



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 646**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/335 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01939145 .7**
96 Fecha de presentación : **18.05.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1282443**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.02.2003**

54 Título: **Ensayo para la detección de genes para mejorar la probabilidad de una respuesta eficaz a una terapia contra el cáncer basada en antagonistas de ErbB.**

30 Prioridad: **19.05.2000 US 205754 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.01.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.01.2010

73 Titular/es: **Genentech, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Mass, Robert, D.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 331 646 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

Ensayo para la detección de genes para mejorar la probabilidad de una respuesta eficaz a una terapia contra el cáncer basada en antagonistas de ErbB.

Campo de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento de cánceres caracterizados por la sobreexpresión de antígeno tumoral, el HER2. Más específicamente, la invención se refiere a un tratamiento más eficaz de pacientes humanos susceptibles a o diagnosticados con cáncer, en los que las células tumorales sobreexpresan HER2 tal y como se determina mediante el ensayo de amplificación génica, con un antagonista de ErbB, un anticuerpo anti-HER2. La invención proporciona adicionalmente envases farmacéuticos para ese tratamiento.

Antecedentes de la invención

Los avances en la comprensión de la genética y los desarrollos en tecnología y epidemiología han permitido la correlación de anomalías genéticas con ciertas enfermedades malignas, así como la valoración del riesgo de que un individuo desarrolle ciertas enfermedades malignas. No obstante, la mayoría de las metodologías disponibles para la evaluación de tejido buscando la presencia de genes asociados o que predisponen a un individuo a una enfermedad maligna tienen inconvenientes muy conocidos. Por ejemplo, los procedimientos que requieren la disgregación del tejido, tales como los análisis de transferencia de Southern, Northern, o Western, se vuelven menos precisos por la dilución de las células malignas en las células normales o no malignas que están presentes en el mismo tejido. Además, la pérdida de la arquitectura tisular resultante anula la capacidad de correlacionar las células malignas con la presencia de anomalías genéticas en un contexto que permita una especificidad morfológica. Este asunto es particularmente problemático en tipos tisulares que se sabe son heterogéneos, tales como en el carcinoma de mama humano, en el que un porcentaje significativo de las células presentes en cualquier área puede ser no maligno.

El gen *her2/neu* codifica un producto proteico, a menudo identificado como p185HER2. La proteína p185HER2 nativa es una molécula similar a un receptor de membrana con homología al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La amplificación y sobreexpresión de HER2 en cáncer de mama humano se ha correlacionado con un intervalo libre de enfermedad más corto y una supervivencia general más corta en algunos estudios (van de Vijer y col. *New Eng. J. Med.* 317:1239 (1988); Walker y col. *Br. J. Cancer* 60:426 (1989); Tandon y col. *J. Clin. Invest.* 7:1120 (1989); Wright y col. *Cancer Res.* 49:2087 (1989); McCann y col. *Cancer Res* 51:3296 (1991); Paterson y col. *Cancer Res.* 51:556 (1991); y Winstanley y col. *Br. J. Cancer* 63:447 (1991)) pero no en otros (Zhou y col. *Oncogene* 4:105 (1989); Heintz y col. *Arch Path Lab Med* 114:160 (1990); Kury y col. *Eur. J. Cancer* 26:946 (1990); Clark y col. *Cancer Res.* 51:944 (1991); y Ravdin y col. *J. Clin. Oncol.* 12:467-74 (1994)).

En una evaluación inicial de 103 pacientes con cáncer de mama, aquéllos que tenían más de tres nódulos linfáticos axilares positivos en células tumorales (nódulos positivos) tenían más probabilidades de sobreexpresar la proteína HER2 que pacientes con menos de tres nódulos positivos (Slamon y col. *Science* 235:177 (1987)). En una evaluación posterior de 86 pacientes de cáncer de mama con nódulos positivos, había una correlación significativa entre el grado de amplificación génica, una recaída temprana, y una supervivencia corta. La sobreexpresión de HER2 se determinó usando análisis de transferencia de Southern y Northern, que se correlaciona con la expresión de la oncoproteína HER2 evaluada por análisis de transferencia de Western e inmunohistoquímica (IHC) (Slamon y col. *Science* 235: 177 (1987); Slamon y col. *Science* 244: 707 (1989)). Se encontró que el período de supervivencia media era aproximadamente cinco veces más corto en pacientes con más de cinco copias del gen *her2* que en pacientes sin amplificación génica. Esta correlación estaba presente incluso después de la corrección para el estatus nodal y otros factores pronósticos en análisis multivariados. Estos estudios se extendieron a 187 pacientes con nódulos positivos e indicaron que la amplificación génica, las cantidades incrementadas de ARNm (determinadas por análisis de transferencia de Northern), y la expresión incrementada de proteína (determinada inmunohistoquímicamente) también estaban correlacionadas con un tiempo de supervivencia acortado (Slamon y col. *Science* 244:707 (1989)); (véase también patente de EE.UU. 4.968.603). Nelson y col. han comparado la amplificación del gen *her2/neu* usando FISH con sobreexpresión determinada inmunohistoquímicamente en cáncer de mamá (Nelson y col. *Modern Pathology* 9 (1) 21A (1996)).

La tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido ha demostrado ser un procedimiento fiable para la valoración de la alteración de proteínas en tejido heterogéneo. Las técnicas inmunohistoquímicas (IHC) utilizan un anticuerpo para sondear y visualizar antígenos celulares *in situ*, generalmente mediante procedimientos cromogénicos o fluorescentes. Esta técnica sobresale debido a que evita los efectos no deseados de la disgregación y permite la evaluación de células individuales en el contexto de la morfología. Además, la proteína diana no es alterada por los procesos de congelación.

No obstante, en el ensayo clínico (CTA), la IHC de muestras tisulares fijadas con formaldehído y embebidas en parafina sólo demostraron una sensibilidad del 50%-80%, en relación a muestras IHC congeladas (Press, *Cancer Research* 54:2771 (1994)). Así, la IHC puede dar lugar a resultados de falso negativo, excluyendo del tratamiento a pacientes que se podrían beneficiar del tratamiento.

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es un procedimiento desarrollado recientemente para valorar directamente la presencia de genes en células intactas. La FISH es un medio atractivo para evaluar tejido embebido en parafina para la presencia de una enfermedad maligna debido a que proporciona especificidad celular, mientras supera los problemas de entrecruzamiento y otros efectos que alteran la proteína provocados por la fijación en formalina. La FISH históricamente se ha combinado con metodologías de tinción clásicas en un intento de correlacionar anomalías genéticas con la morfología celular (véase, por ejemplo, Anastasi y col., Blood 77:2456-2462 (1991); Anastasi y col., Blood 79:1796-1801 (1992); Anastasi y col., Blood 81:1580-1585 (1993); van Lom y col., Blood 82:884-888 (1992); Wolman y col., Diagnostic Molecular Pathology 1(3): 192-199 (1992); Zitzelberger, Journal of Pathology 172:325-335 (1994)).

Hasta la fecha, no se ha producido una correlación entre la amplificación del gen *her2* y un resultado en el tratamiento con un anticuerpo anti-HER2, sólo con el pronóstico de la enfermedad. El ensayo estándar ha sido la IHC sobre muestras fijadas con formalina y embebidas en parafina. Estas muestras, cuando tienen una puntuación de 3+ o 2+, identifican a pacientes que probablemente se beneficiarían del tratamiento con un anticuerpo anti-HER2, como el Herceptin®. Las puntuaciones de 3+ y 2+ se correlacionan con la amplificación del gen *her2*, por ejemplo, tal y como se somete a ensayo con FISH. No obstante, aún existe la necesidad de una identificación de candidatos más eficaz para terapias con éxito con el antagonista de ErbB, tal como el tratamiento con Herceptin®. El documento WO 99/31140 describe el uso médico de un anticuerpo anti-ErbB2 para el tratamiento de trastornos caracterizados por la sobreexpresión de ErbB2, incluyendo el cáncer de mama. Se describe que los criterios de elección para pacientes con cáncer de mama metastático incluyen la sobreexpresión del oncogen ErbB2 (HER2) (2+ a 3+ según se determina mediante inmunohistoquímica o hibridación *in situ* fluorescente (FISH)).

Resumen de la invención

La invención proporciona la materia objeto de las reivindicaciones.

La invención se refiere al incremento de la probabilidad de la eficacia de un tratamiento del cáncer con un antagonista de ErbB. Un procedimiento que comprende la administración de una dosis para el tratamiento del cáncer del antagonista de ErbB a un sujeto en el que se ha encontrado que está amplificado un gen *erbB* en células tumorales en una muestra de tejido procedente del sujeto. El ErbB es HER2. El procedimiento puede comprender adicionalmente la administración de una dosis para el tratamiento del cáncer de un agente quimioterapéutico, particularmente un taxol.

La invención proporciona el incremento de la probabilidad de la eficacia de un anticuerpo anti-HER2 para tratar el cáncer. Este procedimiento comprende la administración de una dosis de un anticuerpo anti-HER1 para el tratamiento del cáncer al sujeto en el que se ha encontrado que está amplificado un gen *her2* en células tumorales en una muestra de tejido procedente del sujeto.

Los resultados clínicos inesperados que sustentan la invención, en los que la amplificación del gen demostró ser una indicación más eficaz de una terapia tumoral basada en anticuerpos que la detección de proteínas mediante inmunohistoquímica, se extiende a antígenos tumorales en general. Así, cualquier terapia con anticuerpos basadas en antígenos específicos anti-tumorales puede tener una probabilidad de éxito incrementada en pacientes en los que se ha encontrado que presentan una amplificación génica del gen que codifica el antígeno tumoral.

Una ventaja particular de la invención es que permite la selección de pacientes para el tratamiento que, en base a criterios inmunohistoquímicos, serían excluidos. Así, en una realización específica, se ha encontrado que el sujeto tiene un nivel de antígeno correspondiente a una puntuación de 0 ó 1+ para HER2 por inmunohistoquímica en una muestra de tejido fijada con formaldehído.

Además se describe un envase farmacéutico que comprende un antagonista de ErbB para el tratamiento de un cáncer, e instrucciones para administrar el antagonista de ErbB a un sujeto si está amplificado un gen *erbB* en células tumorales en una muestra de tejido procedente del sujeto. Preferentemente, el antagonista de ErbB es un anticuerpo anti-ErbB, tal como un anticuerpo anti-HER2. Las instrucciones también pueden enseñar a administrar una dosis para el tratamiento del cáncer de un agente quimioterapéutico, por ejemplo, un taxol. Esos envases farmacéuticos, que incluyen las instrucciones para su uso, se pueden suministrar para cualquier agente terapéutico basado en anticuerpos específicos para un antígeno específico de un tumor.

Descripción detallada

La presente invención permite el tratamiento de manera ventajosa de pacientes que tienen una mayor probabilidad de responder al tratamiento por la administración de agentes terapéuticos, es decir, anticuerpos terapéuticos anti-HER2, para pacientes en los que se ha encontrado que presentan un gen *her2* amplificado. La invención se basa, en parte, en el descubrimiento inesperado de que la amplificación del gen *her2*, por ejemplo, según se detecta mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH), aunque está correlacionada con la expresión de HER2 tal y como se detecta mediante inmunohistoquímica (IHC), proporciona una base más precisa para seleccionar pacientes para el tratamiento debido a que el estado de la FISH se correlaciona inesperadamente mejor con la respuesta al tratamiento. Este resultado fue sorprendente en parte, debido a que el estado de la FISH tiene aproximadamente la misma tasa de correlación con un ensayo IHC de un ensayo clínico (CTA) que otro ensayo IHC (HercepTest). Basándose en esta observación, se esperaría que en la FISH tuviese una correlación similar con la respuesta al tratamiento. Este resultado también

sorprende debido a que se esperaría que la medición directa de proteína (por inmunoensayo) proporcionase una valoración más precisa de una terapia para el cáncer dirigida a la proteína que una medición indirecta de la expresión, como la amplificación génica.

5 La evaluación de grupos y subgrupos de pacientes demuestra el poder del análisis de la amplificación génica para seleccionar pacientes que es más probable que respondan al tratamiento. La IHC proporciona una puntuación para la expresión de HER2 en células tumorales: 0 (sin expresión) a 3+ (niveles de expresión muy elevados). Los criterios de selección clínicos excluyen a pacientes con puntuaciones de 0 y 1+ y seleccionan pacientes con puntuaciones de 2+ y 3+. Los datos muestran que el 14% de pacientes 2+/3+ combinados responden al Herceptin[®], mientras que el 20% de pacientes FISH+ (gen her2 amplificado) responden al Herceptin[®]. El subgrupo 3+ tiene una tasa de respuesta del 17%, que está muy próxima a la tasa de respuesta de los sujetos FISH+. No obstante, el subgrupo 2+ presenta menos de la mitad de la tasa de respuesta que los sujetos FISH+. Así, la amplificación génica diferencia claramente grandes subpoblaciones dentro del subgrupo 2+, permitiendo un tratamiento más eficaz para aquéllos que son FISH+, e identificando rápidamente pacientes para los que son apropiadas modalidades de tratamiento alternativas y que deberían comenzar inmediatamente.

El análisis de amplificación génica también identifica pacientes que son excluidos de manera innecesaria debido a anomalías en el análisis IHC, particularmente cuando las pruebas se realizan sobre muestras fijadas con formalina y embebidas en parafina (ese procesamiento de las muestras puede romper o destruir los epítomos de los anticuerpos sobre la proteína HER2, pero tiene mucho menos impacto sobre los ensayos de amplificación génica). Como se muestra en los ejemplos, un subgrupo de sujetos 0 y 1+ es FISH+. Es probable que estos pacientes respondan a la terapia de anticuerpos anti-HER2, por ejemplo, Herceptin[®], aunque según los criterios de la IHC estarían excluidos de recibir este tratamiento.

25 Así, la presente invención permite de manera ventajosa la inclusión de pacientes que es más probable que se beneficien del tratamiento pero que, según los criterios de la IHC estándar, serían excluidos del tratamiento. Al mismo tiempo, la invención permite la exclusión de pacientes que deberían buscar inmediatamente un modo de tratamiento alternativo, debido a que es probable que no tenga éxito la terapia con el antígeno anti-tumoral (es decir, anticuerpo terapéutico antagonista de ErbB o específico del antígeno tumoral).

30 Resumiendo, la presente invención es una potente ayuda para ensayos IHC para la selección de pacientes basándose en el nivel de expresión de proteínas diana. También se puede emplear por sí sola, es decir, sin la IHC, para proporcionar una elección inicial y selección de pacientes. La invención mejora significativamente la elección y selección de sujetos que deben recibir una dosis para el tratamiento del cáncer de un tratamiento con un anticuerpo terapéutico anti-HER2, que da como resultado un incremento en la probabilidad del beneficio de esos tratamientos.

También se describe un artículo de fabricación o envase, que comprende un contenedor, una composición dentro del contenedor que comprende un antagonista de ErbB, por ejemplo, un anticuerpo anti-ErbB (u otro anticuerpo contra un antígeno antitumoral específico), opcionalmente una etiqueta sobre o asociada al contenedor que indica que la composición se puede usar para el tratamiento de una dolencia caracterizada por la sobreexpresión del receptor ErbB, y un prospecto en el envase que contiene instrucciones para administrar el antagonista a pacientes que se ha encontrado que presentan un gen erbB amplificado.

Definiciones

45 Como se usa en el presente documento, un “receptor ErbB” es un receptor proteína tirosina quinasa que pertenece a la familia de receptores ErbB e incluye los receptores EGFR, HER2, ErbB3, y ErbB4, así como TEGFR (patente de EE.UU. Nº 5.708.156) y otros miembros de esta familia a identificar en el futuro. El receptor ErbB generalmente comprenderá un dominio extracelular, que se puede unir a un ligando de ErbB; un dominio transmembrana lipófilo; un dominio intracelular tirosina quinasa conservado; y un dominio de señalización carboxilo terminal que alberga varios residuos tirosina que se pueden fosforilar. El receptor ErbB puede ser un receptor ErbB de secuencia nativa o una variante de su secuencia de aminoácidos. Preferentemente, el receptor ErbB es una secuencia nativa del receptor ErbB humano.

55 Los receptores ErbB son ejemplos de antígenos tumorales o antígenos específicos de tumores. El término “antígeno tumoral” se usa en el presente documento para referirse a una proteína que se expresa a un nivel más elevado en células tumorales comparadas con células normales. Generalmente, las células normales para la comparación son del mismo tipo tisular, particularmente el fenotipo, que el tumor, o a partir del cual surge el tumor. Un “antígeno específico del tumor” se refiere a un antígeno expresado preferente o únicamente en células tumorales. Ejemplos de antígenos específicos del tumor incluyen, además de los receptores ErbB, MARTI/Melan A, gp-100, y tirosinasa (en melanoma); MAGE-1 y MAGE-3 (en carcinoma de vejiga, cabeza y cuello, y células no pequeñas); proteínas HPV EG y E7 (en cáncer cervical); Mucin/MUC-1 (en cánceres de mama, páncreas, colon y próstata); antígeno específico de próstata/PSA (en cáncer de próstata); y antígeno carcinoembrionario/CEA (en cánceres de colon, mama y gastrointestinal).

65 Por “amplificación” se quiere decir la presencia de una o más copias extras del gen erbB u otros genes que codifican antígenos tumorales en un complemento cromosómico. La amplificación génica puede dar como resultado la sobreexpresión de una proteína, por ejemplo, la proteína receptora ErbB. La amplificación génica en células procedentes de

ES 2 331 646 T3

muestras tisulares se puede medir mediante muchas técnicas, particularmente hibridación *in situ* fluorescente (FISH), pero incluyendo también y no limitado a PCR cuantitativa, hibridación de Southern cuantitativa, y similares.

Por “muestra de tejido” se quiere decir una colección de células similares obtenidas a partir de un tejido de un sujeto o paciente, preferentemente que contiene células nucleadas con material cromosómico. Los cuatro tejidos humanos principales son (1) epitelio; (2) tejidos conectivos, incluyendo vasos sanguíneos, hueso y cartílago; (3) tejido muscular; y (4) tejido nervioso. La fuente de la muestra de tejido puede ser tejido sólido tal como una muestra de órgano o tejido fresca, congelada y/o preservada o una biopsia o aspirado; sangre y cualquiera de los constituyentes sanguíneos; fluidos corporales tales como fluido cerebrospinal, fluido amniótico, fluido peritoneal, o fluido intersticial; células procedentes de cualquier momento en la gestación o desarrollo del sujeto. La muestra de tejido también pueden ser células primarias o cultivadas o líneas celulares. La muestra de tejido puede contener compuestos que no están entremezclados de manera natural con el tejido en la naturaleza tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares. En una realización de la invención, la muestra de tejido es “tejido no hematológico” (es decir, ni tejido sanguíneo ni médula ósea).

Para los propósitos del presente documento una “sección” en una muestra de tejido quiere decir una sola parte o pieza de una muestra de tejido, por ejemplo, una loncha delgada de tejido o células cortada de una muestra de tejido. Se entiende que se pueden tomar múltiples secciones de muestras de tejido y se pueden someter a análisis según la presente invención, siempre que se entienda que la presente invención comprende un procedimiento en el que la misma sección de la muestra de tejido se puede analizar tanto a nivel morfológico como molecular, y se puede analizar en lo que respecta tanto a proteínas como ácidos nucleicos.

Por “correlacionado” o “correlacionar” se quiere decir comparar, de cualquier modo, el comportamiento y/o resultados de un primer análisis con el comportamiento y/o resultados de un segundo análisis. Por ejemplo, se pueden usar los resultados de un primer análisis para llevar a cabo el segundo análisis y/o se pueden usar los resultados de un primer análisis para determinar si se debe realizar un segundo análisis y/o se pueden comparar los resultados de un primer análisis con los resultados de un segundo análisis. En relación a la IHC combinada con la FISH, uno puede usar los resultados de la IHC para determinar si se debe realizar la FISH y/o uno puede comparar el nivel de expresión de proteínas con la amplificación génica para caracterizar adicionalmente una biopsia tumoral (por ejemplo, comparar la expresión de la proteína HER2 con la amplificación del gen *her2*). Una característica ventajosa de la invención es la capacidad para identificar pacientes que probablemente se beneficien de tratamiento usando la FISH, incluso si la IHC indica que tienen pocos antígenos.

Por “ácido nucleico” se pretende incluir cualquier ADN o ARN, por ejemplo, ácido nucleico cromosómico, mitocondrial, vírico y/o bacteriano presente en la muestra de tejido. El término “ácido nucleico” engloba cualquiera o ambas cadenas de una molécula de ácido nucleico de doble cadena que incluye cualquier fragmento o porción de una molécula de ácido nucleico intacta.

Por “gen” se quiere decir cualquier secuencia de ácido nucleico o una porción de la misma con un papel funcional en la codificación o transcripción de un ARN (ARNr, ARNt, o ARNm, este último capaz de traducirse en una proteína) o a la regulación de la expresión de otro gen. El gen puede constar de todos los ácidos nucleicos responsables de la codificación de una proteína funcional o es sólo una porción de los ácidos nucleicos responsables de la codificación o expresión de una proteína. La secuencia de ácidos nucleicos puede contener una anomalía genética dentro de exones, intrones, regiones de iniciación o terminación, secuencias promotoras, otras secuencias reguladoras o regiones adyacentes únicas al gen.

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

“Herregulina” (HRG) cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por el producto del gen de la herregulina como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.641.869 o Marchionni y col., Nature, 362:312-318 (1993), y variantes biológicamente activas de esos polipéptidos. Ejemplos de herregulinas incluyen la herregulina-alfa, herregulina-beta1, herregulina-beta2, y herregulina-beta3 (Holmes y col., Science, 256:1205-1210 (1992); y la patente de EE.UU. N° 5.641.869); el factor de diferenciación neu (NDF) (Peles y col, Cell 69: 205-216 (1992)); la actividad que induce el receptor de la acetilcolina (ARIA) (Falls y col.

ES 2 331 646 T3

Cell72:801-815 (1993)); los factores de crecimiento gliales (GGFs) (Marchionni y col., *Nature*, 362:312-318 (1993)); el factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho y col. *J. Biol. Chem.* 270:14523-14532 (1995)); la gamma-herregulina (Schaefer y col. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)). Un ejemplo de una variante de una secuencia de aminoácidos/fragmento biológicamente activo de una secuencia nativa de un polipéptido HRG, es un fragmento del dominio tipo EGF (por ejemplo, HRG-beta1, 177-244).

Un “hetero-oligómero de ErbB” en el presente documento es un oligómero asociado no covalentemente que comprende al menos dos receptores ErbB diferentes. Estos complejos se pueden formar cuando una célula que expresa dos o más receptores ErbB se expone a un ligando de ErbB y se pueden aislar mediante inmunoprecipitación y analizar mediante SDS-PAGE como se describe en Sliwowski y col., (*J. Biol. Chem.*, 269(20):4661-14665 (1994)), por ejemplo. Los ejemplos de esos hetero-oligómeros de ErbB incluyen complejos EGFR-HER2, HER2-HER3, y HER3-HER4. Además, el hetero-oligómero de ErbB puede comprender dos o más receptores HER2 combinados con un receptor ErbB diferente, tal como HER3, HER4, o EGFR. En el hetero-oligómero pueden estar incluidas otras proteínas, tales como una subunidad del receptor de citoquinas (por ejemplo, gp130).

Los términos “ErbB 1”, “receptor del factor de crecimiento epidérmico” y “EGFR” en el presente documento se usan de manera intercambiable y se refieren al EGFR de secuencia nativa como se describe, por ejemplo, en Carpenter y col. (*Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987)), incluyendo sus variantes (por ejemplo, un mutante de delección del EGFR como en Humphrey y col., (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4207-4211 (1990)). El ErbB1 se refiere al gen que codifica el producto de la proteína EGFR. Ejemplos de anticuerpos que se pueden unir al EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRLHB 8506), Mab 455 (ATCC CRL HB 8507), Mab 225 (ATCC CRL 8508), Mab 528 (ATCC CRL 8509) (véase, patente de EE.UU. N° 4.943.533) y sus variantes, tales como 225 quimerizado (C225) y 225 humano reformado (H225) (véase, publicación PCT N° WO 96/40210).

Las expresiones “ErbB2” y “HER2” se usan en el presente documento de manera intercambiable y se refieren a la proteína HELP2 humana de secuencia nativa descrita, por ejemplo, en Semba y col., (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6497-6501 (1985)) y Yamamoto y col. (*Nature* 319:230-234 (1986)) (número de acceso del Genebank X03363), y sus variantes. El término erbB2 se refiere al gen que codifica el HER2 humano y neu se refiere al gen que codifica la p185neu de rata. El HER2 preferido es el HER2 humano de secuencia nativa. Ejemplos de anticuerpos que se unen al HER2 incluyen MAb 4D5 (ATCC CRL 10463), 2C4 (ATCC HB-12697), 7F3 (ATCC HB-12216), y 7C2 (ATCC HB-12215) (véase, patente de EE.UU. N° 5.772.997; publicación PCT N° WO 98/77797; y patente de EE.UU. N° 5.840.525). Los anticuerpos anti-HER2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7, y huMAb4D5-8 (Herceptin®) como se describe en la Tabla 3 de la patente de EE.UU. N° 5.821.337; y 520C9 humanizados (publicación PCT N° WO 93/21319). Los anticuerpos anti-HER2 humano se describen en la patente de EE.UU. N° 5.772.997 y en la publicación PCT N° WO 97/00271.

El “ErbB3” y “HER3” se refieren al polipéptido receptor como se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 5.183.884 y 5.480.968, así como Kraus y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9193-9197 (1989)), incluyendo sus variantes. Anticuerpos ejemplares que se unen al HER3 se describen en la patente de EE.UU. N° 5.968.511, por ejemplo, el anticuerpo 8B8 (ATCC HB-12070) o una de sus variantes humanizadas. Los términos “ErbB4” y “HER4” en el presente documento se refieren al polipéptido receptor como se describe, por ejemplo, en la solicitud europea N° EP 599.274; Plowman y col., (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993)); y Plowman y col., (*Nature*, 366:473-475 (1993)), incluyendo sus variantes tales como las isoformas de HER4 descritas en la publicación PCT N° WO 99/19488.

Un “antagonista de ErbB” es cualquier molécula que se una a un receptor ErbB y bloquee la activación por el ligando del receptor ErbB. Esos antagonistas incluyen, pero no están limitados a, ligandos modificados, péptidos ligandos (es decir, fragmentos de ligando), receptores ErbB solubles, y, preferentemente, anticuerpos anti-ErbB.

El “tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquéllos en necesidad de tratamiento incluyen aquéllos que ya presentan un trastorno, así como aquéllos en los que se deba prevenir el trastorno.

“Mamífero”, para los propósitos del tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, de recreo, o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferentemente, el mamífero es un humano.

Un “trastorno” es cualquier dolencia que se beneficiaría del tratamiento con el antagonista de ErbB, por ejemplo, un anticuerpo anti-ErbB2, y de manera más general, cualquier cáncer en el que la administración de un anticuerpo contra un antígeno sobreexpresado pueda tratar el cáncer. Esto incluye trastornos y enfermedades crónicas y agudas, incluyendo aquellas dolencias patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en el presente documento incluyen tumores benignos y malignos; leucemias y enfermedades linfoides; enfermedades neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicas y otros trastornos glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocísticos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se usa para referirse a una cantidad que tiene un efecto antiproliferativo. Preferentemente, la cantidad terapéuticamente eficaz dispara la citotoxicidad mediada por anticuerpos, activa el complemento, tiene una actividad apoptótica, o es capaz de inducir la muerte celular, y preferentemente la muerte

de células tumorales benignas o malignas, en particular, células cancerígenas. La eficacia se puede medir de formas convencionales, dependiendo de la dolencia a tratar. Para la terapia contra el cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, valorando el tiempo para la progresión de la enfermedad (TTP), la supervivencia, el tamaño del tumor, o la determinación de las tasas de respuesta (RR) (véase el Ejemplo a continuación).

5 Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la dolencia fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no está limitado a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, melanoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de esos cánceres incluyen cánceres de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas,
10 adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, y diversos tipos de cánceres de cabeza y cuello.

15 Un “cáncer que expresa ErbB” es uno que comprende células que tienen la proteína ErbB presente en su superficie celular, de manera que un anticuerpo anti-ErbB es capaz de unirse al cáncer.

20 El término “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de células y/o provoca la destrucción de células. Está previsto que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, I131, I125, Y90, y Re186), agentes quimioterapéuticos, toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de plantas o animal, o sus fragmentos.

25 Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXANTM); alquilsulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosfaoramida y trimetilolmelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato del óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenestrina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomicinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliceamicina, carabicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, 6-diazo-S-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, porfomicina, puromicina, estreptonigrina, estreptoazocina, tubercidina, ubenimex, cinostatina, zorubicina;
30 anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reaprovisionadores del ácido fólico tales como ácido frofílico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaciquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbina; PSK[®]; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaciquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitabina; arabinósido (“Ara-C”); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; carminomicina; aminopte-
45 rina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilnolutina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. En esta definición también están incluidos agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas sobre tumores tales como anti-estrógenos, incluyendo, por ejemplo, tamoxifen, raloxifeno, 4 (5)-imidazoles que inhiben la aromatasas, 4-hidroxitamoxifen, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona; y anti-andrógenos tales como flutamida y nilutamida; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

50 Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que sobreexpresa ErbB ya sea *in vitro* o *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan ErbB en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en una fase distinta a la fase S), tales como agentes que inducen la detención en G1 y la detención en fase M. los bloqueantes clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), TAXOL[®], e inhibidores de la topoisomerasa II tales como la doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina.
65 Aquellos agentes que detienen en G1 también fuerzan la detención en la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN tales como tamoxifen, prednisona, dacarbina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Se puede encontrar información adicional en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” por Murakami y col. (WB Saunders: Filadel-

fia, 1995), especialmente p. 13. También se puede emplear para este propósito el anticuerpo 4D5 (y sus equivalentes funcionales).

Tirosina quinasas del receptor ErbB

5

Las tirosina quinasas del receptor ErbB son mediadores importantes del crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular. La familia de receptores incluye, al menos, cuatro miembros distintos incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o ErbB1), HER2 (ErbB2 o p185neu), HER3 (ErbB3), y HER4 (ErbB4 o tyro2).

10

El EGFR, codificado por el gen ErbB1, ha sido implicado causalmente en la enfermedad humana. En particular, se ha observado la expresión incrementada del EGFR en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello, y estómago, así como en glioblastomas. La expresión incrementada del receptor EGFR a menudo se asocia a una producción incrementada del ligando de EGFR, el factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa), por las mismas células tumorales que da como resultado la activación del receptor por una vía estimuladora autocrina. Baselga y Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFR o sus ligandos, el TGF-alfa y el EGF, han sido evaluados como agentes terapéuticos en el tratamiento de esas enfermedades. Véase, por ejemplo, Baselga y Mendelsohn., *supra*; Masui y col. *Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); y Wu y col. *J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995).

15

20

El segundo miembro de la familia ErbB, p185neu, fue identificado originalmente como el producto del gen transformante procedente de neuroblastomas de ratas tratadas químicamente. La forma activada del proto-oncogen neu es el resultado de una mutación puntual (valina a ácido glutámico) en la región transmembrana de la proteína codificada. La amplificación del homólogo humano de neu se observó en cánceres de mama y ovario y se correlaciona con una mala prognosis (Slamon y col., *Science*, 235:177-182(1987); Slamon y col., *Science*, 244:707-712 (1989); y patente de EE.UU. N° 4.968.603). Hasta la fecha, no se ha informado de ninguna mutación puntual análoga a la del proto-oncogen neu para tumores humanos. La sobreexpresión de HER2 (frecuente, pero no uniformemente debido a la amplificación génica) también se ha observado en otros carcinomas incluyendo carcinomas de estómago, endometrio, glándulas salivales, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga.

25

30

Se han descrito anticuerpos dirigidos contra los productos de la proteína p185neu de rata y la HER2 humana. Drebin y sus colegas han generado anticuerpos contra el producto del gen neu de rata, p185neu (véase, por ejemplo, Drebin y col., *Cell* 41:695-706 (1985); Myers y col., *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991); y el documento WO94/22478). Drebin y col. (*Oncogene* 2:273-277(1988)) informan de que mezclas de anticuerpos reactivos con dos regiones distintas de p185neu dan como resultado efectos antitumorales sinérgicos sobre células NIH-3T3 neu transformadas implantadas en ratones desnudos (véase también patente de EE.UU. N° 5.824.311).

35

40

Hudziak y col., (*Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989)) describen la generación de un plantel de anticuerpos anti-HER2, que se caracterizaron usando la línea de células tumorales de mama humanas SKBR3. La proliferación celular relativa de las células SKBR3 después de la exposición a los anticuerpos se determinó mediante tinción de cristal violeta de las monocapas después de 72 horas. Usando este ensayo, se obtuvo la inhibición máxima con el anticuerpo denominado 4D5, que inhibió la proliferación celular en un 56%. Otros anticuerpos del plantel redujeron la proliferación celular en un menor grado en este ensayo. Además se encontró que el anticuerpo 4D5 sensibiliza las líneas de células tumorales de mama que sobreexpresan HER2 a los efectos citotóxicos del TNF-alfa (Véase también, patente de EE.UU. N° 5.677.171). Los anticuerpos anti-HER2 descritos en Hudziak y col. fueron caracterizados adicionalmente (Fendly y col. *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts y col. *In vitro* 26(3):59A (1990); Sarup y col. *Growth Regulation*:72-82 (1991); Shepard y col. *J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127 (1991); Kumar y col. *Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986 (1991); Lewis y col. *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras y col. *Oncogene*9:1829-1838 (1994); Vitetta, y col. *Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski y col. *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994); Scott y col. *J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991); D'souza y col. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994); Lewis y col. *Cancer Research* 56:1457-1465(1996); y Schaefer y col. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)).

45

50

Una versión IgG1 humanizada recombinante del anticuerpo 4D5 murino anti-HER2 (rhuMAb HER2 o Herceptin®; disponible comercialmente en Genentech, Inc., South San Francisco) es clínicamente activa en pacientes con cánceres de mama metastáticos que sobreexpresan HER2 que han recibido una terapia anti-cancerígena previa extensiva (Baselga y col., *J. Clin. Oncol.*14:737-744 (1996)). El Herceptin® recibió la aprobación para su comercialización de la Administración para alimentos y fármacos (FDA) el 25 septiembre 1998, para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastático cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2. El protocolo de tratamiento actual emplea la IHC para determinar la sobreexpresión de la proteína HER2.

55

60

Se han descrito otros anticuerpos anti-HER2 con diversas propiedades (Tagliabue y col., *Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991); McKenzie y col., *Oncogene* 4:543-548 (1989); Maier y col., *Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991); Bacus y col., *Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990); Stancovski y col., (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*) 88:8691-8695 (1991); Bacus y col., *Cancer Research* 52:2580-2589 (1992); Xu y col. *Int. J. Cancer* 53:401-408 (1993); y la publicación PCT N° WO 98/77797).

65

La selección por homología ha dado como resultado los miembros de la familia de los receptores: HER3 (patentes de EE.UU. N° 5.183.884 y 5.480.968; Kraus y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9193-9197 (1989)) y HER4 (solicitud de patente europea N° EP 599 274; Plowman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); y

Plowman y col., *Natce*, 366:473-4.75 (1993)). Estos dos receptores presentan una expresión incrementada sobre, al menos, algunas líneas celulares de cáncer de mama.

Los receptores ErbB generalmente se encuentran en diversas combinaciones en células y se piensa que la heterodimerización incrementa la diversidad de las respuestas celulares a una variedad de ligandos de ErbB (Earp y col., *Breast Cancer Research and Treatment* 35:115-132 (1995)). El EGFR se une a seis ligandos diferentes: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), la amfirregulina, el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB=EGF), la betacelulina, y la epirregulina (Groenen y col. *Growth Factors* 11:235-257 (1994)). Una familia de proteínas herregulina que resulta del procesamiento alternativo de un solo gen son ligandos para HER3 y HER4. La familia herregulina incluye las herregulinas alfa, beta, y gamma (Holmes y col., *Science*, 256:1205-1210 (1992); patente de EE.UU. N° 5.641.869; y Schaefer y col., *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)); los factores de diferenciación neu (NDFs), los factores de crecimiento gliales (GGFs); la actividad que induce el receptor de acetilcolina (ARIA); y el factor derivado de las neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (para una revisión, véase Groenen y col., *Growth Factors* 11:235-257 (1994); Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247-262(1996) y Lee y col. *Pharm. Rev.* 47:51-85 (1995)). Recientemente, han sido identificados dos ligandos de ErbB adicionales: la neurregulina-2 (NRG-2), que se ha informado de que se une a cualquiera de HER3 o HER4 (Chang y col., *Nature*: 387 509-512 (1997); y Carraway y col., *Nature* 387:512-516 (1997)) y la neurregulina-3, que se une a HER4 (Zhang y col., (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*) 94(18):9562-7 (1997)). El HB-EGF, la betacelulina, y la epirregulina también se unen a HER4.

Aunque el EGF y el TGF- α no se unen a HER2, el EGF estimula al EGFR y a HER2 a formar un heterodímero, que activa el EGFR y da como resultado la transfosforilación de HER2 en el heterodímero. La dimerización y/o transfosforilación parece activar la tirosina quinasa de HER2, (Earp y col., *supra.*). Asimismo, cuando HER3 se co-exprende con HER2, se forma un complejo de señalización activo y los anticuerpos dirigidos contra HER2 son capaces de romper este complejo (Sliwkowski y col., *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)). Adicionalmente, la afinidad de HER3 por la herregulina (HRG) se incrementa hasta un estado de afinidad superior cuando se co-exprende con HER2. Véase también, Levi y col., *Journal of Neuroscience* 15: 1329-1340 (1995); Morrissey y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1431-1435 (1995); y Lewis y col., *Cancer Res.*, 56:1457-1465 (1996) con respecto al complejo de proteínas HER2-HER3. El HER4, al igual que HER3, forma un complejo de señalización activo con HER2 (Carraway y Cantley, *Cell* 78:5-8(1994)).

Detección de la amplificación génica

La presente invención contempla el uso de cualquier técnica para detectar la amplificación génica (véase, Boxer, *J. Clin. Pathol.* 53: 19-21(2000)). Estas técnicas incluyen hibridación *in situ* (Stoler, *Clin. Lab. Med.* 12:215-36 (1990)), usando sondas marcadas con radioisótopos o con fluoróforos; reacción en cadena de la polimerasa (PCR); análisis de transferencia de Southern cuantitativo, y otras técnicas para cuantificar genes individuales. Preferentemente las sondas o cebadores seleccionados para la evaluación por amplificación génica son altamente específicos, para evitar detectar genes homólogos íntimamente relacionados.

La palabra "marcador" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que se conjuga o se fusiona directa o indirectamente a un reactivo tal como una sonda de ácidos nucleicos o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo al cual está conjugado o fusionado. El propio marcador puede ser detectable (por ejemplo, marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que sea detectable. También puede servir como marcador un hapteno o un epítipo que se una inmunoespecíficamente a un anticuerpo.

El término "sonda de ácidos nucleicos marcada fluorescentemente" se refiere a una sonda que comprende (1) un ácido nucleico que tiene una secuencia que lo hace capaz de hibridarse a una secuencia de ácido nucleico diana y (2) un marcador fluorescente. Preferentemente esa hibridación es específica, es decir, se puede producir en condiciones muy rigurosas.

Preparación de la muestra

Se puede usar cualquier muestra de tejido procedente de un sujeto. Los ejemplos de muestras de tejido que se pueden usar incluyen, pero no están limitadas a, mama, próstata, ovario, colon, pulmón, endometrio, estómago, glándulas salivales o páncreas. La muestra de tejido se puede obtener mediante una variedad de procedimientos que incluyen, pero no están limitados a escisión quirúrgica, aspiración, o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, la muestra de tejido se fija y se embebe en parafina o similar.

La muestra de tejido se puede fijar (es decir, preservar) mediante metodología convencional (véase, por ejemplo, *Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology*, 3rd Edition Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company: Nueva York; (1960); *The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology* (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.). Alguien con conocimientos en la materia apreciará que la elección del fijador está determinada por el propósito para el cual el tejido se debe teñir histológicamente o se debe analizar de otra forma. Alguien con conocimientos en la materia también apreciará que la duración de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido, y del fijador usado. A modo de ejemplo, para fijar una muestra de tejido se puede usar formalina en tampón neutro, disolución de Bouin o paraformaldehído.

ES 2 331 646 T3

Generalmente, la muestra de tejido se fija primero y a continuación se deshidrata mediante una serie de alcoholes creciente, se infiltra, y se embebe con parafina u otros medios de sección, de manera que la muestra de tejido se pueda seccionar. Alternativamente, uno puede seccionar el tejido y fijar las secciones obtenidas. A modo de ejemplo, la muestra de tejido se puede embeber y procesar en parafina mediante metodología convencional. Ejemplos de parafina que se puede usar incluyen, pero no están limitados a, Paraplast, Broloid, y Tissuemay. Una vez embebida la muestra de tejido, la muestra se puede seccionar con un micrótopo o similar. A modo de ejemplo para este procedimiento, las secciones pueden estar comprendidas entre 3 μm aproximadamente y 5 μm de grosor aproximadamente. Una vez seccionadas, las secciones se pueden fijar a portaobjetos mediante diversos procedimientos habituales. Ejemplos de adhesivos para portaobjetos incluyen, pero no están limitados a, silano, gelatina, poli-L-lisina, y similares. Por ejemplo, las secciones embebidas en parafina se pueden fijar a portaobjetos cargados positivamente, portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina.

Si se ha usado parafina como material para embeber, las secciones de tejido generalmente se desparafinan y se rehidratan en agua. Las secciones de tejido se pueden desparafinar mediante diversas metodologías estándar convencionales. Por ejemplo, se pueden usar xilenos y una serie de alcoholes que decrecen gradualmente. Alternativamente, se pueden usar agentes desparafinizantes no orgánicos disponibles comercialmente tales como Hemo-De7 (CMS, Houston, Texas).

Hibridación in situ fluorescente (FISH)

La hibridación *in situ* generalmente se lleva a cabo sobre células o secciones de tejido fijadas a portaobjetos. La hibridación *in situ* se puede realizar mediante diversas metodologías convencionales (véase, por ejemplo, Leitch y col., *In situ Hybridization: A Practical Guide*, Oxford BIOS Scientific Publishers, Microscopy Handbooks v. 27 (1994)). En un procedimiento de hibridación *in situ*, se usan colorantes fluorescentes (tales como isotioeyanato de fluoresceína (FITC) que fluoresce con luz verde cuando se excita con un láser de iones de argón) para marcar una sonda de una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos diana en la célula. Cada célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana se unirá a la sonda marcada produciendo una señal fluorescente tras la exposición de las células a una fuente de luz de una longitud de onda apropiada para la excitación del fluorocromo específico usado. Una "secuencia de nucleótidos diana" es una secuencia específica para un antígeno tumoral sobreexpresado, tal como ErbB. Se puede usar análisis FISH junto con otros ensayos, incluyendo, sin limitación, tinción morfológica (de secciones seriadas o de la misma sección; véase publicación PCT N° WO 00/20641).

Se pueden emplear diversos grados de rigurosidad de hibridación. A medida que las condiciones de hibridación se vuelven más rigurosas, es necesario un mayor grado de complementariedad entre la sonda y la diana para formar y mantener un dúplex estable. La rigurosidad se incrementa subiendo la temperatura, reduciendo la concentración salina, o incrementando la concentración de formamida. Añadiendo sulfato de dextrano o incrementando su concentración también se puede incrementar la concentración eficaz de la sonda marcada para incrementar la velocidad de hibridación y la intensidad de señal final. Después de la hibridación, los portaobjetos se lavan en una disolución que generalmente contienen reactivos similares a aquéllos encontrados en la disolución de hibridación con tiempos de lavado que varían de minutos a horas dependiendo de la rigurosidad necesaria. Lavados más prolongados o más rigurosos normalmente reducen el ruido no específico, pero se corre el riesgo de reducir la sensibilidad global.

Las sondas usadas en el análisis FISH pueden ser oligonucleótidos o polinucleótidos de ARN o ADN y pueden contener no sólo nucleótidos de origen natural sino sus análogos tales como la digoxigenina dCTP, biotina dCTP 7-azaguanosina, azidotimidina, inosina, o uridina. Otras sondas útiles incluyen sondas de péptidos y sus análogos, ADN génico ramificado, peptidomiméticos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), y/o anticuerpos.

Las sondas deben tener una complementariedad suficiente con la secuencia de ácidos nucleicos diana de interés de manera que se produzca una unión estable y específica entre la secuencia de ácidos nucleicos diana y la sonda. El grado de homología necesario para una hibridación estable varía con la rigurosidad del medio de hibridación y/o el medio de lavado. Preferentemente, en la presente invención se emplean sondas completamente homólogas, pero personas con conocimientos en la materia apreciarán rápidamente que en la presente invención se pueden usar sondas que presentan una homología menor, pero suficiente (véase por ejemplo, Sambrook, J., y col., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, (1989)).

Alguien con conocimientos en la materia apreciará que la elección de la sonda dependerá de las características del gen diana de interés. Ejemplos de amplificación incluyen, pero no están limitados a, her2/neu en cáncer de mama y ovario, n-myc en neuroblastoma, c-myc en cáncer de pulmón de células pequeñas. A modo de ejemplo, para evaluar la amplificación de her2/neu, se puede usar una sonda que se extiende por una región de 140 kb en el brazo largo del cromosoma 17 que contiene el gen her2/neu (17q 11.2-17q12). Para evaluar la aneusomía del cromosoma 17 como fuente o causa de la amplificación de her2/neu se puede usar una sonda para la secuencia satélite en la región centromérica del cromosoma 17 (D1721). Por ejemplo, se puede obtener una versión mezclada de estas sondas en Vysis, Inc. en la que cada sonda se marca directamente con fluoróforos fácilmente distinguibles, tales como SPECTRUM ORANGE7 y SPECTRUM GREEN7.

Las sondas también se pueden generar y seleccionar por diversos medios incluyendo, pero no limitado a, mapeo por hibridación *in situ*, planteles de híbridos de células somáticas, o análisis de transferencia de puntos de cromosomas clasificados; análisis de unión cromosómico; o clonados o aislados procedentes de librerías cromosómicas clasificadas de líneas celulares humanas o híbridos de células somáticas con cromosomas humanos, radiación de híbridos celulares

somáticos, microdissección de una región cromosómica, o de cromosomas artificiales de levadura (YACs) identificados mediante cebadores de PCR específicos para un locus cromosómico único u otros medios adecuados como un clon de YAC adyacente. Las sondas pueden ser ADN genómico, ADNc, o ARN clonado en un plásmido, fago, cósmido, YAC, cromosomas artificiales bacterianos (BACs), vectores víricos, o cualquier otro vector adecuado. Las sondas se pueden clonar o se pueden sintetizar químicamente mediante procedimientos convencionales. Cuando se clonan, los fragmentos de ácidos nucleicos de la sonda aislada normalmente se insertan en un vector, tal como el fago lambda, pBR322, M13, o vectores que contienen el promotor de SP6 o T7 y se clonan como una librería en un hospedador bacteriano (véase, por ejemplo, Sambrook, *supra*).

Las sondas preferentemente se marcan con un fluoróforo. Ejemplos de fluoróforos incluyen, pero no están limitados a, quelatos de las tierras raras (quelatos de europio), Texas Red, rodamina, fluoresceína, dansilo, Lissamina, umbeliferona, ficocriterina, ficocianina, o fluoróforos disponibles comercialmente tales como SPECTRUM ORANGE7 y SPECTRUM GREEN7, y/o derivados de uno cualquiera o más de los anteriores. Las múltiples sondas usadas en el ensayo se pueden marcar con más de un color fluorescente o pigmento distinguible. Estas diferencias de color proporcionan un medio para identificar las posiciones de hibridación de sondas específicas. Además, las sondas que no están separadas espacialmente se pueden identificar por una luz o pigmento de color diferente que resulta de la mezcla de otros dos colores (por ejemplo, luz roja + verde = amarilla), pigmento (por ejemplo, azul + amarillo = verde), o con el uso de una serie de filtros que sólo permite el paso de un color cada vez.

Las sondas se pueden marcar directa o indirectamente con el fluoróforo, utilizando la metodología convencional. Se pueden añadir sondas y colores adicionales para refinar y ampliar este procedimiento general para que incluya más anomalías genéticas o sirvan como controles internos. A modo de ejemplo, el gen *her2/neu* está en el cromosoma 17, y como control interno se puede usar una sonda para las secuencias satélite específicas para el cromosoma 17 (D17Z1) (Vysis, Inc.) para demostrar que es diploide en áreas de células malignas y/o establecer la presencia o ausencia de aneusomía del cromosoma 17 en áreas de la amplificación de *her2/neu*.

Después del procesamiento por FISH, los portaobjetos se pueden analizar mediante técnicas habituales de microscopía de fluorescencia (véase por ejemplo, Ploem y Tanke, *Introduction to Fluorescence Microscopy*, Oxford University Press: Nueva York (1987)). Resumiendo, cada portaobjetos se observa usando un microscopio equipado con filtros de excitación, filtros dicrómicos, y filtros de barrera apropiados. Los filtros se seleccionan basándose en los espectros de excitación y emisión de los fluorocromos usados. Las fotografías de los portaobjetos se pueden tomar con un tiempo de exposición de la película que depende del marcador fluorescente usado, la intensidad de la señal y el filtro elegido. Para el análisis FISH, los loci físicos de las células de interés determinados en el análisis morfológico son revisados y se confirma visualmente que están en el área apropiada para la cuantificación por FISH.

Para correlacionar la IHC con la FISH se puede usar una fase monitorizada por ordenador que almacena la localización de las coordenadas. Esto se puede usar para evaluar la misma área con dos técnicas analíticas diferentes. Por ejemplo, se pueden capturar imágenes en color de las áreas morfológicamente teñidas y se pueden guardar usando una cámara CCD refrigerada asistida por ordenador. Posteriormente la misma sección se puede someter a un procedimiento de FISH, se revisan las localizaciones almacenadas, y las áreas designadas se puntúan para la presencia de señales nucleares fluorescentes. Se contempla un procedimiento similar para la IHC seguida de FISH.

Normalmente, cientos de células se someten a barrido en una muestra de tejido y la cuantificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana específica se determina en forma de manchas fluorescentes, que se recuentan en relación al número de células. La desviación de la norma del número de manchas en una célula (por ejemplo, tal como el sondeo para el gen *her2/neu* en una célula normal producirá dos copias, en una célula anormal más de dos) es indicativa de una mayor probabilidad del beneficio de una terapia con anticuerpos específicos para antígenos tumorales, por ejemplo, una terapia con antagonistas de ErbB. Como se ejemplifica más abajo, la amplificación del gen *her2* proporciona una indicación mucho más eficaz de la probabilidad de que una terapia con un anticuerpo anti-HER será eficaz.

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los antagonistas, por ejemplo, anticuerpos, usados de acuerdo con la presente invención, se preparan para el almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene del grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 17th edition, Osol, A. Ed.), en forma de formulaciones o disoluciones acuosas liofilizadas. Los vehículos, excipientes, o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tal como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de 10 residuos aproximadamente); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Formulaciones de anticuerpo anti-ErbB2 liofilizadas preferidas se describen en el documento WO 97/04801.

ES 2 331 646 T3

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular a tratar, preferentemente aquéllos con actividades complementarias que no interactúan adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar anticuerpos adicionales que se unan a EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, factor endotelial vascular (VEGF), o un anticuerpo que se una a un epítipo diferente sobre el ErbB diana, en la formulación. Alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento y/o un cardioprotector. Esas moléculas están presentes en combinación de manera conveniente en cantidades que son eficaces para los propósitos previstos.

Los principios activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas o nanocápsulas) o en microemulsiones. Esas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 17th edition, Osol, A. Ed.

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* son, preferentemente, y en el caso de humanos, deben ser, estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(vinilalcohol), poliláctidos (patente de EE.UU. N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como el etilen-vinil acetato y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan las proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, se pueden desnaturalizar o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado la pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de grabación es la formación de un enlace S-S intermolecular mediante un intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir modificando los residuos sulfidriilo, liofilizando en disoluciones ácidas, controlando el contenido en humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Tratamiento con los antagonistas anti-ErbB

Está contemplado que, según la presente invención se pueden usar anticuerpos anti-ErbB u otros antagonistas objeto de las reivindicaciones para tratar diversas dolencias caracterizadas por la sobreexpresión y/o activación del receptor ErbB en pacientes en los que se ha encontrado que presentan un gen *erbB* amplificado. Condiciones y trastornos ejemplares incluyen tumores benignos o malignos (por ejemplo, renal, de hígado, riñón, vejiga, mama, gástrico, ovario, colorrectal, próstata, pancreático, pulmón, vulva, tiroides, carcinoma hepático; sarcomas; glioblastomas; y diversos tumores de cabeza y cuello); leucemias y enfermedades linfoides, otros trastornos tales como trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos, glandulares, macrófagos, epiteliales, estromales, blastocísticos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

Los anticuerpos, agentes terapéuticos y cualquier otro agente activo de la invención se administran a un paciente humano de acuerdo con procedimientos conocidos tales como administración intravenosa en forma de bolo o infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo.

En una realización, el tratamiento supone la administración combinada de un anticuerpo anti-HER2 y un agente quimioterapéutico, por ejemplo, un taxoide. La presente invención contempla la administración de un cóctel de diferentes agentes quimioterapéuticos. La administración combinada incluye la coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente hay un periodo de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus efectos biológicos. La preparación y los calendarios de dosificación para esos agentes quimioterapéuticos se pueden usar según las instrucciones del fabricante o como se determina empíricamente por un facultativo experto. La preparación y el calendario de dosificación para esa quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, William & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder, o seguir a la administración del anticuerpo o se puede dar simultáneamente con él. El anticuerpo se puede combinar con un compuesto anti-estrógeno tal como tamoxifen o una anti-progesterona tal como onapristona (véase, documento EP 616 812) en dosificaciones conocidas para esas moléculas.

Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente se puede someter a la extracción quirúrgica de células cancerígenas (resección tumoral) y/o radioterapia.

ES 2 331 646 T3

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada del antagonista, por ejemplo, el anticuerpo, dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se define anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del facultativo que atiende. El anticuerpo se administra de manera conveniente al paciente una sola vez o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 15 mg/kg aproximadamente (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidato inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, con una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica puede abarcar entre 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 100 mg/kg aproximadamente o superior, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o periodos más prolongados, dependiendo de la dolencia, el tratamiento se mantiene hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. No obstante, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

15 *Envases farmacéuticos: Artículos de fabricación*

También se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un contenedor, opcionalmente etiquetado, y un prospecto en el paquete. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los contenedores pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El contenedor contiene una composición que es eficaz para el tratamiento de la dolencia y preferentemente tiene un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa con una disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja hipodérmica para inyección). En la composición al menos un agente activo es un anticuerpo terapéutico contra un antígeno antitumoral o un antagonista de ErbB, por ejemplo, un anticuerpo anti-ErbB. Una etiqueta sobre, o asociada a, el contenedor indica que la composición se usa para el tratamiento de la dolencia elegida. El artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo contenedor que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como tampón fosfato salino, solución de Ringer y solución de dextrosa. Este segundo tampón se puede usar para reconstituir el agente activo. Si fuera el caso, se proporciona en forma de polvo liofilizado o seco, o para diluir una preparación concentrada del agente activo. Adicionalmente puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial o del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

Además, el artículo de fabricación comprende un prospecto o prospectos en el paquete con instrucciones para su uso en pacientes en los que se ha encontrado que presentan una amplificación del gen *erbB*, por ejemplo, mediante pruebas de FISH. Esos pacientes pueden ser sujetos que, mediante IHC, serían excluidos del tratamiento con el antagonista de ErbB, por ejemplo, pacientes que tienen una puntuación de 0 ó 1+ usando un anticuerpo anti-HER2.

40 *Depósito de materiales*

Las siguientes líneas celulares de hibridoma han sido depositadas en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA (ATCC):

45	Denominación del anticuerpo	Nº ATCC	Fecha de depósito
	7C2	ATCC HB-12215	17 de octubre de 1996
	7F3	ATCC HB-12216	17 de octubre de 1996
50	4D5	ATCC CRL 10463	24 de mayo de 1990

Detalles adicionales de la invención se ilustran con los siguientes Ejemplos no limitantes.

55 Ejemplo 1

Concordancia entre los ensayos clínicos (CTA) y la hibridación in situ fluorescente (FISH) en los ensayos fundamentales con Herceptin®

60 Fue necesaria la sobreexpresión de HER2 a un nivel de 2+ o 3+ mediante inmunohistoquímica (IHC) para la inscripción en los ensayos de cáncer de mama metastático fundamentales con Herceptin®. El ensayo clínico (CTA) supone dos ensayos IHC separados realizados con anticuerpos monoclonales 4D5 (después de la digestión con proteasas de la muestra fijada en formalina) o CB11 (después de tratamiento térmico de la muestra fijada en formalina). Los sujetos eran elegibles si en cualquiera de los dos ensayos tenían una puntuación de 2+ o 3+. Si se realizan ambos, 65 la puntuación final fue la más alta de los dos resultados.

ES 2 331 646 T3

La concordancia entre el CTA y otra ICH, el HercepTest (HT), es del 79%. Ésta fue la base para la aprobación del HT por parte de la FDA para ayudar en la selección de pacientes para la terapia con Herceptin.

Este ejemplo describe un estudio de concordancia similar, utilizando material clínico enviado para la selección para los ensayos fundamentales con Herceptin®, que compara el CTA a la amplificación del gen her2/neu medida mediante el ensayo de FISH PathVysion. En los ensayos fundamentales, 5998 sujetos fueron seleccionados para la expresión de HER2; 1915 (32%) fueron casos positivos para el CTA y 4083 (68%) fueron negativos. Para este análisis se seleccionó una muestra aleatoria de 623 especímenes (relación 1:1 de positivo:negativo), 317 CTA+ y 306 CTA-. Los especímenes no estaban recién cortados de los bloques. Habían estado almacenados entre 2 y 4 años en secciones de 4-6 μ en portaobjetos de vidrio. Cada sección se sometió a ensayo para la amplificación de her2/neu usando el protocolo especificado en el prospecto del paquete del ensayo PathVysion. La amplificación se definió como una relación de la señal mayor o igual a 2. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Concordancia FISH/CTA

		CTA				
		0	1+	2+	3+	
FISH	-	207	28	67	21	
	+	7	2	21	176	
		4%	7%	24%	89%	529
FISH+ = relación de la señal HER2:CEP17 \geq 2						
Concordancia = 82% (79-85%)						

Para el total de 623 especímenes probados, se obtuvo un resultado de la señal de FISH en 529. Se produjo el fallo en el ensayo en el 19,9% de muestras CTA- y el 10,4% de muestras CTA+. La amplificación en los grupos 0, 1+, 2, y 3+ fue del 4,2%, 6,7%, 23,9%, y 89,3%, respectivamente. La concordancia de la muestra fue del 81,3%, similar a la concordancia del 79% del CTA/HT. La sobreexpresión de una sola copia fue del 31%, predominantemente en el grupo 2+. Raramente se apreció la amplificación en el grupo CTA- (4,6%). La tasa de fallo del ensayo más alta en el grupo CTA- puede ser debida a factores no relacionados con el ensayo tales como la fijación del tejido. Éstos también pueden dar como resultado falsos negativos para la IHC.

Estos datos se interpretaron cuidadosamente para sugerir que el estado de amplificación de her2/neu puede tener un valor predictivo inesperadamente superior en la identificación de pacientes que es más probable que se beneficien del tratamiento con Herceptin® comparado con el HercepTest. La observación de que sólo el 24% de los pacientes 2+ son FISH+ sugiere que este subgrupo puede tener unos resultados de tratamiento menos predecibles cuando se seleccionan sólo por IHC. La identificación de pacientes FISH+ en los subgrupos 1+ y 0 podría identificar sujetos que, a pesar de no cumplir los criterios de la IHC para el tratamiento con Herceptin®, probablemente se beneficiarían del tratamiento con Herceptin®. En el Ejemplo 2 se presenta un análisis directo de los beneficios del Herceptin® basados en la puntuación de la FISH comparado con la puntuación de la IHC.

Ejemplo 2

Estudio de FISH/resultados clínicos

Este ejemplo relaciona los resultados de tres ensayos con Herceptin® con el estado de la FISH. En este estudio, se seleccionaron 805 sujetos aleatoriamente procedentes de los tres ensayos. De éstos, 167 carecían de portaobjetos. Otros 78 ensayos (9,7%) fallaron. Así, las secciones cortadas fijadas en formalina almacenadas entre 2,5 y 4,5 años procedentes de 540 sujetos proporcionaron el conjunto de muestras para este estudio. No hubo desequilibrios en los indicadores demográficos o de pronosis en estas muestras. Los resultados se presentan para diferentes grupos de tratamiento.

ES 2 331 646 T3

La correlación del estado de la FISH con respuesta se evaluó para pacientes que habían recibido Herceptin® como terapia de segunda o tercera línea. Estos datos se presentan para sujetos 2+ y 3+ (por CTA) en la Tabla 2.

TABLA 2

FISH/Respuesta con el único agente Herceptin®, terapia de segunda o tercera línea, 2+/3+ combinados

	FISH +	FISH -	
Respuesta	21	0	
Sin respuesta	84	37	
Tasa de respuesta	20%	0%	
	(12,5-27,5%)	(0,7%)	N=142

La tasa de respuesta del 20% de sujetos FISH+ supera inesperadamente la tasa de respuesta del 15% de pacientes 2+ y 3+ en este estudio y la tasa de respuesta del 14% observada en pacientes seleccionados por CTA con una puntuación inmunohistoquímica de 2+ o 3+ durante los ensayos fundamentales. Así, aunque la FISH se correlaciona bien con la ICH hasta aproximadamente el mismo grado que otro ensayo IHC, el Hercep Test, como se muestra en el Ejemplo 1, es inesperadamente superior en la identificación de pacientes que es más probable que se beneficien de la terapia con Herceptin®.

Cuando estos datos se detallan en los componentes de los sujetos 3+ y 2+, se observa la misma tasa de respuesta del 20% de sujetos FISH+ (Tablas 3 y 4).

TABLA 3

FISH/Respuesta con el único agente Herceptin®, terapia de segunda o tercera línea, subgrupo 3+

	FISH +	FISH -	
Respuesta	18	0	
Sin respuesta	72	17	
Tasa de respuesta	20%	0%	
	(12-28%)	(0-14%)	N=107

TABLA 4

FISH/Respuesta con el único agente Herceptin®, terapia de segunda o tercera línea, subgrupo 2+

	FISH +	FISH -	
Respuesta	3	0	
Sin respuesta	12	20	
Tasa de respuesta	20%	0%	
	(1-40%)	(0-14%)	N=35

En el subgrupo 3+, la tasa de respuesta FISH+ (20%) fue muy próxima pero aún superaba a la tasa de respuesta del 17% de sujetos 3+. El subgrupo 2+ presentó una diferencia mucho mayor, con sólo una tasa de respuesta del 9% frente al 20% para la selección FISH+. Estos datos demuestran que el estado FISH+ (amplificación del gen *her2*) incrementa enormemente la probabilidad de respuesta al Herceptin®.

ES 2 331 646 T3

Los datos también se evaluaron para las respuestas del paciente al Herceptin® como terapia de primera línea (Tabla 5).

TABLA 5

FISH/Respuesta con el único agente Herceptin®, terapia de primera línea, 2+/3+ combinados

	FISH +	FISH -	
Respuesta	17	1	
Sin respuesta	24	20	
Tasa de respuesta	41%	20%	
	(26-56%)	(0-14%)	N=62

La tasa de respuesta del 41% de sujetos FISH+ fue notablemente superior a la tasa de respuesta del 27% de sujetos 3+, 2+.

El sorprendente incremento en la probabilidad de una respuesta beneficiosa basada en el análisis FISH se extendió a respuestas a la quimioterapia más Herceptin®, como se muestra en la Tabla 6. Los sujetos FISH+ presentaron una respuesta mucho mayor a la quimioterapia y el Herceptin® (54%) que los FISH- (41%). Las Tablas 7-9 contienen datos más exhaustivos, detallados para diferentes agentes quimioterapéuticos (adrimicina y ciclofosfamida, AC; y Paditaxol, P) y puntos finales diferentes (tasa de respuesta, tiempo de progresión, y supervivencia) para el Herceptin® en combinación con la quimioterapia.

TABLA 6

FISH/Tasa de respuesta a la quimioterapia +/- Herceptin®, terapia de primera línea; 2+/3+ combinados

	C solo	C + H	
FISH-	39% (26-52%)	41% (27-55%)	
FISH+	27% (19-35%)	54% (45-63%)	
			N=336

TABLA 7

Tasa de respuesta de poblaciones recién definidas

		H+Ac	AC	(n	H+P	P	(n	H+CT	CT	(n
		(n =	=)	(n =	=	96)	(n =	=)
		143)		138)	92)			235)		234)
2+/3+	469	56*		42	41*		17	50*		32
3+	349	60*		42	49*		17	56*		31
FISH+	240	58*		40	49*		14	54*		27
*p<0,05										

ES 2 331 646 T3

TABLA 8

Tiempo para la progresión (meses) de poblaciones recién definidas

		H+Ac (n = 143)	AC (n = 138)	H+P (n = 92)	P (n = 96)	H+CT (n = 235)	CT (n = 234)
2+/3+	469	7,8*	6,1	6,9*	2,7	7,4*	4,6
3+	349	8,1*	6,0	7,1*	3,0	7,8*	4,6
FISH+	240	7,8*	6,2	7,0*	3,2	7,3*	4,6
*p<0,05							

TABLA 9

Supervivencia (meses) de poblaciones recién definidas

		H+Ac (n = 143)	AC (n = 138)	H+P (n = 92)	P (n = 96)	H+CT (n = 235)	CT (n = 234)
2+/3+	469	27	21	22	18	25*	20
3+	349	31*	21	25	18	29*	20
FISH+	240	29*	20	25*	14	27*	18
*p<0,05							

Estos datos confirman uniformemente que el análisis FISH+, aunque está íntimamente correlacionado con la IHC, proporciona un indicador mucho más preciso de la probabilidad de éxito con el tratamiento con Herceptin®. A lo largo de las tablas, la selección FISH+ tiene una tasa de respuesta aproximadamente 1/3 (30%) superior a la selección IHC 2+/3+. Cuando se centra en pacientes 2+, el estado de FISH proporciona una herramienta mucho más eficaz para la selección de pacientes. Los estados de FISH también identifican pacientes que, debido al estado 0 ó 1+ como se determina por IHC, de lo contrario serían excluidos del tratamiento.

Estas observaciones tienen amplias implicaciones para las terapias contra el cáncer basadas en antagonistas del receptor ErbB y terapias contra el cáncer con antígenos anti-tumorales en general. Así los antagonistas de erbB, por ejemplo, anticuerpos anti-receptor de erbB como el Herceptin®, pueden tener una probabilidad de eficacia incrementada cuando se administran a pacientes que son positivos para la amplificación del gen erbB, por ejemplo, mediante una prueba de FISH. Éste es efectivamente el caso, basándose en estos datos, con el Herceptin®.

Se debe entender que todos los valores son aproximados, y se proporcionan para con fines descriptivos.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 4968603 A [0004] [0047]
- WO 9931140 A [0008]

ES 2 331 646 T3

- US 5708156 A [0021]
- US 5641869 A [0030] [0030] [0053]
- 5 • US 4943533 A [0032]
- WO 9640210 A [0032]
- US 5772997 A [0033] [0033]
- 10 • WO 9877797 A [0033] [0051]
- US 5840525 A [0033]
- 15 • US 5821337 A [0033]
- WO 9321319 A [0033]
- WO 9700271 A [0033]
- 20 • US 5183884 A [0034] [0052]
- US 5480968 A [0034] [0052]
- 25 • US 5968511 A [0034]
- EP 599274 A [0034] [0052]
- WO 9919488 A [0034]
- 30 • WO 9422478 A [0048]
- US 5824311 A [0048]
- 35 • US 5677171 A [0049]
- WO 9400136 A [0051]
- US 5783186 A [0051]
- 40 • WO 0020641 A [0062]
- WO 9704801 A [0073]
- 45 • US 3773919 A [0077]
- EP 616812 A [0080]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- 50 • Van de **Vijer** *et al.* *New Eng. J. Med.*, 1988, vol. 317, 1239 [0003]
- **Walker** *et al.* *Br. J. Cancer*, 1989, vol. 60, 426 [0003]
- 55 • **Tandon** *et al.* *J. Clin. Invest.*, 1989, vol. 7, 1120 [0003]
- **Wright** *et al.* *Cancer Res.*, 1989, vol. 49, 2087 [0003]
- **McCann** *et al.* *Cancer Res*, 1991, vol. 51, 3296 [0003]
- 60 • **Paterson** *et al.* *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 556 [0003]
- **Winstanley** *et al.* *Br. J. Cancer*, 1991, vol. 63, 447 [0003]
- 65 • **Zhou** *et al.* *Oncogene*, 1989, vol. 4, 105 [0003]
- **Heintz** *et al.* *Arch Path Lab Med*, 1990, vol. 114, 160 [0003]

ES 2 331 646 T3

- **Kury et al.** *Eur. J. Cancer*, 1990, vol. 26, 946 [0003]
- **Clark et al.** *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 944 [0003]
- 5 • **Ravdin et al.** *J. Clin. Oncol.*, 1994, vol. 12, 467-74 [0003]
- **Slamon et al.** *Science*, 1987, vol. 235, 177 [0004] [0004]
- **Slamon et al.** *Science*, 1989, vol. 244, 707 [0004] [0004]
- 10 • **Nelson et al.** *Modem Pathology*, 1996, vol. 9 (1), 21A [0004]
- **Press.** *Cancer Research*, 1994, vol. 54, 2771 [0006]
- 15 • **Anastasi et al.** *Blood*, 1991, vol. 77, 2456-2462 [0007]
- **Anastasi et al.** *Blood*, 1992, vol. 79, 1796-1801 [0007]
- **Anastasi et al.** *Blood*, 1993, vol. 81, 1580-1585 [0007]
- 20 • **van Lom et al.** *Blood*, 1992, vol. 82, 884-888 [0007]
- **Wolman et al.** *Diagnostic Molecular Pathology*, 1992, vol. 1 (3), 192-199 [0007]
- 25 • **Zitzelberger.** *Journal of Pathology*, 1994, vol. 172, 325-335 [0007]
- **Savage et al.** *J. Biol. Chem.*, 1972, vol. 247, 7612-7621 [0029]
- **Marquardt et al.** *Science*, 1984, vol. 223, 1079-1082 [0029]
- 30 • **Shoyab et al.** *Science*, 1989, vol. 243, 1074-1076 [0029]
- **Kimura et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 257-260 [0029]
- 35 • **Cook et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1991, vol. 11, 2547-2557 [0029]
- **Shing et al.** *Science*, 1993, vol. 259, 1604-1607 [0029]
- **Sasada et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, vol. 190, 1173 [0029]
- 40 • **Higashiyama et al.** *Science*, 1991, vol. 251, 936-939 [0029]
- **Toyoda et al.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 7495-7500 [0029]
- 45 • **Komurasaki et al.** *Oncogene*, 1997, vol. 15, 2841-2848 [0029]
- **Carraway et al.** *Nature*, 1997, vol. 387, 512-516 [0029] [0053]
- **Zhang et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, vol. 94, 9562-9567 [0029]
- 50 • **Kannan et al.** *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272 (6), 3330-3335 [0029]
- **Marchionni et al.** *Nature*, 1993, vol. 362, 312-318 [0030] [0030]
- 55 • **Holmes et al.** *Science*, 1992, vol. 256, 1205-1210 [0030] [0053]
- **Peles et al.** *Cell*, 1992, vol. 69, 205-216 [0030]
- **Falls et al.** *Cell*, 1993, vol. 72, 801-815 [0030]
- 60 • **Ho et al.** *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 14523-14532 [0030]
- **Schaefer et al.** *Oncogene*, 1997, vol. 15, 1385-1394 [0030] [0049] [0053]
- 65 • **Sliwkowski et al.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269 (20), 4661-14665 [0031]
- **Carpenter et al.** *Ann. Rev. Biochem.*, 1987, vol. 56, 881-914 [0032]

ES 2 331 646 T3

- **Humphrey et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 4207-4211 [0032]
- **Semba et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 6497-6501 [0033]
- 5 • **Yamamoto et al.** *Nature*, 1986, vol. 319, 230-234 [0033]
- **Kraus et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 9193-9197 [0034] [0052]
- **Plowman et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 1746-1750 [0034] [0052]
- 10 • **Plowman et al.** *Nature*, 1993, vol. 366, 473-475 [0034]
- Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs. **Murakami et al.** *The Molecular Basis of Cancer. WB Saunders*, 1995, 13 [0044]
- 15 • **Baselga; Mendelsohn.** *Pharmac. Ther.*, 1994, vol. 64, 127-154 [0046]
- **Masui et al.** *Cancer Research*, 1984, vol. 44, 1002-1007 [0046]
- 20 • **Wu et al.** *J. Clin. Invest.*, 1995, vol. 95, 1897-1905 [0046]
- **Slamon et al.** *Science*, 1987, vol. 235, 177-182 [0047]
- **Slamon et al.** *Science*, 1989, vol. 244, 707-712 [0047]
- 25 • **Drebin et al.** *Cell*, 1985, vol. 41, 695-706 [0048]
- **Myers et al.** *Meth. Enzym.*, 1991, vol. 198, 277-290 [0048]
- 30 • **Drebin et al.** *Oncogene*, 1988, vol. 2, 273-277 [0048]
- **Hudziak et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9 (3), 1165-1172 [0049]
- **Fendly et al.** *Cancer Research*, 1990, vol. 50, 1550-1558 [0049]
- 35 • **Kotts et al.** *In Vitro*, 1990, vol. 26 (3), 59A [0049]
- **Sarup et al.** *Growth Regulation*, 1991, 72-82 [0049]
- 40 • **Shepard et al.** *J. Clin. Immunol.*, 1991, vol. 11 (3), 117-127 [0049]
- **Kumar et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1991, vol. 11 (2), 979-986 [0049]
- **Lewis et al.** *Cancer Immunol. Immunother.*, 1993, vol. 37, 255-263 [0049]
- 45 • **Pietras et al.** *Oncogene*, 1994, vol. 9, 1829-1838 [0049]
- **Vitetta et al.** *Cancer Research*, 1994, vol. 54, 5301-5309 [0049]
- 50 • **Sliwkowski et al.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269 (20), 14661-14665 [0049]
- **Scott et al.** *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 14300-5 [0049]
- 55 • **D'souza et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, vol. 91, 7202-7206 [0049]
- **Lewis et al.** *Cancer Research*, 1996, vol. 56, 1457-1465 [0049]
- **Baselga et al.** *J. Clin. Oncol.*, 1996, vol. 14, 737-744 [0050]
- 60 • **Tagliabue et al.** *Int. J. Cancer*, 1991, vol. 47, 933-937 [0051]
- **McKenzie et al.** *Oncogene*, 1989, vol. 4, 543-548 [0051]
- **Maier et al.** *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 5361-5369 [0051]
- 65 • **Bacus et al.** *Molecular Carcinogenesis*, 1990, vol. 3, 350-362 [0051]
- **Stancovski et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 8691-8695 [0051]

ES 2 331 646 T3

- **Bacus et al.** *Cancer Research*, 1992, vol. 52, 2580-2589 [0051]
- **Xu et al.** *Int. J. Cancer*, 1993, vol. 53, 401-408 [0051]
- 5 • **Kasprzyk et al.** *Cancer Research*, 1992, vol. 52, 2771-2776 [0051]
- **Hancock et al.** *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 4575-4580 [0051]
- **Shawver et al.** *Cancer Res.*, 1994, vol. 54, 1367-1373 [0051]
- 10 • **Arteaga et al.** *Cancer Res.*, 1994, vol. 54, 3758-3765 [0051]
- **Harwerth et al.** *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 15160-15167 [0051]
- 15 • **Klapper et al.** *Oncogene*, vol. 14, 2099-2109 [0051]
- **Plowman et al.** *Natce*, 1993, vol. 366, 473-475 [0052]
- **Earp et al.** *Breast Cancer Research and Treatment*, 1995, vol. 35, 115-132 [0053]
- 20 • **Groenen et al.** *Growth Factors*, 1994, vol. 11, 235-257 [0053]
- **Groenen et al.** *Growth Factors*, 1994, vol. 11, 235-257 [0053]
- 25 • **Lemke, G.** *Molec. & Cell. Neurosci.*, 1996, vol. 7, 247-262 [0053]
- **Lee et al.** *Pharm. Rev.*, 1995, vol. 47, 51-85 [0053]
- **Chang et al.** *Nature*, 1997, vol. 387, 509-512 [0053]
- 30 • **Zhang et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94 (18), 9562-7 [0053]
- **Sliwkowski et al.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269 (20), 14661-14665 [0054]
- 35 • **Levi et al.** *Journal of Neuroscience*, 1995, vol. 15, 1329-1340 [0054]
- **Morrissey et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 1431-1435 [0054]
- **Lewis et al.** *Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 1457-1465 [0054]
- 40 • **Carraway; Cantley.** *Cell*, 1994, vol. 78, 5-8 [0054]
- **Boxer.** *J. Clin. Pathol.*, 2000, vol. 53, 19-21 [0055]
- 45 • **Stoler.** *Clin. Lab. Med.*, 1990, vol. 12, 215-36 [0055]
- Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology. *The Blakston Division McGraw-Hill Book Company*, 1960 [0059]
- 50 • The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology. Armed Forces Institute of Pathology. *American Registry of Pathology*, 1994 [0059]
- Situ Hybridization: A Practical Guide. **Leitch et al.** *Microscopy Handbooks. Oxford BIOS Scientific Publishers*, 1994, vol. 27 [0062]
- 55 • **Sambrook, J. et al.** *Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press*, 1989 [0065]
- **Ploem; Tanke.** *Introduction to Fluorescence Microscopy. Oxford University Press*, 1987 [0070]
- 60 • *Remington's Pharmaceutical Sciences* [0073] [0075]
- *Chemotherapy Service. William & Wilkins*, 1992 [0080]
- 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un antagonista de ErbB que es un anticuerpo anti-proteína HER2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto, en el que el sujeto es un sujeto en el que se ha observado que el gen *her2* está amplificado en células tumorales en una muestra de tejido procedente del sujeto y las células tumorales del sujeto tienen un nivel de expresión de HER2 de 0 ó 1+ por inmunohistoquímica en una muestra de tejido fijada en formaldehído.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que el cáncer es cáncer de mama.
3. Uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal humanizado recombinante rhuMAb 4D5-8.
- 15 4. Uso según la reivindicación 1, en el que la amplificación del gen *her2* se detecta detectando la fluorescencia de una sonda de ácido nucleico marcada por fluorescencia hibridada al gen.
5. Uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento es para su administración en un método de tratamiento que comprende adicionalmente el tratamiento del cáncer con una dosis de un fármaco quimioterapéutico.
- 20 6. Uso según la reivindicación 5, en el que el fármaco quimioterapéutico es un taxoide.
7. Procedimiento para identificar a un paciente predispuesto a responder de manera favorable a un antagonista de ErbB para el tratamiento del cáncer, en el que el antagonista de ErbB es un anticuerpo anti-proteína HER2, cuyo procedimiento comprende la detección de la amplificación del gen *her2* en células tumorales en una muestra de tejido procedente del paciente, en el que las células tumorales del paciente tienen un nivel de expresión de HER2 de 0 ó 1+ por inmunohistoquímica en una muestra de tejido fijada en formaldehído.
- 25 8. Antagonista de ErbB para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto, en el que el antagonista de ErbB es un anticuerpo anti-proteína HER2, en el que el sujeto es un sujeto en el que se ha observado que el gen *her2* está amplificado en células tumorales en una muestra de tejido procedente del sujeto y las células tumorales del sujeto tienen un nivel de expresión de HER2 de 0 ó 1+ por inmunohistoquímica en una muestra de tejido fijada en formaldehído.
- 30 9. Antagonista de ErbB según la reivindicación 8, en el que el cáncer es cáncer de mama.
10. Antagonista de ErbB según la reivindicación 8, en el que el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal humanizado recombinante rhuMAb 4D5-8.
- 40 11. Antagonista de ErbB según la reivindicación 8, en el que la amplificación del gen *her2* se detecta detectando la fluorescencia de una sonda de ácido nucleico marcada por fluorescencia hibridada al gen.
12. Antagonista de ErbB según la reivindicación 8, en el que el procedimiento comprende adicionalmente el tratamiento del cáncer con una dosis de un fármaco quimioterapéutico.
- 45 13. Antagonista de ErbB según la reivindicación 12, en el que el fármaco quimioterapéutico es un taxoide.
- 50
- 55
- 60
- 65