 era el primer día de dosificación.

Para todos los modelos de PDX aparte del modelo de PDX de GA0060, el valor del % de T/C mínima (u óptima) registrado para un grupo de ensayo en particular durante un experimento representa la eficacia antitumoral máxima para el respectivo tratamiento. Los valores de T/C se calculaban si al menos un 50 % de los animales clasificados de forma aleatoria en un grupo estaban vivos el día en cuestión.

Para el modelo de PDX de GA0060, las muestras de anticuerpo se diluyeron a 6 mg/ml en PBS y se administraron a 60 mg/kg. El régimen de dosificación era dos veces a la semana dependiendo del estudio. El volumen tumoral absoluto (ATV) como se determina mediante medida de dos dimensiones con un calibre un día después del implante del tumor y a continuación dos veces a la semana. Los volúmenes tumorales se calcularon de acuerdo con la fórmula: $(a \times b^2) \times 0,5$ en la que **a** representa el diámetro más grande del tumor y **b** el diámetro perpendicular del tumor. La inhibición tumoral para un día en particular (T/C en %) se calculó a partir de la proporción de los valores del volumen tumoral absoluto medio de grupos de ensayo con respecto a grupos de control multiplicado por 100 %. La diferencia entre las dos ecuaciones de T/C se explica en el Ejemplo 7.

$$T/C (\text{Día}_x) [\%] = \frac{\text{Volumen tumoral absoluto medio del grupo de ensayo el Día}_x}{\text{Volumen absoluto medio del grupo de control el Día}_x} \times 100$$

en la que x es aproximadamente un periodo de dosis después de la dosis final si al menos un 50 % de los animales en un grupo estaba vivo.

Para simplicidad, esta ecuación se debería denominar ecuación de T/C actualizada.

Eficacia de H561-4 en modelo GXF281 de PDX gástrico

5 GXF281 se aisló a partir de un adenocarcinoma primario del estómago de un paciente de género masculino de 46 años de edad y se estudió en ratones atímicos en RMNI con Oncotest (Freiburg, Alemania). H561-4 (10 mg/kg), trastuzumab (10 mg/kg) y PBS como un control de vehículo (10 ml/kg) se inyectaron una vez a la semana durante 5 semanas. Cada grupo contenía 6 ratones. El volumen tumoral se midió dos veces a la semana hasta 81 días y el volumen tumoral absoluto medio se representó (Figura 4A). Los tratamientos de cinco semanas con H561-4 dieron como resultado una regresión tumoral completa (valor mínimo de T/C inferior a un 0 %), mientras que los tratamientos de cinco semanas con trastuzumab dieron como resultado una eficacia solamente moderado (T/C mínima de un 30 %).

Eficacia de H561-4 en modelo GXA3039 de PDX gástrico

15 GXA3039 se aisló a partir de un adenocarcinoma primario del estómago de un paciente de género masculino de 65 años de edad y se estudió en ratones atímicos en RMNI con Oncotest (Freiburg, Alemania). H561-4 (10 mg/kg), trastuzumab (10 mg/kg) y PBS como un control de vehículo (10 ml/kg) se inyectaron una vez a la semana durante 4 semanas. Cada grupo contenía 5 ratones. El volumen tumoral se midió dos veces a la semana hasta 91 días y el volumen tumoral absoluto medio se representó (Figura 4B). Los tratamientos de cuatro semanas con H561-4 dieron como resultado una regresión tumoral completa (valor mínimo de T/C inferior a un 0 %), mientras que los tratamientos de cuatro semanas con trastuzumab dieron como resultado una eficacia solamente menor (T/C mínima de un 88 %).

Eficacia de H561-4 en modelo CXF1991 de PDX Colorrectal

30 CXF1991 se aisló a partir de un adenocarcinoma primario del colon de una paciente de género femenino de 59 años de edad y se estudió en ratones atímicos en RMNI con Oncotest (Freiburg, Alemania). H561-4 (10 mg/kg), trastuzumab (10 mg/kg) y PBS como un control de vehículo (10 ml/kg) se inyectaron una vez a la semana durante 6 semanas. Cada grupo contenía 5 ratones. El volumen tumoral se midió dos veces a la semana hasta 62 días y el volumen tumoral absoluto medio se representó (Figura 4C). Los tratamientos de seis semanas con H561-4 dieron como resultado una regresión tumoral completa (valor mínimo de T/C inferior a un 0 %), mientras que los tratamientos de seis semanas con trastuzumab dieron como resultado una eficacia solamente menor (T/C mínima de un 57 %).

Eficacia de H561-4 en modelo CXF2102 de PDX Colorrectal

40 CXF2102 se aisló de una metástasis de hígado de un adenocarcinoma del colon de paciente y se estudió en ratones atímicos en RMNI con Oncotest (Freiburg, Alemania), la edad y el género de este paciente no se conoce. H561-4 (10 mg/kg), trastuzumab (10 mg/kg) y PBS como un control de vehículo (10 ml/kg) se inyectaron una vez a la semana durante 4 semanas. Cada grupo contenía 5 ratones. El volumen tumoral se midió dos veces a la semana hasta 58 días y el volumen tumoral absoluto medio se representó (Figura 4D). Los tratamientos de cuatro semanas con H561-4 dieron como resultado una regresión tumoral significativa (valor mínimo de T/C inferior a un 0 %), mientras que los tratamientos de seis semanas con trastuzumab no provocaban ningún efecto significativo (T/C mínima de un 76 %).

Eficacia de Eficacia de H561-4 en modelo GXA3054 de PDX gástrico

50 GXA3054 se aisló de un tumor primario de un adenocarcinoma del estómago de un paciente de género masculino de 65 años de edad y se estudió en ratones atímicos en RMNI con Oncotest (Freiburg, Alemania). H561-4 (10 mg/kg), y PBS como un control de vehículo (10 ml/kg) se inyectaron una vez a la semana durante 5 semanas. Se produjo una interrupción de la dosificación durante 4 semanas, a continuación la dosificación semanal se reanudó durante 4 semanas. Cada grupo contenía 5 ratones, un único grupo de trastuzumab no se incluyó en este modelo. El volumen tumoral se midió dos veces a la semana hasta 100 días y el volumen tumoral absoluto medio se representó (Figura 4E). Los tratamientos a la semana con H561-4 dieron como resultado regresión del tumor (valor mínimo de T/C de un 17 %).

Eficacia de H561-4 en modelo GXA3038 de PDX gástrico

60 GXA3038 se aisló de un tumor primario de un adenocarcinoma del estómago de un paciente de género masculino de 63 años de edad y se estudió en ratones atímicos en RMNI con Oncotest (Freiburg, Alemania). H561-4 (10 mg/kg), y PBS como un control de vehículo (10 ml/kg) se inyectaron una vez a la semana durante 5 semanas. Se produjo una interrupción de la dosificación durante 1 semana, a continuación la dosificación semanal se reanudó durante 4 semanas. Cada grupo contenía 5 ratones, un único grupo de trastuzumab no se incluyó en este modelo. El volumen tumoral se midió dos veces a la semana hasta 77 días y el volumen tumoral absoluto medio se representó (Figura 4F). Los tratamientos a la semana con H561-4 dieron como resultado una regresión menor del tumor (valor

mínimo de T/C de un 55 %).

Eficacia de H561-4 en modelo HBCx-13B de PDX de mama

5 HBCx-13B se aisló de un carcinoma con metástasis linfoide y se estudió en ratones atímicos (Hsd; Athymic Nude-Fox1nu) de Xentech (Evry, Francia). H561-4 (10 mg/kg), trastuzumab (10 mg/kg) y PBS como un control de vehículo (10 ml/kg) se inyectaron dos veces a la semana durante 8 semanas. Cada grupo contenía 9 ratones. El volumen tumoral se midió dos veces a la semana hasta 56 días y el volumen tumoral absoluto medio se representó (Figura 4G). Los dos tratamientos a la semana con H561-4 dieron como resultado una regresión tumoral significativa (valor
10 mínimo de T/C de un 7 %), mientras que los seis tratamientos a la semana con trastuzumab dieron como resultado una eficacia solamente menor (T/C mínima de un 48 %).

Eficacia de H561-4 en modelo GA0060 de PDX Gástrico

15 GA0060 se aisló de cáncer gástrico humano y se estudió en ratones atímicos BALB/c de Crown BioScience (Beijing, China). H561-4 (30 y 60 mg/kg), trastuzumab (30 mg/kg) y PBS como un control de vehículo (10 ml/kg) se inyectaron dos veces a la semana durante 6 semanas a cada grupo que contenía 10 ratones. El volumen tumoral se midió dos veces a la semana hasta 41 días y el volumen tumoral absoluto medio se representó (Figura 4H). Los valores de T/C se calcularon usando la ecuación T/C actualizada. Los tratamientos de seis semanas cada dos semanas con H561-4
20 dieron como resultado de una regresión tumoral menor (valor de T/C de un 49 % y un 60 %, a 60 y 30 mg/kg respectivamente), mientras que el tratamiento de seis semanas cada dos semanas con trastuzumab dio como resultado regresión del tumor (valor de T/C de un 25 %). La cantidad de 60 mg/kg de trastuzumab no se sometió a ensayo porque ya provocaba regresión tumoral a 30 mg/kg.

25 Ejemplo 5 – H561-4 muestra la eficacia en un modelo de resistencia a trastuzumab y pertuzumab

Como se muestra en el Ejemplo 4 mencionado anteriormente, H561-4 tiene un efecto antitumoral en modelos de xenoinjerto derivado de paciente (PDX) con número s de copias del gen HER2 superiores o iguales a 10. También se observó que el H561-4 tiene un efecto antitumoral significativamente superior al de trastuzumab en estos
30 modelos de PDX.

El Trastuzumab a menudo se usa en combinación con pertuzumab en la clínica para tratar cáncer de mama y gástrico. En el modelo de GXF281 de PDX gástrico, el tratamiento de combinación de trastuzumab y pertuzumab dio como resultado una reducción del crecimiento tumoral. Sin embargo, el tumor evolucionaba en ocasiones. El
35 tratamiento de tumores con H561-4 que habían evolucionado en el tratamiento de combinación de trastuzumab y pertuzumab dio como resultado una regresión tumoral completa. Estos resultados se muestran en la Figura 5.

Los fragmentos tumorales del tumor GXF281 derivado de paciente, se implantaron por vía subcutánea en ratones RMNI nu/nu anestesiados. Los ratones con un crecimiento tumoral adecuado (tumores de 50 mm³ -250 mm³) se clasificaron de forma aleatoria en 3 grupos como sigue a continuación:
40

- Grupo 1: 5 ratones recibieron 4 inyecciones i.v. a la semana de PBS a 10 ml/kg.
- Grupo 2: 20 ratones recibieron 4 inyecciones i.v. a la semana de trastuzumab a 10 mg/kg y pertuzumab a 10 mg/kg.
- 45 • Grupo 3: 5 ratones recibieron 4 inyecciones i.v. a la semana de H561-4 a 10 mg/kg

En el día 53 cuando el volumen tumoral medio de los ratones en el grupo 2 había alcanzado 500 mm³, los ratones del grupo 2 (el grupo de combinación de trastuzumab y pertuzumab) se clasificaron de forma aleatoria en 4 grupos como sigue a continuación:
50

- Grupo 4: 5 ratones no recibieron tratamiento adicional.
- Grupo 5: 5 ratones recibieron 7 inyecciones i.v. a la semana de trastuzumab a 10 mg/kg y pertuzumab a 10 mg/kg.
- Grupo 6: 5 ratones recibieron 7 inyecciones i.v. a la semana de H561-4 a 10 mg/kg
- 55 • Grupo 7: 5 ratones recibieron 7 inyecciones i.v. a la semana de H561-4 a 3,6 mg/kg

Los volúmenes tumorales se controlaron dos veces a la semana durante 105 días (Figura 5). El Grupo 3 mostraba una regresión tumoral completa con ningún ratón con un tumor detectable después del día 46 del estudio y no se volvió a producir crecimiento hasta el final del estudio (día 105). El Grupo 2 presentaba crecimiento tumoral más lento que el grupo de control (grupo 1). La dosificación repetida de ratones con trastuzumab y pertuzumab no ralentizar al crecimiento tumoral adicionalmente (el grupo 4 y el grupo 5 tenían crecimiento tumoral similar). El tratamiento con H561-4 (a cualquiera de 10 mg/kg o 3,6 mg/kg) en ratones que habían evolucionado con el tratamiento de combinación de trastuzumab y pertuzumab dio como resultado una regresión significativa del tumor, el tamaño medio del tumor del grupo 6 era de 19 mm³ en el día 105 en comparación con 716 mm³ antes del
60 tratamiento con H561-4 en el día 53, y el tamaño tumoral medio del grupo 7 era de 37,5 mm³ en el día 105 en
65

comparación con 659 mm³ antes del tratamiento con H561-4 en el día 53.

Ejemplo 6 – H561-4 inhibe de forma selectiva del crecimiento tumoral en modelos de PDX con números de copias del gen HER2 superiores o iguales a 10

La actividad *in vivo* de H561-4 se estudió en 23 modelos diferentes de xenoinjerto derivado de paciente (PDX), todos los cuales se clasificaron como positivos para HER2 con IHC de acuerdo con los criterios usados por Oncotest. La eficacia del tratamiento con H561-4 y del tratamiento con trastuzumab se evaluó basándose en el valor mínimo de T/C, expresado como un porcentaje. El valor de T/C se calculó usando la siguiente ecuación:

$$T/C \text{ (Díax) [\%]} = \frac{\text{Volumen tumoral medio del grupo de ensayo el Día x} - \text{Volumen tumoral medio del grupo de ensayo el Día 0}}{\text{Volumen tumoral medio del grupo de control el Día x} - \text{Volumen tumoral medio del grupo de control el Día 0}} \times 100$$

El Día x representa cualquier día en el que se observaba la T/C mínima (óptima). El día 0 era el primer día de dosificación.

La Tabla 4 muestra los criterios de eficacia como se definen con los valores mínimos de T/C (en %):

-	Inactivo	T/C ≥ 65 %
+/-	Actividad límite	50 % ≤ T/C < 65 %
+	Actividad moderada	25 % ≤ T/C < 50 %
++	Actividad elevada	10 % ≤ T/C < 25 %
+++	Actividad muy elevada	5 % ≤ T/C < 10 %
++++	Remisión completa	T/C < 5 %

Determinación del Número de Copias del Gen HER2 en los modelos de tumor de PDX mediante PCR cuantitativa:

El ADN de cada uno de los tumores se proporcionó a una concentración inicial de 100 ng/μl y posteriormente se diluyó a 5 ng/μl en agua de calidad molecular (SIGMA n.º W4502-1L). Para la reacción de PCR se creó una mezcla maestra que consistía en Mezcla Maestra para Formación de Genotipo Taqman 2x (Invitrogen, n.º 371355), 1 μl conjunto de sonda y cebadores taqman de HER2 (Invitrogen, ID del Ensayo Genético: Hs00817646 N.º de Cat: 4400291) y 1 μl de conjunto de sonda y cebadores taqman de RNAsaP constitutiva (Invitrogen, n.º 4403326). Se añadieron 20 ng de ADN demuestra en dH₂O dando como resultado un volumen de reacción final de 20 ul. Las condiciones de PCR cuantitativa fueron las que siguen a continuación: Mantener a 95 °C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y a continuación 60 °C durante 60 segundos. Después de adquisición de datos de C_T (Umbral del Ciclo) sin procesar, un C_T manual de 0,2 y una auto-medida inicial se aplicaron a los resultados.

Todos los datos obtenidos se normalizaron con un gen constitutivo (conjunto de sonda y cebadores taqman de RNAsaP, Invitrogen, n.º 4403326) de los cuales se sabía que había 2 copias por célula. Los resultados de la PCR cuantitativa se expresaron en unidades arbitrarias (AU, relacionadas con el número de copias por célula). En primer lugar, para cada muestra, se calculó la diferencia entre el valor de C_T (Umbral del Ciclo) de un gen constitutivo y el gen HER2, como sigue a continuación:

$$\text{Expresión del gen diana} = 2^{(C_T \text{ del gen constitutivo (RNAsa P)} - C_T \text{ del gen HER2})}$$

Los resultados analizaron para amplificación lineal y se exportaron a la versión 2.0 del Software Copy Caller™ (Invitrogen) para determinación del número de copias del gen HER2. Se encontró que una muestra de referencia de ADN (Roche, n.º 11691112001) tenía 2 copias de HER2 (los valores de C_T del gen HER2 y gen del constitutivo eran iguales, lo que indica 2 copias por célula de HER2) y se incluyó en el ensayo para permitir la determinación exacta del número de copias y para permitir el ajuste de realización del ensayo. Se consideró que 2 AU era el valor normal para el gen HER2 en el ADN genómico de referencia. Cuando el número de copias obtenido para el ADN genómico estándar humano no era exactamente 2 AU, se aplicaba un multiplicador para convertirlo en 2 AU. Este multiplicador también se aplicaba a los resultados obtenidos para las muestras de tumor. El número de copias de genes para cada muestra se enumera en la Tabla 5.

La Tabla 5 muestra la eficacia como se define con los valores mínimos de T/C (en %) de modelos de PDX tratados con H561-4 y trastuzumab así como número de copias de genes (GCN) en cada una de las muestras de tumor de PDX sometidas a ensayo:

	número de copias del gen HER2	T/C (Tratamiento/% de volumen tumoral de control)	
		H561-4	Trastuzumab
Modelos de tumor de PDX con GCN de HER2 ≥ 10			
HBCx-13B	23	7	48
GXF281 Gástrico	15	< 0	30
GXA3039 Gástrico	25	< 0	88
GXA 3054 Gástrico	76	17	N/D
GXA3038 Gástrico	29	55	N/D
Colon CXF2102	35	< 0	76
Colon CXF1991	32	< 0	57
Modelos de tumor de PDX con GCN de HER2 < 10			
MAXF583 Mama	2	65	60
MAXF508 Mama	1	147	126
CXF647 Colon	2	76	47
CXF1103 Colon	2	86	41
CXF975 Colon	6	98	170
CXF1729 Colon	2	127	65
CXF260 Colon	2	68	68
CXF1034 Colon	2	155	56
GXA3067 Gástrico	9	98	N/D
GXA3005 Gástrico	2	106	47
LXFA983 Pulmón	4	71	86
LXFE690 Pulmón	2	121	59
OVXF1023 Ovario	2	115	74
PAXF736 Pancreático	3	62	N/D
PAXF2005 Pancreático	2	96	69

- 5 H561-4 tenía eficacia en 6 de 7 modelos de PDX con un número de copias del gen HER2 (GCN) superior o igual a 10, mientras que solamente había actividad límite en 2 de los modelos de PDX con un GCN de HER2 inferior a 10. El trastuzumab tenía actividad moderada en 2 modelos de PDX con un GCN superior o igual a 10 y actividad límite en otro. En los modelos de PDX con un GCN inferior a 10, el trastuzumab tenía actividad límite en 3 modelos de PDX y actividad moderada en otros 3 modelos. La Figura 6 muestra un diagrama de dispersión de los valores de T/C de tratamiento con H561-4 y trastuzumab en modelos de PDX con un GCN de HER2 superior o igual a 10, en comparación con modelos de PDX con GCN inferior a 10. El diagrama de dispersión muestra que H561-4 tiene eficacia estadísticamente más elevada en cánceres con GCN superior o igual a 10 en comparación con cánceres con GCN inferior a 10. La actividad del trastuzumab es independiente del valor del número de copias del gen HER2.
- 10
- 15 *Determinación de los niveles de ARNm en los modelos de tumor de PDX mediante PCR de Transcripción Inversa (RT) seguido de PCR cuantitativa:*

El ARNm de cada uno de los tumores se proporcionó a una concentración de 250 ng/μl. Se hizo transcripción inversa del ARNm usando el Kit de Transcripción Inversa de ADNc de Alta Capacidad (Invitrogen, n.º N8080234) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc transcrito se cuantificó a continuación usando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) para determinar la concentración de ADNc en ng/μl. El ADNc obtenido se diluyó a 25 ng/μl en agua de calidad molecular (SIGMA n.º W4502-1L). Se creó una mezcla maestra de reacción de PCR cuantitativa que consistía en Gene Mezcla Maestra de Expresión Genética Taqman 2x (Invitrogen, n.º 4369016), 1,25μl de conjuntos de sonda y cebadores taqman de HER2 (Invitrogen, Hs01001580_m1 n.º 4331182) y 1,25μl del conjunto de sonda y cebadores taqman de TBP humano constitutivo (Invitrogen, Hs00427620_m1 n.º 4331182). Se añadieron 50 ng de ADNc de muestra junto con dH₂O para producir un volumen de reacción final de 25 μl. Las condiciones de PCR cuantitativa eran las siguientes: Mantener a 95 °C durante 10 minutos seguido de 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y a continuación 61 °C durante 30 segundos. Después de adquisición de datos de C_T (Umbral del Ciclo) sin procesar, un C_T manual de 0,2 y una auto-medida inicial se aplicaron a los resultados.

20

25

30

Como referencia se usó un “ADNc de patrón humano” transcrito de forma inversa a partir de un “ARN de referencia humano universal” (Agilent Technologies, n.º 740000) preparado mediante combinación de 10 líneas celulares humanas, que se espera que tengan dos copias del gen HER2 por célula (ya que se considera que las líneas celulares tienen un perfil normal) a la misma concentración que el ADNc de la muestra de tumor. Se considera que este ADNc de patrón humano tiene un perfil de ARNm normal.

Todos los datos obtenidos se normalizaron mediante un gen constitutivo (conjunto de sonda y cebadores taqman de TBP humano constitutivo (Invitrogen, Hs00427620_m1 n.º 4331182) que se sabe que tiene un nivel de expresión constante a través de muchos tipos de tejidos. Los resultados de la PCR cuantitativa se expresaron en unidades arbitrarias (AU). En primer lugar, para cada muestra se calculó la diferencia entre el valor de C_T (Umbral del Ciclo) de un gen constitutivo y del gen HER2, como sigue a continuación:

$$\text{Expresión de HER2} = 2^{(C_T \text{ gen constitutivo (TBP)} - C_T \text{ gen HER2})}$$

Los resultados se analizaron para amplificación lineal y se exportaron a la versión 2.0 del Software Copy Caller™ (Invitrogen). Este software se usó para determinar el número de copias de ADNc de HER2 con respecto al número de copias de ADNc del gen constitutivo en las muestras de tumor, normalizado al número de copias de ADNc de HER2 en la muestra de ADNc de patrón humano.

La normalización se realizó ajustando 2 AU para que fueran el valor normal para el número de copias de ADNc de HER2 con respecto al número de copias de ADNc del gen constitutivo en el ADNc de patrón humano. Un multiplicador (constante) se aplicó para convertirlo en 2 AU. Este multiplicador (constante) también se aplicó a los resultados obtenidos para las muestras de tumor y el número de copias de ADNc resultante se enumera en la Tabla 6 como el nivel de ARNm.

es decir expresión de HER2 del ADNc patrón x constante = 2
 expresión de HER2 en la muestra de tumor x constante = número de copias de ADNc

En la que la constante es el multiplicador usado para normalizar la expresión de HER2 en el ADNc patrón para un valor de 2.

La Tabla 6 muestra la eficacia, se define con los valores mínimos de T/C (en %) de modelos de PDX tratados con H561-4 y trastuzumab así como los niveles de ARNm de HER2 para cada una de las muestras de tumor de PDX.

	Nivel de ARNm de HER2	T/C (Tratamiento/% de volumen tumoral de control)	
		H561-4	Trastuzumab
Modelos de tumor de PDX con ARNm de HER2 > 200			
HBCx-13B	550	7	48
GXF281 Gástrico	392	< 0	30
GXA3039 Gástrico	775	< 0	88
GXA 3054 Gástrico	820	17	N/D
GXA3038 Gástrico	1930	55	N/D
Colon CXF2102	540	< 0	76
Colon CXF1991	229	< 0	57
Modelos de tumor de PDX con ARNm de HER2 < 200			
MAXF583 Mama	12	65	60
MAXF508 Mama	15	147	126
CXF647 Colon	11	76	47
CXF1103 Colon	10	86	41
CXF975 Colon	15	98	170
CXF1729 Colon	5	127	65
CXF260 Colon	3	68	68
CXF1034 Colon	14	155	56
GXA3067 Gástrico	71	98	N/D
GXA3005 Gástrico	16	106	47
LXFA983 Pulmón	6	71	86
LXFE690 Pulmón	7	121	59
OVXF1023 Ovario	17	115	74
PAXF736 Pancreático	26	62	N/D

PAXF2005 Pancreático	8	96	69
----------------------	---	----	----

5 H561-4 tenía eficacia en 6 de 7 modelos de PDX con un nivel de ARNm de HER2 ≥ 200 en el tumor, y eficacia en todos los modelos de PDX con un nivel de ARNm de HER2 ≥ 200 y ≤ 820 en el tumor, mientras que solamente había actividad límite en 2 de los modelos de PDX con un nivel de ARNm de HER2 < 200 en el tumor. El nivel de ARNm de HER2 en los modelos que tenían niveles de ARNm ≤ 820 era 168, mientras que para todos los modelos sometidos a ensayo el nivel de ARNm de HER2 era 248. El trastuzumab tenía actividad moderada en 2 modelos de PDX con un nivel de ARNm de HER2 ≥ 200 y actividad límite en otros. En los modelos de PDX con un nivel de ARNm < 200, el trastuzumab tenía actividad límite en 3 modelos de PDX y actividad moderada en otros 3 modelos. La Figura 7 muestra un diagrama de dispersión de los valores de T/C de tratamiento con H561-4 y trastuzumab en modelos de PDX con un nivel de ARNm de HER2 superior o igual a 200 en el tumor, en comparación con modelos de PDX con un nivel de ARNm inferior a 200 en el tumor. Esto muestra que H561-4 tiene eficacia estadísticamente más elevada en cánceres con niveles de ARNm de HER2 ≥ 200, en comparación con cánceres con un nivel de ARNm de HER2 < 200. En particular, los datos muestran que H561-4 tiene eficacia estadísticamente más elevada en cánceres con niveles de ARNm de HER2 ≥ 200 y ≤ 820, en comparación con modelos de PDX con niveles de ARNm de HER2 < 200 y > 820. La actividad de trastuzumab es independiente del nivel de ARNm de HER2 en el intervalo sometido a ensayo.

20 Ejemplo 7 – H561-4 inhibe de forma selectiva el crecimiento tumoral en modelos de PDX con números de copias del gen HER2 superiores o iguales a 10 usando una medida actualizada de valores de T/C.

La eficacia del tratamiento con H561-4 y del tratamiento con trastuzumab se evaluó adicionalmente usando una ecuación diferente para calcular los valores de T/C.

25 Los valores de T/C se calcularon usando la siguiente ecuación:

$$T/C (Día_x) [\%] = \frac{\text{Volumen tumoral absoluto medio del grupo de ensayo el Día}_x}{\text{Volumen absoluto medio del grupo de control el Día}_x} \times 100$$

30 en la que x es aproximadamente un periodo de dosis después de la dosis final si al menos un 50 % de los animales en un grupo estuviera vivo.

Como se muestra en el Ejemplo 4 mencionado anteriormente, esta ecuación se denomina la ecuación T/C actualizada. Esta ecuación actualizada se diseñó para facilitar la comparación de datos recogidos de diferentes institutos de investigación clínica.

35 Se introdujeron dos cambios en la ecuación T/C actualizada en comparación con la ecuación T/C usada en el Ejemplo 6: definiendo el punto temporal para comparación con Día x y eliminando la sustracción basal.

40 En la fórmula usada anteriormente T/C, el Día x indicaba cualquier día en el que se observaba la T/C mínima (óptima). Por lo tanto, x podría ser cualquier día durante todo el periodo de cada experimento. En la ecuación T/C actualizada, el Día x se convierte en un punto temporal fijo de aproximadamente un periodo de dosis después de la dosis final (si al menos un 50 % de los animales en un grupo estuviera vivo). Por lo tanto, la fórmula T/C actualizada tiene la ventaja de estandarizar el Día x, lo que permite a los inventores comparar el efecto de tratamientos de diferentes estudios. Aunque la etapa de sustracción basal no se incluía en la ecuación T/C actualizada, esto se compensaba con la distribución clasificada de ratones inoculados uniformemente para obtener tamaños iguales de tumor medio a través de diferentes grupos de ensayo. Los valores de los ratones eliminados debido a carga tumoral se consideraron más allá del día del sacrificio usando la metodología de Última Observación Desarrollada si ésta aumentaba la media del grupo.

50 Usando esta ecuación actualizada, los inventores volvieron a evaluar los valores de T/C de los 23 modelos de xenoinjerto derivado de pacientes diferentes (PDX) establecidos en las Tablas 5 y 6, y resumidos junto con el número de copias del gen HER2 (GCN) en la Tabla 7, y con el nivel de ARNm de HER2 en la Tabla 8. Los valores de eficacia de T/C se determinaron como se muestra en la Tabla 4.

55 Además, los datos se obtuvieron con respecto al tratamiento de modelos de PDX de GXA 3054 Gástrico y GXA3038 Gástrico con trastuzumab y esta información también se incluyó en las Tablas 7 y 8.

La Tabla 7 muestra la eficacia como se define con los valores de T/C (%) (usando la fórmula T/C actualizada) de modelos de PDX tratados con H561-4 y trastuzumab.

	Número de copias del gen HER2 por qPCR	T/C (Tratamiento/% de volumen tumoral de control)	
		H561-4	Trastuzumab
Modelos de tumor de PDX con GCN de HER2 \geq 10 por qPCR			
HBCx-13B	23	14,0	63,6
GXF281 Gástrico	15	1,9	54,0
GXA3039 Gástrico	25	1,4	93,7
GXA 3054 Gástrico	76	15,5*	33,4
GXA3038 Gástrico	29	57,0*	48,8
Colon CXF2102	35	11,1	58,3
Colon CXF1991	32	8,8	77,6
GA0060 Gástrico	43	49,2*	25,1*
Modelos de tumor de PDX con GCN de HER2 < 10 por qPCR			
MAXF583 Mama	2	85,3	68,5
MAXF508 Mama	1	150,7	141,1
CXF647 Colon	2	85,9	67,4
CXF1103 Colon	2	115,0	76,1
CXF975 Colon	6	90	147
CXF1729 Colon	2	129,9	67,6
CXF260 Colon	2	83,1	80,3
CXF1034 Colon	2	173,6	66,6
GXA3067 Gástrico	9	95,9	N/D
GXA3005 Gástrico	2	148,3	63,9
LXFA983 Pulmón	4	76,8	103,4
LXFE690 Pulmón	2	113,8	74,7
OVXF1023 Ovario	2	112,7	78,9
PAXF736 Pancreático	3	84,0	N/D
PAXF2005 Pancreático	2	145,2	104,4
**Estos grupos se trataron con 30* y 60* mg/kg de H561-4 para alcanzar la eficacia máxima observada en el estudio <i>in vivo</i> .			

- 5 H561-4 tenía eficacia en 7 de 8 modelos de PDX con número de copias del gen HER2 superior a 10, 6 de los cuales tenían actividad elevada, mientras que no había actividad que ninguno de los modelos de PDX con GCN de HER2 inferior la 10. El trastuzumab tenía actividad moderada en 3 modelos de PDX con GCN superior a 10 y actividad límite en otros 3, pero ninguno de ellos mostraba actividad elevada. En los modelos de PDX con GCN inferior a 10 el trastuzumab tenía actividad límite en 1 modelo.
- 10 La Figura 8 muestra un diagrama de dispersión de los valores de T/C de tratamiento con H561-4 y trastuzumab en modelos de PDX con GCN de HER2 superior a 10 en comparación con modelos de PDX con GCN inferior a 10. El diagrama de dispersión muestra que H561-4 tiene eficacia estadísticamente más elevada en modelos de PDX con GCN superior a 10 en comparación con modelos de PDX con GCN inferior a 10. Las actividades medias de trastuzumab en modelos de PDX con GCN superior a o inferior a 10 son ambas superiores al 50 %, lo que apoya la
- 15 noción de que el valor del número de copias del gen HER2 no es predictivo para la eficacia de trastuzumab.

En resumen, los valores de T/C obtenidos usando la ecuación T/C actualizada condujeron a la misma conclusión que anteriormente (que se describe en el Ejemplo 6).

La Tabla 8 muestra la eficacia como se define con los valores de T/C (%) (usando la fórmula T/C actualizada) de modelos de PDX tratados con H561-4 y trastuzumab.

	número de ARNm de HER2 con RT-PCR	T/C (Tratamiento/% de volumen tumoral de control)	
		H561-4	Trastuzumab
Modelos de tumor PDX con ARNm de HER2 ≥ 200 con RT-PCR			
HBCx-13B	550	14,0	63,6
GXF281 Gástrico	392	1,9	54,0
GXA3039 Gástrico	775	1,4	93,7
GXA 3054 Gástrico	820	15,5*	33,4
GXA3038 Gástrico	1930	57,0*	48,8
Colon CXF2102	540	11,1	58,3
Colon CXF1991	229	8,8	77,6
GA0060 Gástrico	1045	49,2 ⁺	25,1*
Modelos de tumor PDX con ARNm de HER2 < 200 con RT-PCR			
MAXF583 Mama	12	85,3	68,5
MAXF508 Mama	15	150,7	141,1
CXF647 Colon	11	85,9	67,4
CXF1103 Colon	10	115,0	76,1
CXF975 Colon	15	90	147
CXF1729 Colon	5	129,9	67,6
CXF260 Colon	3	83,1	80,3
CXF1034 Colon	14	173,6	66,6
GXA3067 Gástrico	71	95,9	N/D
GXA3005 Gástrico	16	148,3	63,9
LXFA983 Pulmón	6	76,8	103,4
LXFE690 Pulmón	7	113,8	74,7
OVXF1023 Ovario	17	112,7	78,9
PAXF736 Pancreático	26	84,0	N/D
PAXF2005 Pancreático	8	145,2	104,4
**Estos grupos se trataron con 30* y 60 ⁺ mg/kg de H561-4 para alcanzar la eficacia máxima observada en el estudio <i>in vivo</i> .			

5 H561-4 tenía eficacia en 7 de 8 modelos de PDX con un nivel de ARNm de HER2 ≥ 200 en el tumor, y eficacia en todos los modelos de PDX con un nivel de ARNm de HER2 ≥ 200 y ≤ 820 en el tumor, mientras que no había actividad en ninguno de los modelos de PDX con un nivel de ARNm de HER2 < 200 en el tumor. Trastuzumab tenía actividad moderada en 3 modelos de PDX con un nivel de ARNm de HER2 ≥ 200 y actividad límite en otros 3, pero ninguno de ellos mostraba actividad elevada. En los modelos de PDX con un nivel de ARNm < 200, trastuzumab tenía actividad límite en 1 modelo.

10 La Figura 9 muestra un diagrama de dispersión de los valores de T/C de tratamiento con H561-4 y trastuzumab en modelos de PDX con un nivel de ARNm de HER2 superior o igual a 200 en el tumor, en comparación con modelos de PDX con un nivel de ARNm inferior a 200 en el tumor. El diagrama de dispersión muestra que H561-4 tiene eficacia estadísticamente más elevada en modelos de PDX con un nivel de ARNm de HER2 ≥ 200 and ≤ 820 en comparación con modelos de PDX con niveles de ARNm de HER2 < 200 y > 820. Las actividades medias de trastuzumab en modelos de PDX en los grupos de ARNm de HER2 ≥ 200 y el grupo < 200 son ambos superiores a un 50 %, lo que apoya la noción de que el valor del número de copias del gen HER2 no es predictivo para la eficacia de trastuzumab.

20 Los valores de T/C obtenidos usando la ecuación T/C actualizada condujeron a la misma conclusión que anteriormente.

25 Ejemplo 8 - H561-4 inhibe de forma selectiva los modelos de PDX con números de copias del gen HER2 superiores a 18 en los que el número de copias de genes se determina por FISH

Los números de copias del gen HER2 determinados por FISH en relación a la actividad *in vivo* de H561-4 se estudio en 17 modelos diferentes de xenoinjerto derivado de paciente (PDX), incluyendo modelos de mama, gástrico y

colon. La eficacia del tratamiento con H561-4 y del tratamiento con trastuzumab se evaluó basándose en el valor de T/C usando la ecuación T/C actualizada:

$$T/C (\text{Día}_x) [\%] = \frac{\text{Volumen tumoral absoluto medio del grupo de ensayo el Día}_x}{\text{Volumen absoluto medio del grupo de control el Día}_x} \times 100$$

5

Los criterios de eficacia tal como se definen con los valores de T/C se establecen en la Tabla 4.

Determinación del Número de Copias del Gen HER2 en los modelos de tumor de PDX mediante Hibridación In Situ con Fluorescencia (FISH):

10

A partir de los modelos de PDX se obtuvieron muestras de ensayo de tejido de cáncer fijadas en formalina, embebidas en parafina (FFPE). El ensayo de FISH se realizó usando el kit II de sondas de ADN de HER-2 PathVysion (Abbott Molecular n.º 06N46-030). Este ensayo usaba recuento directo de las señales de HER2 sin normalización con respecto a la señal de CEP17. Los portaobjetos de tejido se trataron previamente para su desparafinización en xileno tres veces durante 5 minutos, seguido de rehidratación en disolventes metilados industriales (IMS) dos veces durante 5 minutos e incubación de tampón citrato a pH 6,0 a 95-99 °C durante 30 minutos. Después del tratamiento previo, los portaobjetos se incubaron a 37 °C durante 20 minutos en tampón de proteasa pepsina para la digestión de proteasa. Para el marcado eficaz de la secuencia de ADN de HER2 diana, los portaobjetos se calentaron a 73 °C durante 5 minutos para desnaturalización de ADN, seguido de hibridación de sonda a 37 °C durante 14-18 horas. Los sucesos de hibridación no específicos se retiraron mediante lavado en el tampón de hibridación posterior a 72 °C durante 2 minutos. A continuación, los portaobjetos se incubaron con contratinción de DAPI durante 15 minutos en la oscuridad hasta su visualización usando microscopía de fluorescencia para recuento de señales. El recuento se evaluó basándose en 20-60 células tumorales por muestra y se tomó un promedio del número de copias del gen HER2. El número de copias del gen HER2 determinado por FISH para cada muestra se enumera en la Tabla 9.

15

20

25

La Tabla 9 muestra la eficacia tal como se define con los valores de T/C (en %) de modelos de PDX tratados con H561-4 y trastuzumab así como número de copias de genes (GCN) en cada tumor de PDX sometido a ensayo:

	número de copias del gen HER2 (por FISH)	T/C Tratamiento/% de volumen tumoral de control)	
		H561-4	Trastuzumab
Modelos de tumor de PDX con GCN de HER2 ≥ 18 (por FISH)			
HBCx-13B	21	14,0	63,6
GXF281 Gástrico	25	1,9	54,0
GXA3039 Gástrico	30	1,4	93,7
GXA 3054 Gástrico	40	15,5*	33,4
GXA3038 Gástrico	30	57,0*	48,8
Colon CXF2102	25	11,1	58,3
Colon CXF1991	25	8,8	77,6
GA0060 Gástrico	40	49,2 ⁺	25,1
Modelos de tumor de PDX con GCN de HER2 < 18 (por FISH)			
GXA3067 Gástrico	17	95,9	N/D
MAXF583 Mama	3	85,3	68,5
MAXF508 Mama	2	150,7	141,1
CXF647 Colon	2	85,9	67,4
CXF1103 Colon	2	115,0	76,1
CXF1729 Colon	2	129,9	67,6
CXF260 Colon	2	83,1	80,3
CXF1034 Colon	2	173,6	66,6
GXA3005 Gástrico	2	148,3	63,9
**Estos grupos se tratan con 30* y 60 ⁺ mg/kg de H561-4 para alcanzar la eficacia máxima observada en el estudio <i>in vivo</i> .			

30

H561-4 tenía eficacia en 7 de 8 modelos de PDX con número de copias del gen HER2 superiores a 18 como se determina mediante FISH, 6 de los cuales tenían actividad elevada, mientras que no había actividad en ninguno de

los modelos de PDX con GCN de HER2 inferior a 18. El trastuzumab tenía actividad moderada en 3 modelos de PDX con GCN superior a 18 y actividad límite en otros 3, pero ninguno de ellos mostraba actividad elevada. En los modelos de PDX con GCN inferior a 18, el trastuzumab tenía actividad límite en 1 modelo.

5 La Figura 10 muestra un diagrama de dispersión de los valores de T/C de tratamiento con H561-4 y trastuzumab en modelos de PDX con GCN de HER2 superiores a 18 en comparación con modelos de PDX con GCN inferior a 18. El diagrama de dispersión muestra que H561-4 tiene eficacia estadísticamente más elevada en modelos de PDX con GCN superior a 18 en comparación con modelos de PDX con GCN inferior a 18. La actividad del trastuzumab es independiente del valor del número de copias del gen HER2. Las actividades medias de trastuzumab en modelos de PDX en el grupo con GCN superior a 18 o en el grupo con GCN inferior a 18 son ambas superiores a un 50 %, lo que apoya la noción de que el valor del número de copias del gen HER2 no es predictivo para la eficacia de trastuzumab.

15 Ejemplo 9 – Determinación del número de copias del gen HER2 por FISH y qPCR su relación

Como se muestra en el Ejemplo 6 y en el Ejemplo 8 mencionados anteriormente, los números de copias del gen HER2 se determinaron por qPCR y FISH. El GCN de HER2 en tumores de PDX determinado por la qPCR variaba de 1 a 76 copias, mientras que el GCN en estos tumores como se determina mediante FISH variaba de 2 a 40 copias. Estadísticamente es más probable que los tumores con amplificación elevada del gen HER2 determinada por cualquier método (GCN superior o igual a 10 por qPCR o GCN superior o igual a 18 por FISH) respondan al tratamiento con H561-4. La relación del GCN determinada por los dos métodos se evaluó en 17 tumores de PDX en los que los datos recogidos con ambos métodos están disponibles. Los números de copias del gen HER2 determinados por ambos métodos se enumeran en la Tabla 10.

25 Tabla 10 Resumen de GCN de HER2 en los tumores de PDX determinado por qPCR y FISH

	GCN de HER2 (qPCR)	GCN de HER2 (FISH)
GXA3054 Gástrico	76	40
GA0060 Gástrico	43	40
CXF2102 Colon	35	25
CXF1991 Colon	32	25
GXA3038 Gástrico	29	30
GXA3039 Gástrico	25	30
HBCx-13B	23	21
GXF281 Gástrico	15	25
GXA3067 Gástrico	9	17
MAXF583 Mama	2	3
CXF1034 Colon	2	2
CXF647 Colon	2	2
CXF1103 Colon	2	2
CXF1729 Colon	2	2
GXA3005 Gástrico	2	2
CXF260 Colon	2	2
MAXF508 Mama	1	2

30 El análisis de correlación se realizó para definir la relación entre el GCN de HER2 determinado por qPCR y por FISH. El diagrama de dispersión mostrado en la Figura 11 muestra la relación de GCN determinada por FISH y qPCR en cada muestra de tumor de PDX y los puntos caen cerca de la línea diagonal que representa la correlación 1:1. El GCN determinado por los dos métodos son altamente correlativos basándose en el análisis de correlación (Pearson $r = 0,90$; $p < 0,0001$; 95 % de CI = 0,74-0,96).

Ejemplo 10 – Investigación de la variabilidad de la puntuación de IHC de HER2 determinada con diferentes protocolos.

5 El estado de amplificación de HER2 se ha usado como un factor de pronóstico. El ensayo de inmunohistoquímica (IHC) es un método usado normalmente para evaluar la expresión de la proteína HER2 en muestras de tejido mediante anticuerpos que se unen de forma específica al antígeno. Como se ha indicado anteriormente, la naturaleza semicuantitativa del IHC se refiere a que puede ser inexacto y no siempre proporciona una lectura precisa. Además, dados diversos protocolos del ensayo, algunos anticuerpos HER2 y sistemas de puntuación están en uso, la variabilidad en los resultados del IHC de HER2 entre proveedores de ensayos de IHC podría ser una preocupación.

15 Aunque HercepTest se ha aprobado por la FDA como un ensayo de IHC estandarizado para determinación de la sobreexpresión de proteína HER2 en cánceres de mama y gástrico, en algunos estudios se ha informado que la mayoría de las muestras positivas para HER2 con HercepTest carecían de amplificación del gen HER2 como se determina mediante el ensayo de FISH (Jacobs *et al.*, 1999). Por otro lado, algunos cánceres de mama pueden presentar sobreexpresión de proteína HER2 en ausencia de amplificación genética, sin embargo, este fenómeno se observó anteriormente en un 7 % de los casos (Persons *et al.*, 1997). Estas discrepancias contradicen las prácticas clínicas actuales para considerar que la población positiva como 3+ para HercepTest se amplifica con HER2.

20 En este estudio, se usaron diferentes ensayos de IHC incluyendo HercepTest y el ensayo inmunohistoquímico desarrollado por Oncotest para identificar sobreexpresión de proteína HER2 en 22 tumores de PDX fijados con formalina, embebidos en parafina. El objetivo era investigar la fiabilidad de IHC como un biomarcador de H561-4.

25 Para el ensayo de IHC de HercepTest, se usó el protocolo del fabricante de HercepTest. En resumen, los tejidos de cáncer fijados con formalina, embebidos en parafina se desparafinizaron en xileno tres veces durante 5 minutos, seguido de rehidratación en disolventes metilados industriales (IMS) dos veces durante 5 minutos. Los portaobjetos se incubaron a continuación en Solución de Recuperación de Epítipo durante 40 minutos a 97 °C y se lavaron en tampón de lavado durante 20 minutos antes de la tinción. Los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo de HER2 de conejo anti-humano primario durante 30 minutos seguido de incubación con anticuerpo de carga anti-conejo secundario unido a peroxidasa de rábano picante durante 30 minutos. El cromógeno de DAB se aplicó para conversión enzimática para visualización de señales.

35 El ensayo inmunohistoquímico desarrollado por Oncotest se realizó desparafinizando primero irriga tan del tejido. Los portaobjeto se incubaron en Citrato Tri-Sódico 10 mM para recuperación de antígeno durante 20 minutos en microondas a 720 vatios. Las muestras se permeabilizaron con triton al 0,2 % X100 y se bloquearon con H₂O₂ al 3 % para investigar la peroxidasa endógena. Los portaobjetos se bloquearon para unión inespecífica en BSA al 10 % y se incubaron con anticuerpo de HER2 de conejo anti-humano policlonal (n.º de Cat A0485 de Dako) durante una noche a 4 °C. Los portaobjetos se incubaron al día siguiente con IgG de cabra anti-conejo biotinilada (n.º de Cat 111-065-045 de Jackson) durante 60 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario biotinilado se detectó por incubación con un complejo de avidina/enzima biotinilada (complejo ABC, n.º de Cat PK-4000 de Vector Lab) seguido de desarrollo de señal con cromógeno de DAB.

45 La directriz de puntuación de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) se usó con ambos métodos. En resumen, la sobreexpresión de proteína HER2 se clasifica en una escala de 0 a 3+. El nivel de tinción de IHC secciones de tejido tumoral determinado por el porcentaje de proteína HER2 que expresa tumor y la intensidad de la tinción de HER2 se usan para puntuar la expresión de proteína HER2. Las directrices para la puntuación de HER2 con IHC se muestran en la Tabla 11 que sigue a continuación (en 2013, la evaluación de IHC 2+ se actualizó desde 'débilmente positiva' (como se usaba en las directrices de 2007) a 'ambigua')

50 Tabla 11: Directrices de puntuación de IHC de la ASCO para sobreexpresión de proteína HER2

Puntuación para informe	evaluación de la sobreexpresión de proteína HER2	Patrón de tinción
0	Negativa	No se observa tinción o se observa tinción de la membrana en menos de un 10 % de las células tumorales
1+	Negativa	Se observa una tinción débil/apenas perceptible de la membrana en más de un 10 % de las células tumorales. Las células presentan tinción incompleta de la membrana.
2+	Débilmente positiva (Ambigua)	Se observa una tinción de débil a moderada completa de la membrana en más de un 10 % de células tumorales
3+	Fuertemente positiva	Se observa una tinción fuerte completa de la membrana en más de un 10 % de células tumorales.

Las puntuaciones de sobreexpresión de IHC de HER2 determinadas por HercepTest y con el método de IHC desarrollado por Oncotest para cada tumor de PDX sometido a ensayos y estudios de eficacia se enumeran en la Tabla 12. Los resultados de IHC de HER2 obtenidos con los dos métodos de tinción diferentes mostraban una amplia variación, especialmente los tumores con GCN de HER2 ≤ 10 por qPCR, a pesar del hecho de que tanto HercepTest como Oncotest usan la misma directriz de puntuación. Además, incluso la repetición entre el mismo método realizado con Oncotest (n = 1 con respecto a n = 2) mostraba incoherencia. Por lo tanto, se muestra que IHC varía considerablemente entre proveedores y dentro de múltiples ensayos con el mismo proveedor.

El número de casos negativos para HER2 son mucho más elevados con HercepTest en comparación con IHC realizado con Oncotest (8 casos con respecto a 2 casos para tumores sometidos a ensayo con ambos métodos). Por otro lado, se informó que HercepTest da como resultado una tasa de positividad más elevada (Jacobs *et al.*, 1999). En conjunto, estos resultados apuntan hacia la variación de los resultados de IHC de HER2. Algunos estudios anteriores han afirmado diferentes cuestiones que podrían conducir a variabilidad en el uso de ensayos de IHC para proteína HER2, incluyendo variabilidad en fijación de tejido de procesamiento y variabilidad en sensibilidad y especificidad del anticuerpo. Sin embargo, en el estudio actual, es improbable que la especificidad del anticuerpo primario sea la causa ya que el mismo anticuerpo se usó en ambos métodos.

La comparación de los resultados globales de IHC de HER2 con respecto a los resultados de GCN de HER2 y ARNm de HER2 (Ejemplo 7 y Ejemplo 8), el GCN de HER2 determinado por cualquiera de los métodos FISH o qPCR por el ARNm de HER2 son mucho más selectivos en la selección de una población positiva para biomarcador para que sea la población de pacientes sensibles a H561-4 ($p < 0,0001$; ensayo t para muestras no relacionadas o independientes).

La Figura 12 muestra un diagrama de dispersión de los valores de T/C de tratamiento con H561-4 y trastuzumab en modelos de PDX con sobreexpresión de proteína HER2 positiva en comparación con modelos de PDX con sobreexpresión de proteína HER2 negativa determinado por HercepTest. Aunque HercepTest era el kit de ensayo complementario aprobado por la FDA para seleccionar pacientes para tratamiento con Herceptin, en las 16 muestras sometidas al ensayo, la actividad de trastuzumab era independiente del estado de sobreexpresión de proteína HER2 ($p = 0,09$; ensayo t para muestras no relacionadas o independientes). Las actividades medias de trastuzumab en modelos de PDX en sobreexpresión de proteína HER2 tanto positiva como negativa son superiores a un 50 %, lo que sugiere la noción de que la sobreexpresión de la proteína HER2 no es altamente predictiva de la eficacia del trastuzumab.

De forma interesante, el diagrama de dispersión muestra que H561-4 tiene una eficacia estadísticamente más elevada en modelos de PDX que son sobreexpresión de proteína HER2 positiva en comparación con modelos de PDX con sobreexpresión de proteína HER2 negativa, cuando IHC se determina mediante HercepTest. Estos resultados demuestran que el estado de IHC de HER2 es más predictivo para la selección de la población que responde a H561-4 en lugar de a trastuzumab.

Tabla 12 Eficacia como se define con los valores de T/C (en %) de modelos de PDX tratados con H561-4 y trastuzumab así como puntuación de sobreexpresión de proteína HER2 determinada mediante HercepTest e IHC con Oncotest en cada tumor de PDX sometido a ensayo:

	Puntuación de IHC de sobreexpresión de HER2			T/C Tratamiento/Control % de volumen tumoral)	
	HercepTest	Oncotest n = 1	Oncotest n = 2	H561-4	Trastuzumab
Modelos de tumor PDX con GCN de HER2 ≥ 10 (con RT-PCR)					
HBCx-13B Mama	2+	N.D	N.D	14,0	63,6
GXF281 Gástrico	3+	3+	3+	1,9	54,0
GXA3039 Gástrico	3+	3+	3+	1,4	93,7
GXA 3054 Gástrico	3+	3+	3+	15,5*	33,4
GXA3038 Gástrico	3+	3+	3+	57,0*	48,8
CXF2102 Colon	3+	3+	3+	11,1	58,3
CXF1991 Colon	3+	3+	3+	8,8	77,6
GA0060 Gástrico	3+	N.D	N.D	49,2+	25,1
Modelos de tumor PDX con GCN de HER2 <10 (con RT-PCR)					
MAXF583 Mama	0	3+	2+	85,3	68,5
MAXF508 Mama	1+	3+	2+	150,7	141,1
CXF647 Colon	0	3+	2+	85,9	67,4
CXF1103 Colon	0	3+	1+	115,0	76,1
CXF1729 Colon	0	3+	2+	129,9	67,6

CXF260 Colon	0	2+	1+	83,1	80,3
CXF1034 Colon	1+	3+	3+ (2+)	173,6	66,6
GXA3067 Gástrico	3+	3+	2+	95,9	N.D
GXA3005 Gástrico	0	3+	2+	148,3	63,9
LXFA983 Pulmón	N.D	2+	1+	76,8	103,4
LXFE690 Pulmón	N.D	3+	2+	113,8	74,7
OVXF1023 Ovario	N.D	3+	2+	112,7	78,9
PAXF736 Pancreático	N.D	2+	1+	84,0	N.D
PAXF2005 Pancreático	N.D	2+	1+	145,2	104,4

**Estos grupos se tratan con 30* y 60* mg/kg de H561-4 para alcanzar una eficacia máxima observada en el estudio *in vivo*.

Listado de secuencias informal

Secuencia de nucleótidos del fragmento H561-4 de Fc de unión a antígeno (SEQ ID NO: 1)

5
 ACCTGCCCCCCTTGTCTCCTGCCCGGAGCTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCC
 CCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
 TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
 ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCAC
 CAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATC
 GAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGC
 CGGGACGAG***TTCTTACCTACTGGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGAT***
ATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTG
GACTCCGACGGCTCATTCTTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTG***GACCGGCGGAGATGGACCGCCGGC***
AACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCC
CTGAGCCCCGGCAAGTGATGAGAATTC

10 La secuencia "ACCTGCCCCCCTTGTCTCCT" al inicio de la secuencia de nucleótidos de H561-4 codifica parte de la región bisagra de IgG1. La secuencia que codifica el dominio CH2 de H561-4 está subrayada. La secuencia que codifica el dominio CH3 de H561-4 se muestra en letra itálica. La secuencia que codifica la parte del bucle estructural AB del dominio CH3 que se cree que está implicada en la unión a antígeno se muestra en negrita, y la parte de la secuencia que codifica el bucle estructural EF del dominio CH3 que se cree que está implicada en la unión a antígeno se muestra en negrita y con doble subrayado.

15 Secuencia de nucleótidos de la región bisagra de H561-4 de fragmento Fc de unión a antígeno (SEQ ID NO: 2)

ACCTGCCCCCCTTGTCTCCT

20 Secuencia de nucleótidos del dominio CH2 de H561-4 de fragmento Fc de unión a antígeno (SEQ ID NO: 3)

GCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCC
 CCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
 TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
 ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCAC
 CAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATC
 GAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAG

Secuencia de nucleótidos del dominio CH3 de H561-4 de fragmento Fc de unión a antígeno (SEQ ID NO: 4)

GAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGC
 CGGGACGAGTTCTTCACCTACTGGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGAT
 ATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTG
 GACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACCGGCGGAGATGGACCGCCGGC
 AACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCC
 CTGAGCCCCGGCAAG

5 Secuencia de nucleótidos que codifica la parte de la región del bucle estructural AB de H561-4 que se cree que está implicada en unión a antígeno (SEQ ID NO: 5)

TTCTTACCTACTGG

10 Secuencia de nucleótidos que codifica parte de la región del bucle estructural CD de H561-4 (SEQ ID NO: 6)

AACGGCCAGCCCGAG

15 Secuencia de nucleótidos que codifica la parte de la región del bucle estructural EF de H561-4 que se cree que está implicada en unión a antígeno (SEQ ID NO: 7)

GACCGGCGGAGATGGACCGCC

20 Secuencia de aminoácidos del fragmento H561-4 de Fc de unión a antígeno (SEQ ID NO: 8)

TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE**FFT**
YWVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDRRRWTAAGNVFSCSVM
 HEALHNHYTQKLSLSLSPGK

25 La secuencia "TCPPCP" al inicio de la secuencia de aminoácidos de H561-4 representa parte de la región bisagra de IgG1. El dominio CH2 de H561-4 está subrayado. El dominio CH3 de H561-4 se muestra en letra itálica. Parte del bucle estructural AB del dominio CH3 se muestra en negrita y parte del buque estructural EF del dominio CH3 se muestra en negrita y con doble subrayado. La escisión de la Lisina C-terminal (K) o lisina C-terminal y la glicina adyacente (GK) del dominio CH3 se ha informado. La lisina C-terminal y la glicina adyacente (también presente en la SEQ ID NO: 11, a continuación) se muestran en una caja en la secuencia mencionada anteriormente.

30 Secuencia de aminoácidos de la región bisagra de H561-4 (SEQ ID NO: 9)

TCPPCP

35 Secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de H561-4 (SEQ ID NO: 10)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de H561-4 (SEQ ID NO: 11)

40 GQPREPQVYTLPPSRDE**FFTYW**VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTV**DRRRWTA**AGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

45 Secuencia de aminoácidos de la parte de la región del bucle estructural AB de H561-4 que se cree que está implicada en unión a antígeno (SEQ ID NO: 12)

FFTYW

Secuencia de aminoácidos de parte de la región del bucle estructural CD de H561-4 (SEQ ID NO: 13)

NGQPE

- 5 Secuencia de aminoácidos de la parte de la región del bucle estructural EF de H561-4 que se cree que está implicada en unión a antígeno (SEQ ID NO: 14)

DRRRWTA

- 10 Secuencia de aminoácidos de HER2 unida por H561-4 como se determina mediante Pepscan (SEQ ID NO: 15)

LPASPETHLDMRLHL

- 15 Secuencia de aminoácidos de HER2 unida por H561-4 como se determina mediante Pepscan (SEQ ID NO: 16)

CQVVQGNLELTYLPT

- Secuencia de aminoácidos de HER2 unida por H561-4 como se determina mediante Pepscan (SEQ ID NO: 17)

- 20 SLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGALIIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQAL

Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de HER2 (SEQ ID NO: 18)

	10	20	30	40	50	60
	TQVCTGTDMK	LRLPASPETH	LDMLRHLYQG	CQVVQGNLEL	TYLPTNASLS	FLQDIQEVQG
	70	80	90	100	110	120
	YVLIAHNQVR	QVFLQRLRIV	RGTQLFEDNY	ALAVLDNGDP	LNNTTPVTGA	SPGGLRELQL
	130	140	150	160	170	180
	RSLTEILKGG	VLIQRNPQLC	YQDTILWKDI	FKKNNQLALT	LIDTNRSRAC	HPCSPMCKGS
	190	200	210	220	230	240
	RCWGESSEDC	QSLTRTVCAE	GCARCKGPLP	TDCCHEQCAA	GCTGPKHSDC	LACLHFNHSG
	250	260	270	280	290	300
	ICELHCPALV	TYNTDTFESM	PNPEGRYTFG	ASCVTACPYN	YLSTDVGSCT	LVCPLHNQEV
	310	320	330	340	350	360
	TAEDGTQRCE	KCSKPCARVC	YGLGMEHLRE	VRAVTSANIQ	EFAGCKKIFG	SLAFLPESFD
	370	380	390	400	410	420
	GDPASNTAPL	QPEQLQVFET	LEEITGYLYI	SAWPDSLPLD	SVFQNLQVIR	GRILHNGAYS
	430	440	450	460	470	480
	LTLQGLGISW	LGLRSLRELG	SGLALIIHNT	HLCFVHTVPW	DQLFRNPHQA	LLHTANRPED
	490	500	510	520	530	540
	ECVGEGLACH	QLCARGHCWG	PGPTQCVNCS	QFLRGQECVE	ECRVLQGLPR	EYVNARHCLP
	550	560	570	580	590	600
	CHPECQPQNG	SVTCFGPEAD	QCVACAHYKD	PPFCVARCPS	GVKPDLSPYM	IWKFPDEEGA
	610	620	630			
25	CQPCPINCTH	SCVDLDDKGC	PAEQRASPLT			

Secuencia de aminoácidos de fragmento de unión a antígeno de Fc de tipo silvestre usado como control en los experimentos (SEQ ID NO: 19)

TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV
 30 HEALTHHNYTQKSLSLSPGK

Referencias

- 5 Arnould *et al.*, Accuracy of HER2 status determination on breast core-needle biopsies (inmunohistoquímica, FISH, CISH and SISH vs FISH). *Mod Pathol.* 2012. 25: 675-682
- Beck *et al.* Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products. *Anal. Chem.* 2013, 85, 715–736
- 10 Berchuck, A. *et al.*, Overexprssion of HER2/neu in endometrial cancer is associated with advanced stage disease. *AJOG*; 164 (1): 15-21, 1991.
- 15 Brabender, J *et al.*, Epidermal Growth Factor Receptor and HER2-neu mRNA Expression in Non-Small Cell Lung Cancer is Correlated with Survival. *Clin Cancer Res*; 7: 1850, 2001.
- CRUK and WHO world cancer report. *World Cancer Report 2008*, Editor Boyle P, *et al.*, WHO International Agency for Research on Cancer, ISBN 9789283204237
- Dowsett, M *et al.*, Disease-free survival according to degree of HER2 amplification for patients treated with adjuvant chemotherapy with or without 1 year of trastuzumab, the HERA trial, *J Clin Oncol*, 27 (18): 2962-9, 2009.
- 20 Garcia-Caballero *et al.*, Determination of HER2 amplification in primary breast cancer using dual-color chromogenic in situ hybridization is comparable to fluorescence in situ hybridization: a European multicentre study involving 168 specimens. *Histopathology.* 2010. 56: 472-480
- 25 Gravalos, C y Jimeno, A. Her2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol*; 19 (9):1523-1529, 2008.
- Gun, S *et al.*, Molecular cytogenetics as a clinical test for prognostic and predictive biomarkers in newly diagnosed ovarian cancer. *J Ovarian Res* 6: 2, 2013.
- 30 Hamburg M.A y Collins, F.S. The path to personalised medicine,10.1056/NEJMp1006304, 15 June 2010.
- Hanna *et al.*, HER2 in situ hybridization in breast cancer: Clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod Pathol*: 27: 4-18 (2014)
- 35 Harris L *et al.*, Predictors of Resistance to Preoperative Trastuzumab and Vinorelbine for HER-2 Positive Early Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 13: 1198-1207, 2007.
- Hicks D, *et al.*, Assessment of the HER2 status in breast cancer by Fluorescence In Situ Hybridisation: a technical review with interpretive guidelines. *Hum Pathol*, 36: 250-261, 2005.
- 40 Hoff, E *et al.*, HER2/neu amplification in breast cancer. *Am J Clin Pathol*, 117: 916-921, 2002.
- Hudis, C. Trastuzumab – Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med*, 357: 39-51, 2007
- 45 Jacobs, T.W. *et al.* - Specificity of HercepTest in Determining HER-2/neu Status of Breast Cancers Using the United States Food and Drug Administration–Approved Scoring System. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 17, No 7 (July), 1999: pp 1983-1987.
- 50 Lanitis *et al.*, Primary Human Ovarian Epithelial Cancer Cells Broadly Express HER2 at Immunologically-Detectable Levels. *PLoSone*;7 (11): e49829, 2012.
- Lei *et al.*, Overexpression of HER2/neu oncogene in pancreatic cancer correlated with shortened survival. *International Journal of Pancreatology*; 17 (1), 15-21, 1995
- 55 Mollerup *et al.*, Dual color chromogenic in situ hybridization for determination of HER2 status in breast cancer: a large comparative study to current state of the art fluorescence in situ hybridization. *BMC Clinical Pathol.* 2012. 12:3
- 60 Ochs *et al.*, Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and HER2/neu in Stage II Colon Cancer and Correlation with Survival. *Clinical Colorectal Cancer*; 4 (4): 262-267, 2004.
- Persons *et al.*, Quantitation of HER-2/neu and c-myc gene amplification in breast carcinoma using fluorescence in situ hybridization. *Mod Pathol* 10: 720-727, 1997
- 65 Press *et al.*, Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *JCO*, 20 (14): 3095-3105,

2002.

Rüschoff *et al.*, HER2 diagnostics in gastric cancer- guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Vichows Arch*; 457: 299-307, 2010.

Ross J. Breast cancer biomarkers and HER2 testing after 10 years of anti-HER2 therapy. *Drug News Perspect*; 22: 93-106, 2009

Ross J *et al.*, The HER2/neu Gene and Protein in Breast Cancer 2003: Biomarker and Target of Therapy. *The Oncologist*, 8: 307-325, 2003.

Timmerman *et al.* (2007). Functional reconstruction and synthetic mimicry of a conformational epitope using CLIPS™ technology. *J Mol Recognit*; 20: 283-99.

Slootstra *et al.* (1996). Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries. *Molecular Diversity*, 1: 87-96.

Vinatzer *et al.*, Expression of HER2 and the Coamplified Genes GRB7 and MLN64 in Human Breast Cancer: Quantatative Real-time Reverse Transcription PCR as a Diagnostic Alternative to Immunohistochemistry and Fluorescence In situ Hybridisation. *Clin Cancer Res*; 11 (23): 8348-8357, 2005.

Wolff A *et al.*, American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factors Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J Clin Oncol*; 25: 118/145, 2007

Wolff *et al.*, Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Onco*; 31 (31): 3997-4013, 2013.

Wong *et al.* (2011) Intergrating molecular and clinical evidence in the management of trastuzumab resistant or refractory HER-2+ Metastatic breast cancer, *The Oncologist*; 16: 1535-1546.

Yarden, Y. Biology of HER2 and Its Importance in Breast Cancer. *Oncology*; 61 (2): 1-13, 2001.

Listado de secuencias

<110> F-star Biotechnology Limited
F-star Biotechnologische Forschungs- Und Entwicklungsges
m.b.H

<120> Biomarcadores de cáncer y usos de los mismos

<130> TEK/CP7067424

<150> GB 1317622.7
<151> 04-10-2013

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 681
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: secuencia de nucleótidos del fragmento Fc de unión a antígeno H561-4

<400> 1

ES 2 687 783 T3

	acctgcccc cttgtcctgc ccccgagctg ctgggaggcc cttccgtgtt tctgttcccc	60
	ccaaagccca aggacaccct gatgatctcc cggacccccg aagtgacctg cgtggtggtg	120
	gacgtgtccc acgaggacct tgaagtgaag ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg	180
	cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa cagtacaact ccacctaccg ggtggtgtcc	240
	gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg aacggcaaag agtacaagtg caaggtgtcc	300
	aacaaggccc tgctgcccc catcgaaaag accatctcca aggccaaggg ccagccccgc	360
	gagccccagg tgtacaccct gccccctagc cgggacgagt tcttcaccta ctgggtgtcc	420
	ctgacctgcc tgggtcaaggg cttctacccc tccgatatcg ccgtggaatg ggagtccaac	480
	ggccagcccc agaacaacta caagaccacc ccccctgtgc tggactccga cggtcattc	540
	ttcctgtact ccaagctgac cgtggaccgg cggagatgga ccgccggcaa cgtgttctcc	600
	tgacagctga tgcacgaggc cctgcacaac cactacaccg agaagtcctt gtccctgagc	660
	cccggcaagt gatgagaatt c	681
5	<210> 2 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia sintética: secuencia de nucleótidos del fragmento Fc de unión a la región bisagra de antígeno H561-4	
	<400> 2 acctgcccc cttgtcct	18
15	<210> 3 <211> 330 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia sintética: secuencia de nucleótidos del fragmento Fc de unión al dominio CH2 de antígeno H561-4	
25	<400> 3 gcccccgagc tgctgggagg cccttccgtg tttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc	60
	ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac	120
	cctgaagtga agttcaattg gtacgtggac ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag	180
	cccagagagg aacagtacaa ctccacctac cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgac	240
	caggactggc tgaacggcaa agagtacaag tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgctgcc	300
	cccatcgaaa agaccatctc caaggccaag	330
30	<210> 4 <211> 345 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 687 783 T3

<220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de nucleótidos del fragmento Fc de unión al dominio CH3 de antígeno H561-4,

5 <400> 4

gaaaagacca tctccaaggc caagggccag ccccgcgagc cccaggtgta caccctgccc 60
cctagccggg acgagttctt cacotactgg gtgtccctga cctgcctggc caagggcttc 120
taccctccg atatcgccgt ggaatgggag tccaacggcc agcccagaaa caactacaag 180
accaccccc ctgtgctgga ctccgacggc tcattcttcc tgtactccaa gctgaccgtg 240
gaccggcgga gatggaccgc cggcaacgtg ttctcctgca gcgtgatgca cgaggccctg 300
cacaaccact acaccagaa gtcctgtcc ctgagccccg gcaag 345

10 <210> 5
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de nucleótidos que codifica la parte de la región AB de bucle estructural de H561 que se cree que está implicada en la unión a antígeno

20 <400> 5
ttcttcacct actgg 15

25 <210> 6
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de nucleótidos que codifica la parte de la región CD de bucle estructural DE H561

35 <400> 6
aacggccagc ccgag 15

40 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de nucleótidos que codifica la parte de la región EF de bucle estructural de H561 que se cree que está implicada en la unión a antígeno

50 <400> 7
gaccggcgga gatggaccgc c 21

55 <210> 8
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del fragmento Fc de unión a antígeno H561-4

<400> 8

ES 2 687 783 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Arg Asp Glu Phe Phe Thr Tyr Trp Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140

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

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

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

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

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

5 <210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la región bisagra de H561-4

ES 2 687 783 T3

<400> 9

Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

5 <210> 10
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de H561-4

<400> 10

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

15 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

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

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

20 <210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de H561-4

<400> 11

ES 2 687 783 T3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

Glu Phe Phe Thr Tyr Trp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Arg Arg Arg Trp Thr Ala Gly
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

- 5 <210> 12
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la parte de la región AB de bucle estructural de H561-4 que se cree que está implicada en la unión a antígeno
- <400> 12
- 15 Phe Phe Thr Tyr Trp
 1 5
- 20 <210> 13
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la parte de la región CD de bucle estructural de H561-4
- <400> 13
- 30 Asn Gly Gln Pro Glu
 1 5
- 35 <210> 14
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la parte de la región EF de bucle estructural de H561-4 que se cree que está implicada en la unión a antígeno

ES 2 687 783 T3

<400> 14

Asp Arg Arg Arg Trp Thr Ala
1 5

5 <210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 15

Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu
1 5 10 15

15 <210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 16

Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr
1 5 10 15

25 <210> 17
<211> 52
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser
1 5 10 15

Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His
20 25 30

Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro
35 40 45

30 His Gln Ala Leu
50

35 <210> 18
<211> 630
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

ES 2 687 783 T3

Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser
 1 5 10 15
 Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln
 20 25 30
 Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser
 35 40 45
 Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile
 50 55 60
 Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val
 65 70 75 80
 Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp
 85 90 95
 Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro
 100 105 110
 Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys
 115 120 125

ES 2 687 783 T3

Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr
 130 135 140

Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr
 145 150 155 160

Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met
 165 170 175

Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser
 180 185 190

Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro
 195 200 205

Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly
 210 215 220

Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly
 225 230 235 240

Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr
 245 250 255

Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser
 260 265 270

Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser
 275 280 285

Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp
 290 295 300

Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys
 305 310 315 320

Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser
 325 330 335

Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu
 340 345 350

Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala
 355 360 365

Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile
 370 375 380

ES 2 687 783 T3

Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu
 385 395 400
 Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn
 405 410 415
 Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly
 420 425 430
 Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His
 435 440 445
 Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe
 450 455 460
 Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp
 465 470 475 480
 Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly
 485 490 495
 His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe
 500 505 510
 Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu
 515 520 525
 Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu
 530 535 540
 Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp
 545 550 555 560
 Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala
 565 570 575
 Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp
 580 585 590
 Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys
 595 600 605
 Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln
 610 615 620
 Arg Ala Ser Pro Leu Thr
 625 630

ES 2 687 783 T3

<211> 223
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 130 135 140

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

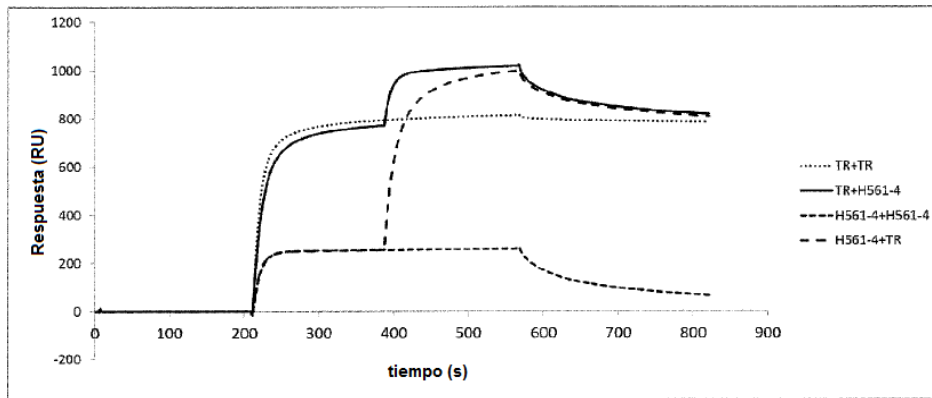
1. Un miembro de unión específica que se une al Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (HER2) para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un paciente, en donde dicho cáncer tiene un número medio de copias del gen HER2 superior o igual a 10 por célula tumoral, y en donde el miembro de unión específica es:
- (a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética en una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12), y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2.
2. Un miembro de unión específica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se ha determinado que una muestra de tumor obtenida de dicho paciente tiene un número medio de copias del gen HER2 superior o igual a 10 por célula tumoral.
3. Un miembro de unión específica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el cáncer tiene, o se ha determinado que tiene, un nivel elevado de ARNm de HER2, en donde un nivel elevado de ARNm de HER2 se corresponde con un número de copias de ADNc de HER2 superior o igual a 200 en una muestra de tumor obtenida de dicho paciente con respecto al número de copias de ADNc de un gen de referencia en dicha muestra, en donde el número de copias de ADNc de HER2 y el gen de referencia en la muestra se determinan mediante RT-PCR seguido de PCR cuantitativa o en donde el cáncer tiene, o se ha determinado que tiene, un nivel elevado de ARNm de HER2, en donde un nivel elevado de ARNm de HER2 se corresponde con un número de copias de ADNc de HER2 superior o igual a 200 e inferior o igual a 820 en una muestra de tumor obtenida de dicho paciente con respecto al número de copias de ADNc de un gen de referencia en dicha muestra, en donde el número de copias de ADNc de HER2 y el gen de referencia en la muestra se determinan mediante RT-PCR seguido de PCR cuantitativa.
4. Un miembro de unión específica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende:
- (i) determinar el número medio de copias de genes del gen HER2 por célula tumoral en una muestra de tumor obtenida del paciente; y
- (ii) tratar a dicho paciente con dicho miembro de unión específica si el número medio de copias del gen HER2 es superior o igual a 10 por célula tumoral.
5. Un método de identificación de un cáncer en un paciente que es susceptible al tratamiento con:
- (a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno de HER2 modificado por ingeniería genética dando una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12) y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2; comprendiendo el método:
- (i) determinar el número medio de copias de genes del gen HER2 por célula tumoral en una muestra de tumor obtenida del paciente; en donde un número medio de copias del gen superior o igual a 10 por célula tumoral indica que el cáncer es susceptible al tratamiento con el miembro de unión específica, opcionalmente, en donde el método comprende además:
- (ii) seleccionar dicho paciente para el tratamiento con el miembro de unión específica si el número medio de copias del gen HER2 es superior o igual a 10 por célula tumoral.
6. Un método de predicción de la respuesta de un cáncer al tratamiento con:
- (a) un miembro de unión específica que comprende un sitio de unión a antígeno HER2 modificado por ingeniería genética dando una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica y que contiene las secuencias de aminoácidos FFTYW (SEQ ID NO: 12) y DRRRWTA (SEQ ID NO: 14); o
- (b) un miembro de unión específica que compite con un miembro de unión específica de acuerdo con (a) por la unión a HER2; comprendiendo el método:
- (i) determinar el número medio de copias de genes del gen HER2 por célula tumoral en una muestra de tumor obtenida de un paciente, en donde un número de copias del gen superior o igual a 10 por célula tumoral indica que el cáncer es susceptible al tratamiento con el miembro de unión específica y en donde un número de copias del gen inferior a 10 por célula tumoral indica que el cáncer no es susceptible al tratamiento con el miembro de unión específica, opcionalmente, en donde el método comprende además:
- (ii) seleccionar dicho cáncer para el tratamiento con el miembro de unión específica si el número de copias del gen de HER2 es superior o igual a 10 por célula tumoral.

7. Un miembro de unión específica para su uso o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el número de copias del gen HER2 es superior o igual a 11, superior o igual a 12, superior o igual a 13, superior o igual a 14, superior o igual a 15, superior o igual a 16, superior o igual a 17 o superior o igual a 18.
- 5 8. Un miembro de unión específica para su uso o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el cáncer es cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de estómago o cáncer de endometrio.
- 10 9. Un miembro de unión específica para su uso o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el paciente ha presentado una respuesta inadecuada a trastuzumab y/o a trastuzumab más pertuzumab y/o en donde el cáncer es resistente al tratamiento con trastuzumab y/o con trastuzumab más pertuzumab.
- 15 10. Un miembro de unión específica para su uso o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el miembro de unión específica de la reivindicación 1, parte (b), la reivindicación 5, parte (b) o la reivindicación 6, parte (b), comprende un sitio de unión a antígeno HER2 modificado por ingeniería genética dando una región de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica.
- 20 11. Un miembro de unión específica para su uso o un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el miembro de unión específica comprende un sitio de unión a antígeno HER2 modificado por ingeniería genética dando las regiones AB y EF de bucle estructural de un dominio CH3 del miembro de unión específica.
- 25 12. Un miembro de unión específica para su uso o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el miembro de unión específica de la reivindicación 1, parte (a) y/o (b), la reivindicación 5, parte (a) y/o (b) o la reivindicación 6, parte (a) y/o (b) es, o comprende, un fragmento Fc de unión a antígeno.
- 30 13. Un miembro de unión específica para su uso o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el miembro de unión específica de la reivindicación 1, parte (a) y/o (b), la reivindicación 5, parte (a) y/o (b) o la reivindicación 6, parte (a) y/o (b), comprende el dominio CH3 de la SEQ ID NO: 11 o el dominio CH3 de la SEQ ID NO: 11 menos uno o dos aminoácidos C-terminales.
- 35 14. Un miembro de unión específica para su uso o un método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el miembro de unión específica de la reivindicación 1, parte (a) y/o (b), la reivindicación 5, parte (a) y/o (b) o la reivindicación 6, parte (a) y/o (b), comprende adicionalmente el dominio CH2 de la SEQ ID NO: 10.
- 40 15. Un miembro de unión específica para su uso o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el miembro de unión específica de la reivindicación 1, parte (a), la reivindicación 5, parte (a) o la reivindicación 6, parte (a) es un dímero de un polipéptido de la SEQ ID NO: 8 o un dímero de un polipéptido de la SEQ ID NO: 8 menos uno o dos aminoácidos C-terminales.
- 45 16. Un miembro de unión específica para uso o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el miembro de unión específica de la reivindicación 1, parte (b), la reivindicación 5, parte (b) o la reivindicación 6, parte (b), compete con un miembro de unión específica de acuerdo con la reivindicación 1, parte (a), la reivindicación 5, parte (a) o la reivindicación 6, parte (a), respectivamente, por la unión a HER2, como se determina mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), un ensayo competitivo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), separación de células activadas por fluorescencia (FACS), o inmunocitoquímica de competición.
- 50 17. Un miembro de unión específica para su uso o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el miembro de unión específica de la reivindicación 1, parte (b), la reivindicación 5, parte (b) o la reivindicación 6, parte (b), se une al mismo epitopo en HER2 como un miembro de unión específica de acuerdo con la reivindicación 1, parte (a), la reivindicación 5, parte (a) o la reivindicación 6, parte (a), respectivamente, y en donde el miembro de unión específica de acuerdo con la reivindicación 1, parte (a), la reivindicación 5, parte (a) o la reivindicación 6, parte (a), es un dímero de un polipéptido de la SEQ ID NO: 8 o un dímero de un polipéptido de la SEQ ID NO: 8 menos uno o dos aminoácidos C-terminales.
- 55 18. Un miembro de unión específica para su uso o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el método comprende determinar el nivel de ARNm de HER2 en una muestra de tumor obtenida del paciente, en donde un nivel elevado de ARNm de HER2 se corresponde con un número de copias de ADNc de HER2 superior o igual a 200 en la muestra de tumor con respecto al número de copias de ADNc de un gen de referencia en dicha muestra, y en donde un nivel elevado de ARNm de HER2 indica que el número medio de copias del gen HER2 por célula tumoral es superior o igual a 10 y, opcionalmente, en donde el número de copias de ADNc de HER2 y el gen de referencia se determinan usando PCR de transcripción inversa seguido de PCR cuantitativa.
- 60
- 65

Figura 1

	<u>240</u>	<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>
H561-4	TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW					
WT	TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW					
	<u>300</u>	<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	
H561-4	YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA					
WT	YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA					
	<u>350</u>	<u>360</u>	<u>370</u>	<u>381</u>	<u>390</u>	<u>400</u>
H561-4	PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE <u>FFTYW</u> VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES					
WT	PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE <u>LTKNQ</u> VSLTCLVKGFYPSDIAVEWES					
	<u>410</u>	<u>420</u>	<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>
H561-4	NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV <u>DRRRWTA</u> GNVFSCSVMHEALHNHY					
WT	NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV <u>DKSRWQQ</u> GNVFSCSVMHEALHNHY					
	<u>470</u>	<u>478</u>				
H561-4	TQKSLSLSPGK					
WT	TQKSLSLSPGK					

A



B

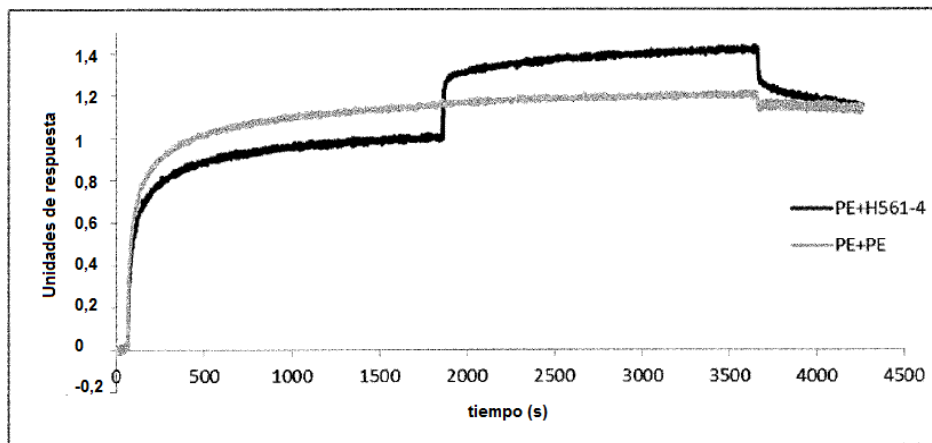
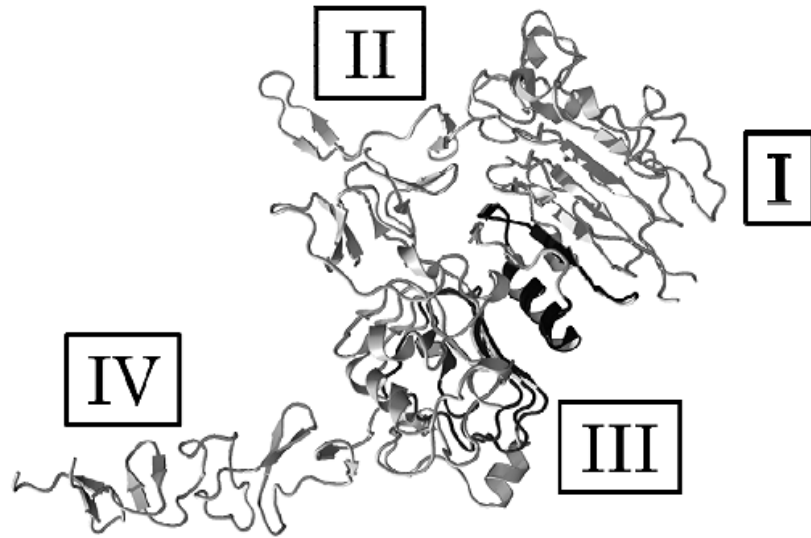


Figura 2

C



Área Unión	Dominio	Secuencia
1	1	¹³ LPASPETHDMLRHL ₂₇
2	1	³¹ CQVVQGNLELYLPT ₄₅
3	3	⁴²⁰ SLTLQGLGISWLGRLSRLRELGSGLALIHNTHL ₄₇₅ WDQLFRNPHQALLHTA ₄₇₅

Figura 2 continuación

A

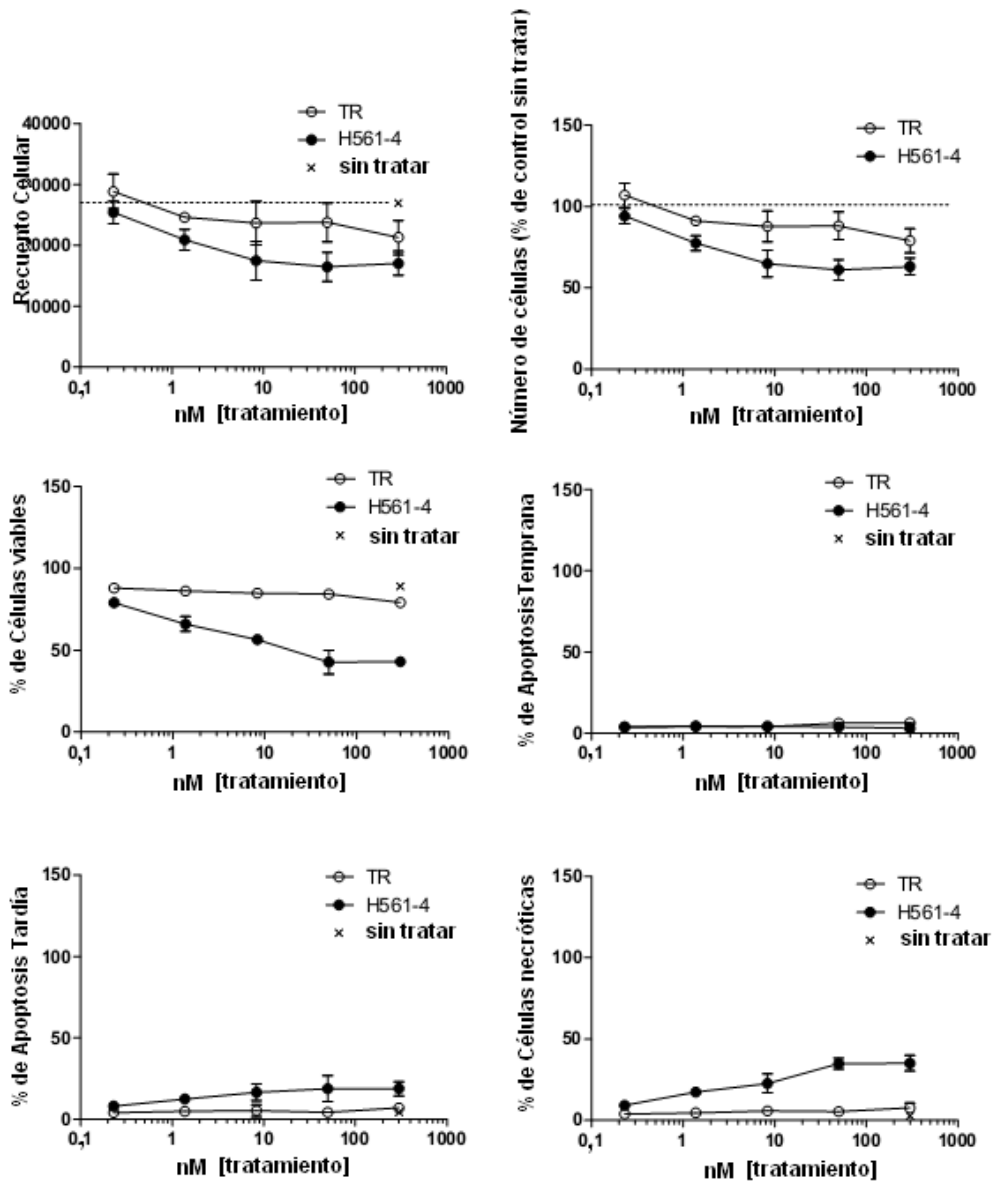
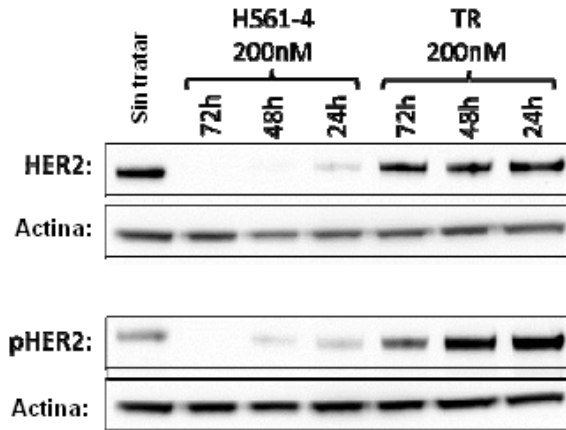
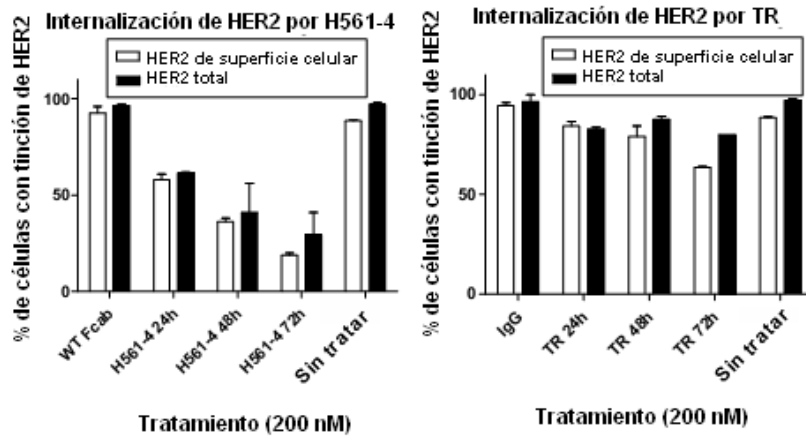


Figura 3

B



C



D

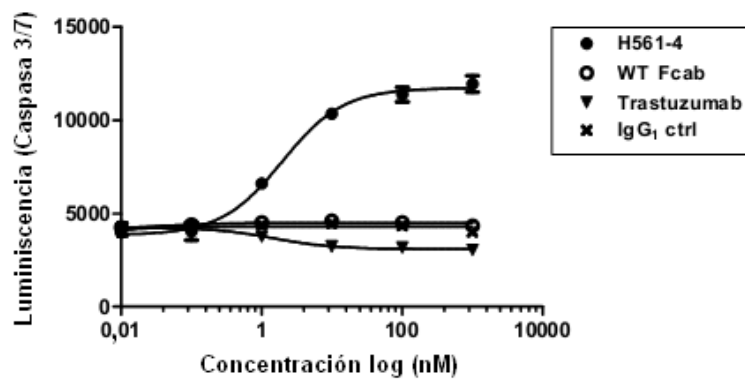


Figura 3 continuación

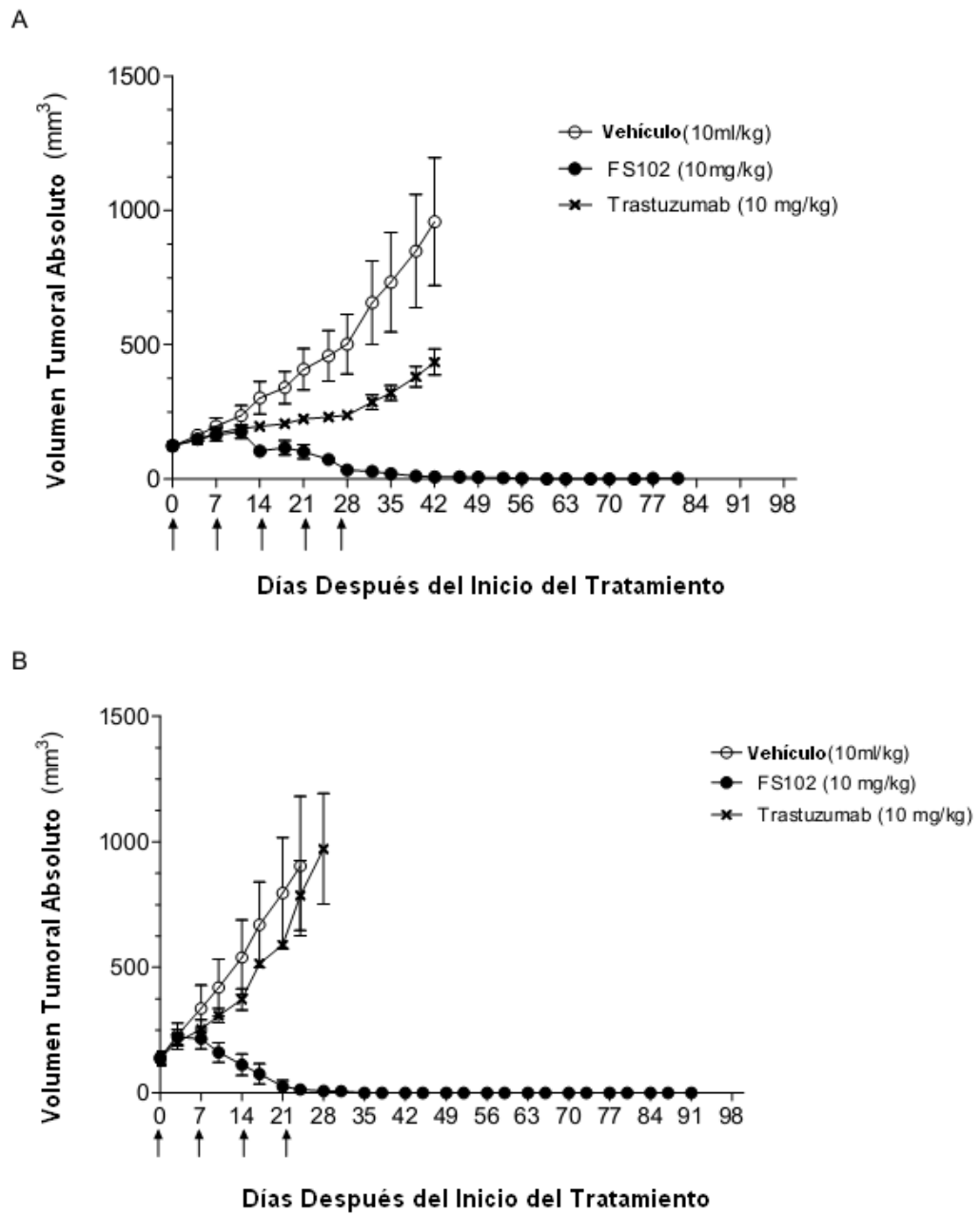
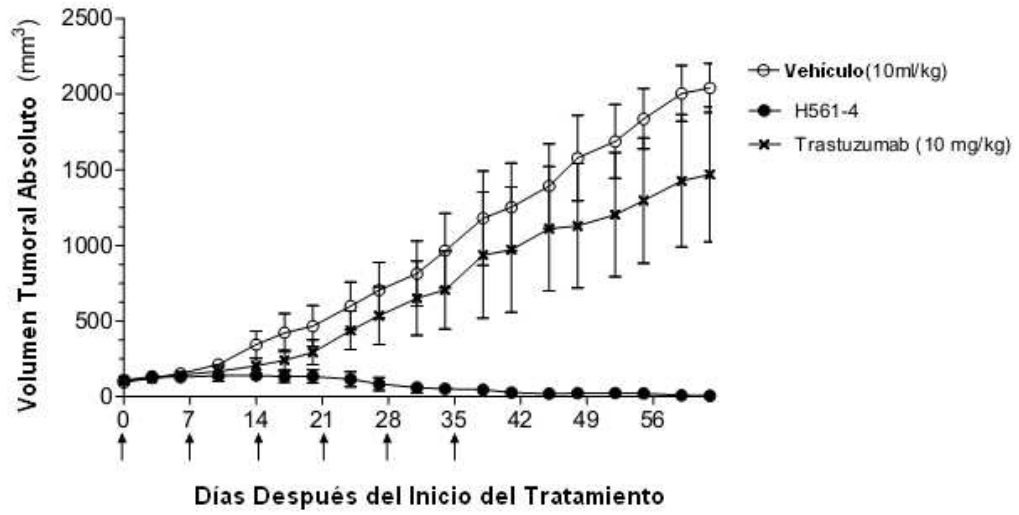


Figura 4

C



D

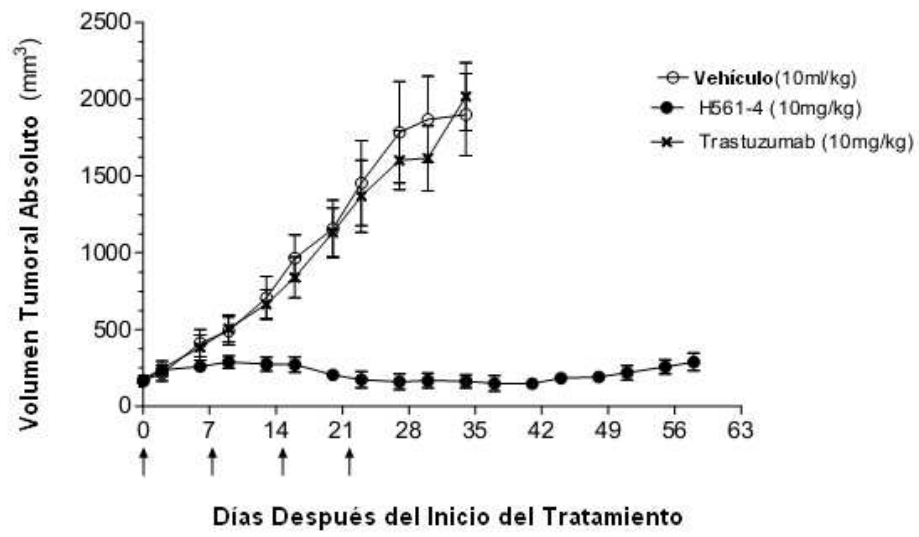
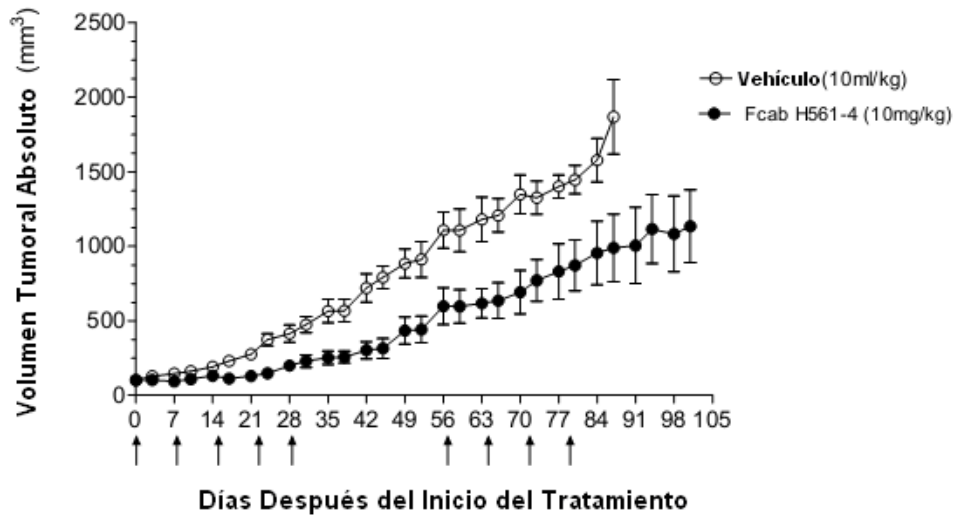


Figura 4 continuación

E



F

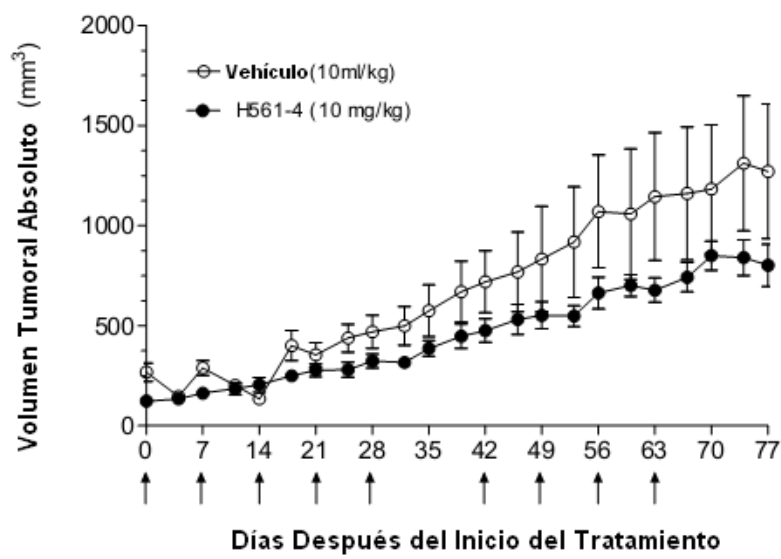
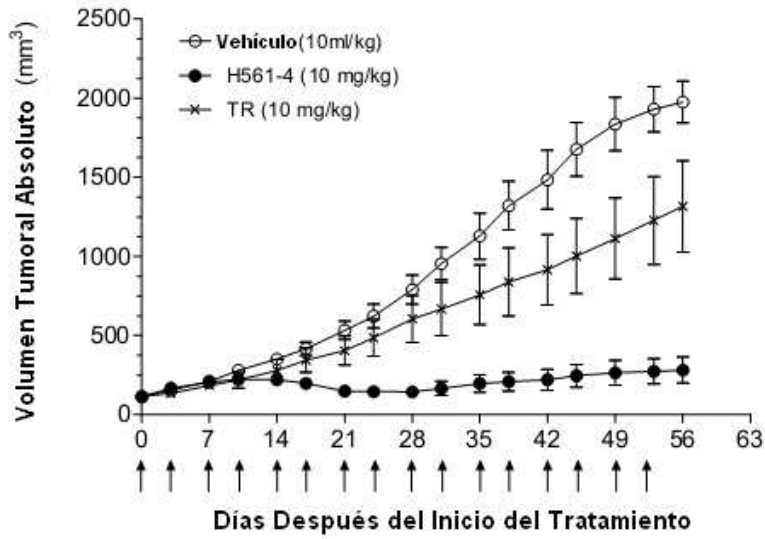


Figura 4 continuación

G



H

Tumor Gástrico GA0060

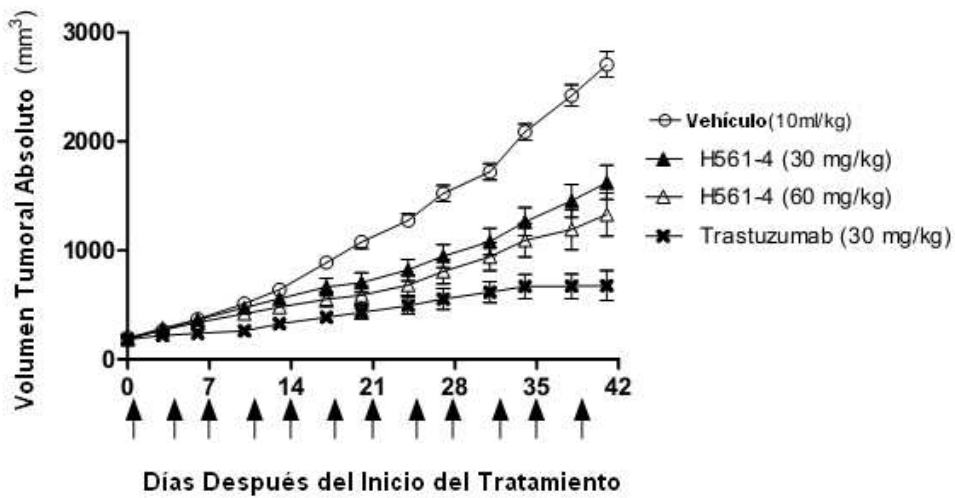


Figura 4 continuación

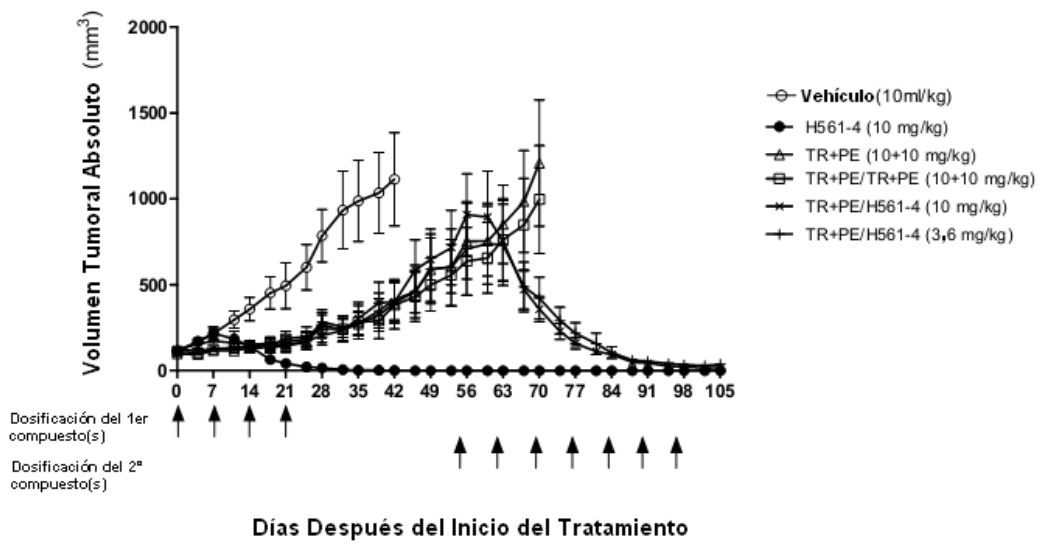


Figura 5

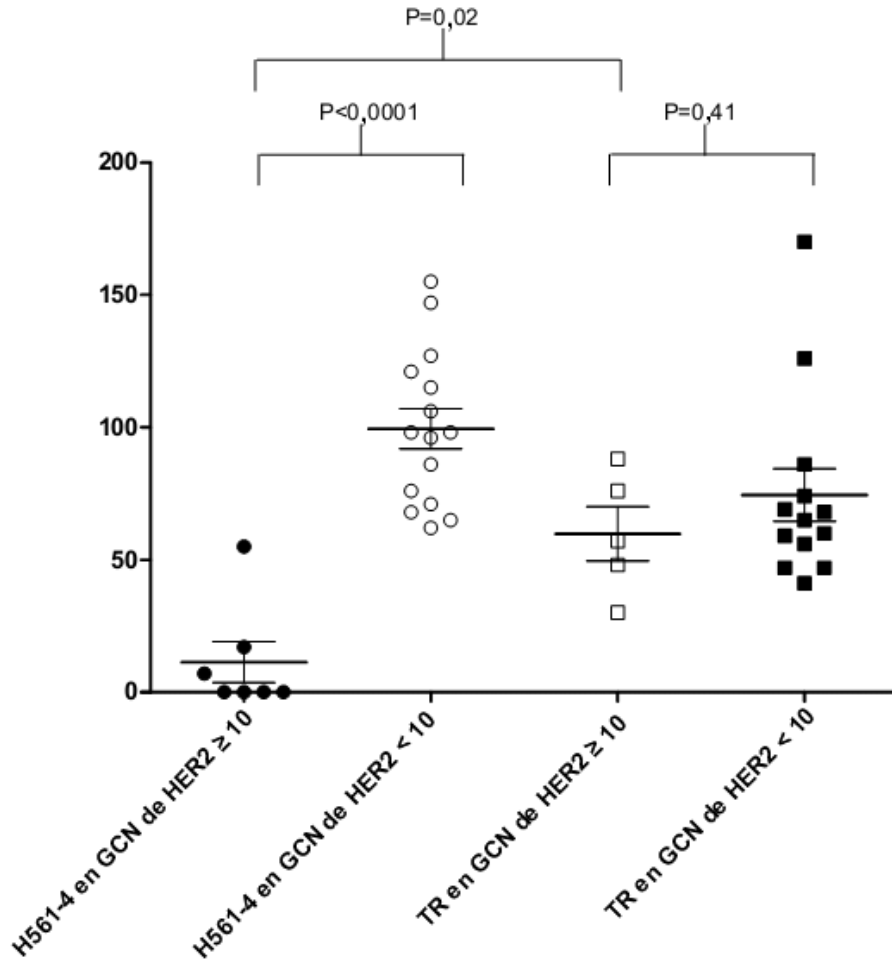


Figura 6

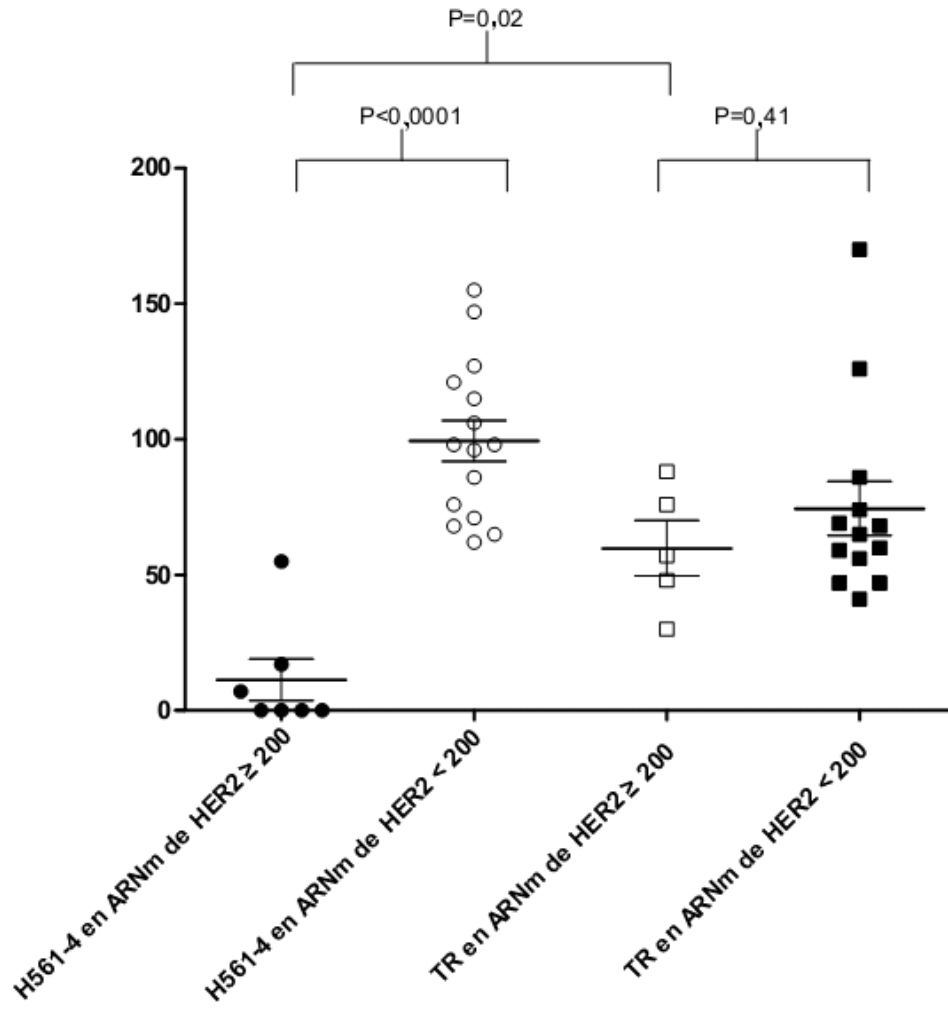


Figura 7

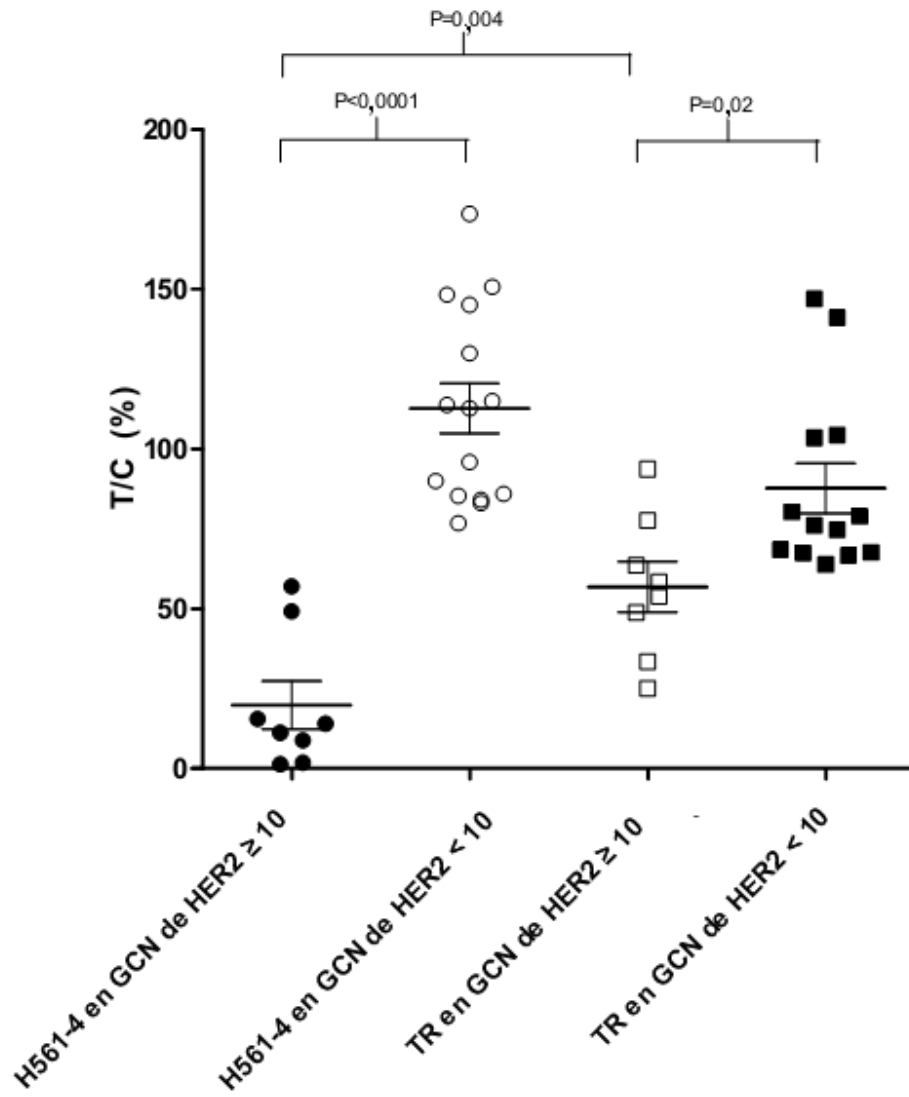


Figura 8

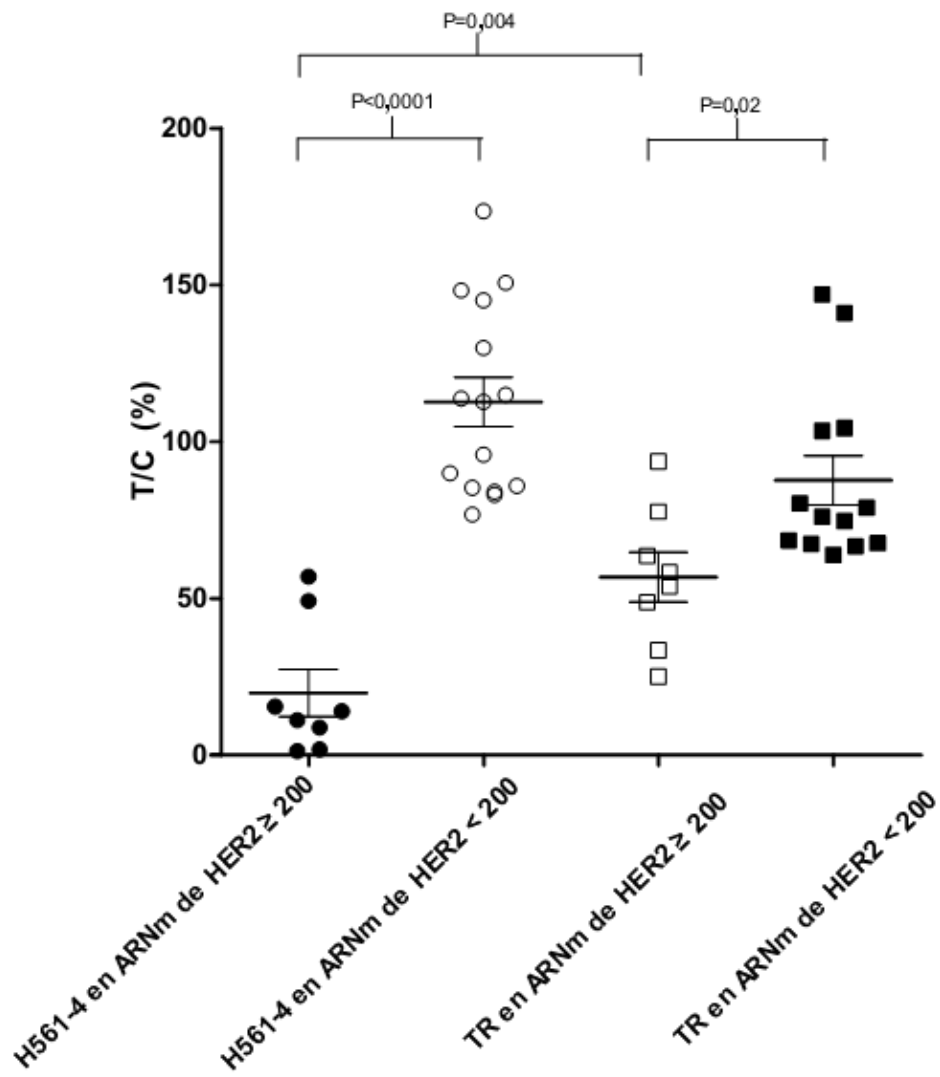


Figura 9

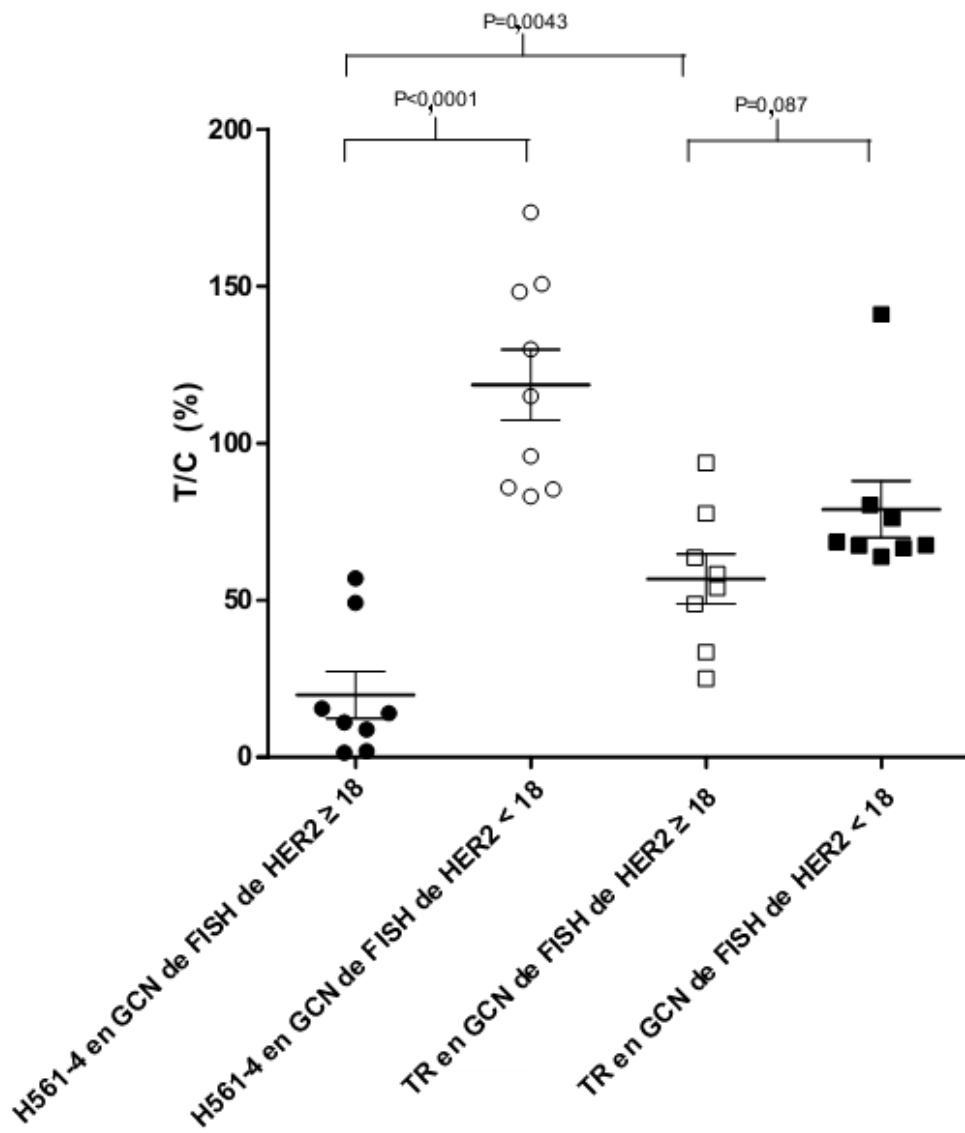


Figura 10

Correlación de qPCR y FISH

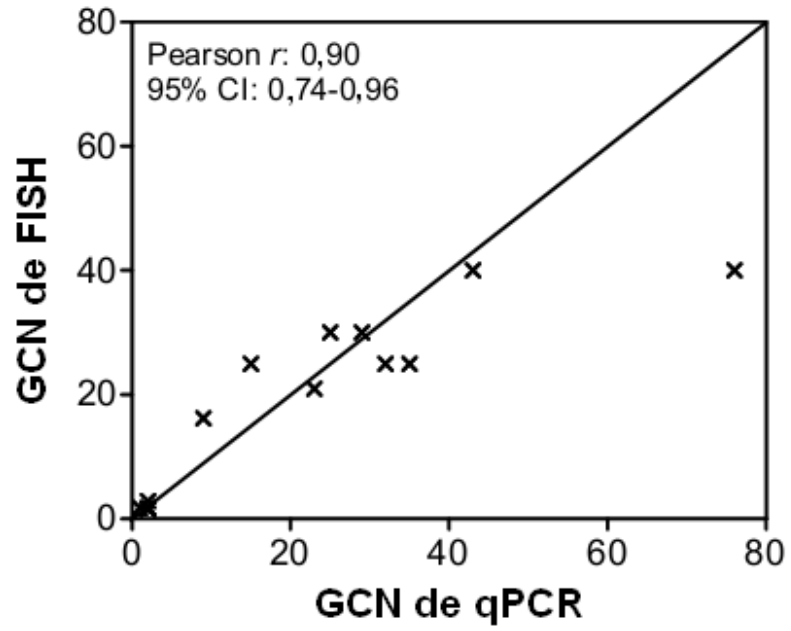


Figura 11

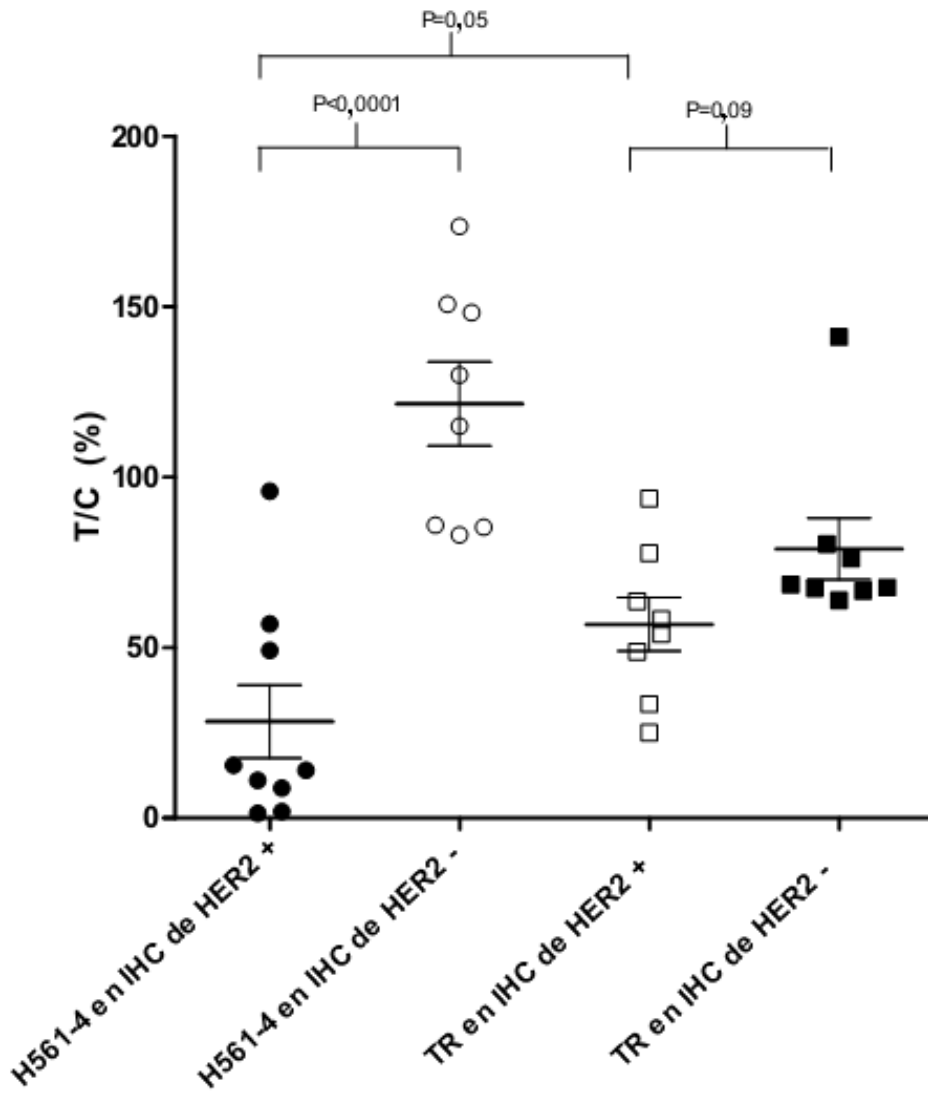


Figura 12