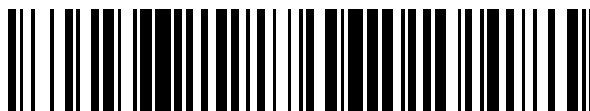


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 439**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2005 PCT/US2005/021287**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.07.2006 WO06078307**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2005 E 05785414 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 1846030**

54 Título: **Dosificación fija de anticuerpos HER**

30 Prioridad:

21.01.2005 US 645697 P

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

25.04.2019

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**ALLISON, DAVID E;
BRUNO, RENE;
LU, JIAN-FENG y
NG, CHEE M.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 710 439 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

Dosificación fija de anticuerpos HER

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la dosificación fija de pertuzumab.

Antecedentes de la invención

10

Receptores y anticuerpos HER contra los mismos

15

La familia HER de receptores tirosina quinasas son mediadores importantes del crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular. La familia de receptores incluye cuatro miembros diferentes, incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1 o HER1), HER2 (ErbB2 o p185^{neu}), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2).

20

EGFR, codificado por el gen *erbB1*, se ha implicado causalmente en tumores malignos humanos. En particular, se ha observado una mayor expresión de EGFR en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y estómago, así como en glioblastomas. La mayor expresión del receptor EGFR se asocia a menudo con la mayor producción del ligando del EGFR, factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), por las mismas células tumorales que producen la activación del receptor por una ruta estimuladora autocrina. Baselga y Mendelsohn, *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994). Se han evaluado los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFR o sus ligandos, TGF- α y EGF, como agentes terapéuticos en el tratamiento de dichos tumores malignos. Véase, por ejemplo, Baselga y Mendelsohn, *supra*; Masui *et al. Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); y Wu *et al. J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995).

25

30

35

40

El segundo miembro de la familia de HER, p185^{neu}, se identificó originalmente como el producto del gen transformante de neuroblastomas de ratas tratadas químicamente. La forma activada del protooncogén *neu* es resultado de una mutación puntual (de valina a ácido glutámico) en la región transmembrana de la proteína codificada. La amplificación del homólogo humano de *neu* se observa en los cánceres de mama y ovario, y se correlaciona con un pronóstico pobre (Slamon *et al., Science*, 235:177-182 (1987); Slamon *et al., Science*, 244:707-712 (1989); y la patente de EE.UU. n.º 4.968.603). Hasta la fecha, no se ha descrito una mutación puntual análoga a la del protooncogén *neu* en tumores humanos. El exceso de expresión de HER2 (debido con frecuencia, pero no de forma uniforme, a la amplificación de genes) también se ha observado en otros carcinomas incluyendo carcinomas del estómago, endometrio, glándulas salivales, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. Véase, entre otros, King *et al., Science*, 229:974 (1985); Yokota *et al., Lancet*. 1:765-767 (1986); Fukushige *et al., Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Guerin *et al., Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen *et al., Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura *et al., Cancer Res.*, 51:1034 (1991); Borst *et al., Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990); Weiner *et al., Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern *et al., Cancer Res.*, 50:5184 (1990); Park *et al., Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau *et al., Mol. Carcinog.*, 3:254-257 (1990); Aasland *et al. Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988); Williams *et al., Pathobiology* 59:46-52 (1991); y McCann *et al., Cancer*, 65:88-92 (1990). HER2 puede ser expresado en exceso en el cáncer de próstata (Gu *et al., Cancer Lett.* 99:185-9 (1996); Ross *et al., Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997); Ross *et al., Cancer* 79:2162-70 (1997); y Sadasivan *et al., J. Urol.* 150:126-31 (1993)).

45

50

Se han descrito anticuerpos dirigidos contra los productos proteínicos p185^{neu} de rata y HER2 humano.

Drebin y colaboradores han producido anticuerpos contra el producto del gen *neu* de rata, p185^{neu}. Véase, por ejemplo, Drebin *et al., Cell* 41:695-706 (1985); Myers *et al., Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991); y el documento WO94/22478. Drebin *et al., Oncogene* 2:273-277 (1988) reportan que mezclas de anticuerpos reactivos con dos regiones distintas de p185^{neu} producen efectos antitumorales sinérgicos en células NIH-3T3 transformadas por *neu* implantadas en ratones sin pelo. Véase también la patente de EE.UU. 5.824.311 expedida el 20 de octubre de 1998.

55

60

65

Hudziak *et al., Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989) describen la generación de un panel de anticuerpos HER2 que se caracterizaron usando la línea celular de tumor de mama humano SK-BR-3. Se determinó la proliferación celular relativa de las células SK-BR-3 después de exposición a los anticuerpos, mediante tinción con cristal violeta de las monocapas después de 72 horas. Usando este ensayo, se obtuvo la inhibición máxima con el anticuerpo llamado 4D5 que inhibía la proliferación celular en 56 %. Otros anticuerpos del panel reducían la proliferación celular en menor extensión en este ensayo. Se ha descubierto además que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba las líneas celulares de tumor de mama que expresaban en exceso HER2 a los efectos citotóxicos del TNF- α . Véase también, la patente de EE.UU. n.º 5.677.171 expedida el 14 de octubre de 1997. Los anticuerpos contra HER2 analizados en Hudziak *et al.* son caracterizados adicionalmente por Fendly *et al. Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts *et al. In Vitro* 26 (3): 59A (1990); Sarup *et al. Growth Regulation* 1:72-82 (1991); Shepard *et al. J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127 (1991); Kumar *et al. Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986 (1991); Lewis *et al. Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras *et al. Oncogene* 9:1829-1838 (1994); Vitetta *et al. Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski *et al. J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994); Scott *et al. J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991); D'souza *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994); Lewis *et al. Cancer Research* 56:1457-1465 (1996); y Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394 (1997).

Una versión humanizada recombinante del anticuerpo contra HER2 murino 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, trastuzumab o HERCEPTIN[®]; patente de EE.UU. n.º 5.821.337) es clínicamente activa en pacientes con cánceres de mama metastáticos que expresan en exceso HER2 que han recibido una amplia terapia anticancerígena previa (Baselga *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996)). Trastuzumab recibió la aprobación para la comercialización de la Administración de Medicamentos y Alimentos el 25 de septiembre de 1998, para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastático cuyos tumores expresaban en exceso la proteína HER2.

Se han descrito otros anticuerpos contra HER2 con diferentes propiedades en Tagliabue *et al.* *Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991); McKenzie *et al.* *Oncogene* 4:543-548 (1989); Maier *et al.* *Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991); Bacus *et al.* *Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990); Stancovski *et al.* *PNAS (EE.UU.)* 88:8691-8695 (1991); Bacus *et al.* *Cancer Research* 52:2580-2589 (1992); Xu *et al.* *Int. J. Cancer* 53:401-408 (1993); el documento WO94/00136; Kasprzyk *et al.* *Cancer Research* 52:2771-2776 (1992); Hancock *et al.* *Cancer Res.* 51:4575-4580 (1991); Shawver *et al.* *Cancer Res.* 54:1367-1373 (1994); Arteaga *et al.* *Cancer Res.* 54:3758-3765 (1994); Harwerth *et al.* *J. Biol. Chem.* 267:15160-15167 (1992); la patente de EE.UU. n.º 5.783.186; y Klapper *et al.* *Oncogene* 14:2099-2109(1997).

La selección por homología ha dado como resultado la identificación de otros dos miembros de la familia de receptores HER; HER3 (patentes de EE.UU. n.º 5.183.884 y 5.480.968 así como Kraus *et al.*, *PNAS (EE.UU.)* 86:9193-9197 (1989)) y HER4 (solicitud de patente EP n.º 599.274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:1746-1750 (1993); y Plowman *et al.*, *Nature*, 366:473-475 (1993)). Ambos receptores presentan una mayor expresión en al menos algunas líneas celulares de cáncer de mama.

Los receptores HER en general se encuentran en diferentes combinaciones en las células y se cree que la heterodimerización aumenta la diversidad de respuestas celulares en diversos ligandos de HER (Earp *et al.* *Breast Cancer Research and Treatment* 35: 115-132 (1995)). El EGFR se une por seis ligandos diferentes; factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), anfirregulina, factor de crecimiento epidérmico que se une a heparina (HB-EGF), betacelulina y epiregulina (Groenen *et al.* *Growth Factors* 11:235-257 (1994)). Una familia de proteínas heregulinas que resultan del corte y empalme alternativo de un solo gen, son los ligandos para HER3 y HER4. La familia de heregulinas incluye heregulinas alfa, beta y gamma (Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205-1210 (1992); patente de EE.UU. n.º 5.641.869; y Schaefer *et al.* *Oncogene* 15:1385-1394 (1997)); factores de diferenciación de neu (NDF), factores de crecimiento glial (GGF); inductor de la actividad del receptor de acetilcolina (ARIA); y factor derivado de neuronas motoras y sensoriales (SMDF). Para una revisión, véase Groenen *et al.* *Growth Factors* 11:235-257 (1994); Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247-262 (1996) y Lee *et al.* *Pharm. Rev.* 47:51-85 (1995). Recientemente, se han identificado tres ligandos de HER adicionales; la neuregulina-2 (NRG-2) que se reporta que se une a HER3 o HER4 (Chang *et al.* *Nature* 387 509-512 (1997); y Carraway *et al.* *Nature* 387:512-516 (1997)); la neuregulina-3 que se une a HER4 (Zhang *et al.* *PNAS (EE.UU.)* 94(18):9562-7 (1997)); y la neuregulina-4 que se une a HER4 (Harari *et al.* *Oncogene* 18:2681-89 (1999)) HB-EGF, betacelulina y epiregulina también se unen a HER4.

Mientras que el EGF y el TGF α no se unen a HER2, el EGF estimula que el EGFR y HER2 formen un heterodímero, que activa el EGFR y produce la transforforilación de HER2 en el heterodímero. Parece que la dimerización y/o transforforilación activan la HER2 tirosina quinasa. Véase Earp *et al.*, *supra*. Asimismo, cuando HER3 es expresado conjuntamente con HER2, se forma un complejo de señalización activo y los anticuerpos dirigidos contra HER2 son capaces de alterar este complejo (Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)). Además, la afinidad del HER3 por la heregulina (HRG) aumenta a un estado de afinidad mayor cuando es expresado conjuntamente con HER2. Véase también, Levi *et al.*, *Journal of Neuroscience* 15: 1329-1340 (1995); Morrissey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 92: 1431-1435 (1995); y Lewis *et al.*, *Cancer Res.*, 56:1457-1465 (1996) con respecto al complejo de proteínas HER2-HER3. HER4, tal como HER3, forma un complejo de señalización activo con HER2 (Carraway y Cantley, *Cell* 78:5-8 (1994)).

Las publicaciones de patentes relacionadas con los anticuerpos contra HER incluyen: US 5.677.171, US 5.720.937, US 5.720.954, US 5.725.856, US 5.770.195, US 5.772.997, US 6.165.464, US 6.387.371, US 6.399.063, US2002/0192211A1, US 6.015.567, US 6.333.169, US 4.968.603, US 5.821.337, US 6.054.297, US 6.407.213, US 6.719.971, US 6.800.738, US2004/0236078A1, US 5.648.237, US 6.267.958, US 6.685.940, US 6.821.515, WO98/17797, US 6.127.526, US 6.333.398, US 6.797.814, US 6.339.142, US 6.417.335, US 6.489.447, WO99/31140, US2003/0147884A1, US2003/0170234A1, US2005/0002928A1, US 6.573.043, US2003/0152987A1, WO99/48527, US2002/0141993A1, WO01/00245, US2003/0086924, US2004/0013667A1, WO00/69460, WO01/00238, WO01/15730, US 6.627.196B1, US6.632.979B1, WO01/00244, US2002/0090662A1, WO01/89566, US2002/0064785, US2003/0134344, WO 04/24866, US2004/0082047, US2003/0175845A1, WO03/087131, US2003/0228663, WO2004/008099A2, US2004/0106161, WO2004/048525, US2004/0258685A1, US 5.985.553, US 5.747.261, US 4.935.341, US 5.401.638, US 5.604.107, WO 87/07646, WO 89/10412, WO 91/05264, EP 412.116 B1, EP 494.135 B1, US 5.824.311, EP 444.181 B1, EP 1.006.194 A2, US 2002/0155527A1, WO 91/02062, US 5.571.894, US 5.939.531, EP 502.812 B1, WO 93/03741, EP 554.441 B1, EP 656.367 A1, US 5.288.477, US 5.514.554, US 5.587.458, WO 93/12220, WO 93/16185, US 5.877.305, WO 93/21319, WO 93/21232, US 5.856.089, WO 94/22478, US 5.910.486, US 6.028.059, WO 96/07321, US 5.804.396, US 5.846.749, EP 711.565, WO 96/16673, US 5.783.404, US 5.977.322, US 6.512.097, WO 97/00271, US 6.270.765, US 6.395.272,

US 5.837.243, WO 96/40789, US 5.783.186, US 6.458.356, WO 97/20858, WO 97/38731, US 6.214.388, US 5.925.519, WO 98/02463, US 5.922.845, WO 98/18489, WO 98/33914, US 5.994.071, WO 98/45479, EP 6.358.682 B1, US 2003/0059790, WO 99/55367, WO 01/20033, US 2002/0076695 A1, WO 00/78347, WO 01/09187, WO 01/21192, WO 01/32155, WO 01/53354, WO 01/56604, WO 01/76630, WO02/05791, WO 02/11677, US 6.582.919, US2002/ 0192652A1, US 2003/0211530A1, WO 02/44413, US 2002/0142328, EP 6.602.670 B2, WO 02/45653, WO 02/055106, US 2003/0152572, US 2003/0165840, WO 02/087619, WO 03/006509, WO03/012072, WO 03/028638, US 2003/0068318, WO 03/041736, EP 1.357.132, US 2003/0202973, US 2004/0138160, US 5.705.157, US 6.123.939, EP 616.812 B1, US 2003/0103973, US 2003/0108545, EP 6.403.630 B1, WO 00/61145, WO 00/61185, EP 6.333.348 B1, WO 01/05425, WO 01/64246, US 2003/0022918, US 2002/0051785 A1, US 6.767.541, WO 01/76586, US 2003/0144252, WO 01/87336, US 2002/0031515 A1, WO 01/87334, WO 02/05791, WO 02/09754, US 2003/0157097, US 2002/0076408, WO 02/055106, WO 02/070008, WO 02/089842 y WO 03/86467.

Diagnóstico

Los pacientes tratados con el anticuerpo trastuzumab HER2 se seleccionan para la terapia basada en la sobreexpresión/amplificación de HER2. Véase, por ejemplo, el documento WO99/31140 (Paton *et al.*), el documento US2003/0170234A1 (Hellmann, S.), y el documento US2003/0147884 (Paton *et al.*); así como el documento WO01/89566, el documento US20020064785 y el documento US20030134344 (Mass *et al.*). Véase, también, el documento US2003/0152987, Cohen *et al.*, en relación con la inmunohistoquímica (IHC) y la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) para detectar la sobreexpresión y amplificación de HER2.

El documento WO2004/053497 (Bacus *et al.*) se refiere a determinar o predecir la respuesta a la terapia con HERCEPTIN®. El documento US2004/013297A1 (Bacus *et al.*) se refiere a determinar o predecir la respuesta a la terapia con anticuerpos contra EGFR ABX0303. El documento WO2004/000094 (Bacus *et al.*) se dirige a determinar la respuesta a GW572016, una molécula pequeña, el inhibidor de la tirosina quinasa EGFR-HER2. El documento WO2004/063709, Amler *et al.*, se refiere a biomarcadores y métodos para determinar la sensibilidad al inhibidor de EGFR, erlotinib HCl. El documento US2004/0209290, Cobleigh *et al.*, se refiere a los marcadores de expresión génica para el pronóstico del cáncer de mama.

Los pacientes tratados con pertuzumab pueden seleccionarse para un tratamiento basado en la activación o dimerización de HER. Las publicaciones de patentes relacionadas con pertuzumab y la selección de pacientes para su tratamiento incluyen: el documento WO01/00245 (Adams *et al.*); el documento US2003/0086924 (Sliwkowski, M.); el documento US2004/0013667A1 (Sliwkowski, M.); así como el documento WO2004/008099A2 y el documento US2004/0106161 (Bossenmaier *et al.*).

Cronin *et al.*, *Am. J. Path.* 164(1): 35-42 (2004) describe la medición de la expresión génica en tejidos embebidos en parafina de archivo. Ma *et al. Cancer Cell* 5:607-616 (2004) describe el perfil génico de una micromatriz de oligonucleótido génica usando ARN aislado de secciones de tejido tumoral tomadas de biopsias primarias archivadas.

Dosificación de fármacos contra el cáncer y anticuerpos contra HER

Los artículos que analizan la dosificación de fármacos contra el cáncer incluyen: Egorin, M. *J Clin Oncol* 2003; 21:182-3 (2003); Baker *et al. J Natl Cancer Inst* 94:1883-8 (2002); Felici *et al. EurJ Cancer* 38:1677-84 (2002); Loos *et al. Clin. Cancer Res.* 6:2685-9 (2000); de Jongh *et al. J. Clin Oncol.* 19:3733-9 (2001); Mathijssen *et al. J. Clin Oncol.* 20:81-7 (2002); y de Jong *et al. Clin Cancer Res* 10:4068-71 (2004).

Normalmente, los anticuerpos monoclonales de IgG humanizados disponibles en el mercado (es decir, trastuzumab y bevacizumab, Genentech Inc., South San Francisco y gemtuzumab ozogomicina, Wyeth Pharmaceuticals, Filadelfia) y los fármacos de molécula pequeña citotóxicos en oncología se han administrado con un método de dosificación basado en el área de la superficie corporal (ASC) o basado en el peso (mg/kg).

Cetuximab (ERBITUX®) es un anticuerpo que se une al receptor EGF y está aprobado para el tratamiento del cáncer colorrectal. En el cáncer colorrectal, cetuximab 400 mg/m² se administra como una dosis de carga por infusión intravenosa durante 2 horas. A esto le sigue una vez por semana dosis de mantenimiento de 250 mg/m² administradas durante 1 hora. Véase la información de prescripción de cetuximab.

Trastuzumab (HERCEPTIN®) se administra a pacientes con cáncer de mama metastásico como una dosis de carga de 4 mg/kg, seguido de dosis semanales de 2 mg/kg. Véase la información de prescripción de trastuzumab.

Véase, también, el documento WO99/31140; el documento US2003/0147884A1; el documento US2003/0170234A1; el documento US2005/0002928A1; el documento WO00/69460; el documento WO01/15730 y el documento US 6.627.196B1 en relación con la dosificación de trastuzumab.

Pertuzumab (también conocido como anticuerpo monoclonal humano recombinante 2C4; OMNITARG™, Genentech, Inc, South San Francisco) representa el primero de una nueva clase de agentes conocidos como inhibidores de la

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

Se ha demostrado que el bloqueo de pertuzumab de la formación de heterodímeros de HER2-HER3 en células tumorales inhibe la señalización celular crítica, lo que da como resultado una proliferación y supervivencia tumorales reducidas (Agus *et al. Cancer Cell* 2:127-37 (2002)).

Pertuzumab se ha sometido a pruebas como agente único en la clínica con un ensayo de fase I en pacientes con cánceres avanzados y ensayos de fase II en pacientes con cáncer de ovario y cáncer de mama, así como cáncer de pulmón y próstata. En un estudio de fase I, los pacientes con tumores sólidos incurables, localmente avanzados, recurrentes o metastásicos que habían progresado durante o después del tratamiento convencional fueron tratados con pertuzumab administrado por vía intravenosa cada 3 semanas. Pertuzumab fue generalmente bien tolerado. La regresión del tumor se logró en 3 de 20 pacientes evaluables para la respuesta. Dos pacientes habían confirmado respuestas parciales. Se observó una enfermedad estable que duró más de 2,5 meses en 6 de 21 pacientes (Agus *et al. Pro Am Soc Clin Oncol* 22:192 (2003)). A dosis de 2,0-15 mg/kg, la farmacocinética de pertuzumab fue lineal, y el aclaramiento medio varió de 2,69 a 3,74 ml/día/kg y la semivida de eliminación terminal varió de 15,3 a 27,6 días. No se detectaron anticuerpos contra pertuzumab (Allison *et al. Pro Am Soc Clin Oncol* 22:197 (2003)). Pertuzumab se administró en función del peso (mg/kg) en el ensayo de fase I. Los ensayos de fase II se han iniciado usando una dosis fija.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona la primera evaluación crítica del impacto y la utilidad de la dosificación fija de un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado en la farmacocinética y las concentraciones del fármaco objetivo. Los objetivos principales de este análisis del pertuzumab del anticuerpo contra HER fueron: 1) evaluar la farmacocinética poblacional y las covariables predictivas para el pertuzumab en pacientes con cáncer, y 2) examinar la variabilidad de las concentraciones valle y exposiciones del estado estacionario después de una dosificación fija, o basada en el peso corporal y en el área de la superficie corporal (ASC).

En consecuencia, en un primer aspecto, la invención proporciona pertuzumab para su uso en un método para tratar el cáncer de mama metastásico como se reivindica.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 proporciona un esquema de la estructura proteica de HER2 y secuencias de aminoácidos para los dominios I-IV (SEQ ID NO:19-22, respectivamente) del dominio extracelular de la misma.

Las figuras 2A y 2B representan alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los dominios ligero variable (V_L) (Fig. 2A) y pesado variable (V_H) (Fig. 2B) del anticuerpo monoclonal murino 2C4 (SEQ ID NO:1 y 2, respectivamente); dominios V_L y V_H de la versión de 2C4 humanizado 574 (SEQ ID NO:3 y 4, respectivamente); y marcos consenso V_L y V_H humanos (hum κ 1, subgrupo kappa ligero I; humIII, subgrupo pesado III) (SEQ ID NO:5 y 6, respectivamente). Los asteriscos identifican diferencias entre 2C4 humanizado versión 574 y el anticuerpo monoclonal murino 2C4 o entre 2C4 humanizado versión 574 y el marco humano. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) están entre corchetes.

Las figuras 3A y 3B muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y pesada del pertuzumab (SEQ ID NO:13 y 14, respectivamente). Las CDR se muestran en negrita. La masa molecular calculada de la cadena ligera y la cadena pesada son 23.526,22 Da y 49.216,56 Da (cisteínas en forma reducida). El resto de carbohidrato está unido con Asn 299 de la cadena pesada.

La figura 4 representa, esquemáticamente, la unión de 2C4 en el sitio de unión heterodimérico de HER2, evitando de este modo la heterodimerización con EGFR o HER3 activado.

La figura 5 representa el acoplamiento de HER2/HER3 con las rutas de MAPK y Akt.

La figura 6 compara diversas actividades de trastuzumab y pertuzumab.

Las figuras 7A y 7B muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de trastuzumab (Fig. 7A; SEQ ID NO:15) y cadena pesada (Fig. 7B; SEQ ID NO:16), respectivamente.

Las figuras 8A y 8B representan una secuencia de cadena ligera de pertuzumab variante (Fig. 8A; SEQ ID NO:17) y una secuencia de cadena pesada de pertuzumab variante (Fig. 8B; SEQ ID NO:18), respectivamente.

Las figuras 9A y 9B son perfiles representativos de los datos de PK de un solo sujeto ajustados por un modelo compartimental de uno (Fig. 9A) o dos (Fig. 9B). Los círculos abiertos indican la concentración observada. Las líneas continuas y de puntos indican la población prevista y la concentración individual prevista, respectivamente.

Las figuras 10A y 10B representan los gráficos de diagnóstico del modelo. La fig. 10A representa las concentraciones de pertuzumab observadas frente a las previstas. La línea continua es la línea de la unidad. La fig. 10B representa los residuos ponderados frente a las concentraciones de pertuzumab pronosticadas. La línea discontinua es un LOESS suave de datos.

Las figuras 11A y 11B representan el efecto aleatorio (η) para el aclaramiento (CL) en peso (PC) y el volumen en

el compartimiento central (Vc) por área de superficie corporal (ASC) para el modelo base (Fig. 11A) y modelo final (Fig. 11B).

Las figuras 12A-F muestran la evaluación del modelo farmacocinético de la población final de pertuzumab mediante una verificación del modelo posterior. Distribución predictiva posterior y valores observados para las estadísticas de la prueba: Fig. 12A-2,5°; Fig. 12B-5°; Fig. 12C-50°, Fig. 12D-90°, Fig. 12E-95°, Fig. 12F-97,5°. La línea vertical en cada histograma representa el valor observado de la estadística de la prueba.

La figura 13 ilustra la concentración valle prevista de pertuzumab en estado estacionario (día 84) después de una dosis fija, basada en peso (PC) o basada en ASC para 1000 sujetos simulados retirados del conjunto de datos farmacocinéticos originales (PK) de acuerdo con el modelo final.

La figura 14A y 14B ilustra la concentración valle prevista de pertuzumab en estado estacionario (día 84) después de una dosis fija, basada en peso (PC) o basada en ASC para poblaciones de pacientes con valores en $PC \leq 10^\circ$ (50,4 kg) (Fig. 14A) o $\geq 90^\circ$ (88,5 kg) (Fig. 14B).

Descripción detallada

I. Definiciones

Una dosis "fija" o "plana" de un agente terapéutico en el presente documento se refiere a una dosis que se administra a un paciente humano sin tener en cuenta el peso (PC) o el área de la superficie corporal (ASC) del paciente. La dosis fija o plana por lo tanto no se proporciona como una dosis mg/kg o una dosis mg/m², sino más bien como una cantidad absoluta del agente terapéutico.

Una "dosis de carga" en el presente documento generalmente comprende una dosis inicial de un agente terapéutico administrado a un paciente, y es seguida por una o más dosis de mantenimiento del mismo. En general, se administra una única dosis de carga, pero en el presente documento se contemplan múltiples dosis de carga. Por lo general, la cantidad de dosis de carga administrada(s) excede la cantidad de la(s) dosis de mantenimiento administrada(s) y/o la(s) dosis de carga se administra(n) con mayor frecuencia que la(s) dosis de mantenimiento, a fin de lograr la concentración de equilibrio deseada del agente terapéutico antes de lo que se puede lograr con la(s) dosis de mantenimiento.

Una "dosis de mantenimiento" en el presente documento se refiere a una o más dosis de un agente terapéutico administrado al paciente durante un período de tratamiento. Por lo general, las dosis de mantenimiento se administran a intervalos de tratamiento espaciados, tales como aproximadamente cada semana, aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente cada 3 semanas o aproximadamente cada 4 semanas.

Un "receptor HER" es una proteína tirosina quinasa receptora que pertenece a la familia de receptores HER e incluye los receptores EGFR, HER2, HER3 y HER4. El receptor HER comprenderá generalmente un dominio extracelular, que puede unirse a un ligando HER y/o dimerizarse con otra molécula receptora HER; un dominio transmembrana lipófilo; un dominio tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxilo-terminal que alberga varios restos de tirosina que pueden fosforilarse. El receptor HER puede ser un receptor HER de "secuencia nativa" o una "variante de secuencia de aminoácidos" del mismo. Preferentemente el receptor HER es un receptor HER humano de secuencia nativa.

Las expresiones "ErbB1", "HER1", "receptor del factor de crecimiento epidérmico" y "EGFR" se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refieren a EGFR como se divulga, por ejemplo, en Carpenter *et al. Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987), incluyendo formas mutantes de origen natural del mismo (por ejemplo un EGFR mutante de delección como en Humphrey *et al. PNAS (USA)* 87:4207-4211 (1990)). *erbB1* se refiere al gen que codifica el producto proteico de EGFR.

Las expresiones "ErbB2" y "HER2" se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refieren a proteína de HER2 humana descrita, por ejemplo, en Semba *et al.*, PNAS (EE.UU.) 82:6497-6501 (1985) y Yamamoto *et al. Nature* 319:230-234 (1986) (número de referencia de Genbank X03363). El término "*erbB2*" se refiere al gen que codifica ErbB2 humano y "neu" se refiere al gen que codifica p185^{neu} de rata. El HER2 preferente es HER2 humano de secuencia nativa.

El dominio extracelular de HER2 comprende cuatro dominios: "dominio I" (restos de aminoácidos de aproximadamente 1-195); SEQ ID NO:19, dominio II (restos de aminoácidos de aproximadamente 196-319); SEQ ID NO:20, "dominio III" (restos de aminoácidos de aproximadamente 320-488): SEQ ID NO:21, y "dominio IV" (restos de aminoácidos de aproximadamente 489-630); SEQ ID NO:22) (numeración de restos sin péptido señal). Véase Garrett *et al. Mol. Cell.* 11: 495-505 (2003), Cho *et al. Nature* 421: 756-760 (2003), Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004) y Plowman *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1746-1750 (1993), así como la fig. 1 en el presente documento.

"ErbB3" y "HER3" se refieren al polipéptido receptor como se divulga, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 5.183.884 y 5.480.968 así como en Kraus *et al. PNAS (EE.UU.)* 86:9193-9197 (1989).

Los términos "ErbB4" y "HER4" en el presente documento se refieren al polipéptido receptor como se divulga, por ejemplo, en la solicitud de patente EP n.º 599.274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:1746-1750 (1993); y Plowman *et al.*, *Nature*, 366: 473-475 (1993), incluyendo isoformas del mismo, por ejemplo, como se divulga en el documento WO99/19488, publicado 22 de abril de 1999.

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

"Herregulina" (HRG) cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido codificado por el producto génico de herregulina como se divulga en la patente de EE.UU. n.º 5.641.869 o Marchionni *et al.*, *Nature*, 362:312-318 (1993). Ejemplos de herregulinas incluyen herregulina- α , herregulina- β 1, herregulina- β 2 y herregulina- β 3 (Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205- 1210 (1992); y la patente de EE.UU. n.º 5.641.869); factor de diferenciación neu (NDF) (Peles *et al.* *Cell* 69: 205-216 (1992)); actividad inductora de receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls *et al.* *Cell* 72:801-815 (1993)); factores de crecimiento gliales (GGF) (Marchionni *et al.*, *Nature*, 362:312-318 (1993)); factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho *et al.* *J. Biol. Chem.* 270:14523-14532 (1995)); y herregulina (Schaefer *et al.* *Oncogene* 15:1385- 1394 (1997)).

Un "dímero de HER" en el presente documento es un dímero asociado de forma no covalente que comprende al menos dos receptores HER. Dichos complejos pueden formarse cuando una célula que expresa dos o más receptores HER se expone a un ligando de HER y puede aislarse por inmunoprecipitación y analizarse por SDS-PAGE como se describe en Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(20): 14661-14665 (1994), por ejemplo. Ejemplos de dichos dímeros de HER incluyen heterodímeros EGFR-HER2, HER2-HER3 y HER3-HER4. Además, el dímero de HER puede comprender dos o más receptores HER2 combinados con un receptor HER diferente, tales como HER3, HER4 o EGFR. Otras proteínas, tales como una subunidad del receptor de citocinas (por ejemplo, gp130) pueden asociarse con el dímero.

Un "inhibidor de HER" es un agente que interfiere con la activación o función de HER. Ejemplos de inhibidores de HER incluyen anticuerpos contra HER (por ejemplo, anticuerpos contra EGFR, HER2, HER3 o HER4); fármacos dirigidos a EGFR; antagonistas de HER de molécula pequeña; inhibidores de tirosina quinasa de HER; Los inhibidores de la tirosina quinasa dual de HER2 y EGFR, tal como lapatinib/GW572016; moléculas antisentido (véase, por ejemplo, el documento WO2004/87207); y/o agentes que se unen, o interfieren con la función de, moléculas de señalización corriente abajo, tal como MAPK o Akt (véase la fig. 5). Preferentemente, el inhibidor de HER es un anticuerpo o molécula pequeña que se une a un receptor HER.

Un "anticuerpo HER" es un anticuerpo que se une a un receptor HER. Opcionalmente, el anticuerpo HER también interfiere con la activación o función de HER. Preferentemente, el anticuerpo HER se une al receptor HER2. Un anticuerpo HER2 de particular interés en el presente documento es pertuzumab. Otro ejemplo de un anticuerpo HER2 es trastuzumab. Ejemplos de anticuerpos contra EGFR incluyen cetuximab y ABX0303.

"Activación HER" se refiere a la activación, o fosforilación, de uno cualquiera o más receptores HER. En general, la activación de HER da como resultado la transducción de señal (por ejemplo la provocada por un dominio quinasa intracelular de un receptor HER que fosforila restos de tirosina en el receptor HER o un polipéptido sustrato). La activación de HER puede estar mediada por la unión de un ligando de HER con un dímero de HER que comprende el receptor HER de interés. La unión del ligando de HER con un dímero de HER puede activar un dominio quinasa de uno o más de los receptores HER y por lo tanto da como resultado la fosforilación de restos de tirosina en uno o más de los receptores HER y/o fosforilación de restos de tirosina en un polipéptido o polipéptidos sustrato adicionales, tales como quinasas intracelulares MAPK o Akt. Véase, la fig. 5, por ejemplo.

"Fosforilación" se refiere a la adición de uno o más grupos fosfato a una proteína, tal como un receptor HER o un sustrato del mismo.

Un anticuerpo que "inhibe la dimerización de HER" es un anticuerpo que inhibe, o interfiere con la formación de un dímero HER. Preferentemente, dicho anticuerpo se une a HER2 en el sitio de unión heterodimérico del mismo. El

anticuerpo inhibidor de la dimerización más preferente en el presente documento es pertuzumab o MAb 2C4. La unión de 2C4 al sitio de unión heterodimérico de HER2 se ilustra en la fig. 4. Otros ejemplos de anticuerpos que inhiben la dimerización de HER incluyen anticuerpos que se unen a EGFR e inhiben la dimerización de los mismos con uno o más receptores HER de otro tipo (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal EGFR 806, MAb 806, que se une a EGFR activado o "sin ataduras"; véase Johns *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)); anticuerpos que se unen a HER3 e inhiben la dimerización de los mismos con uno o más receptores HER de otro tipo; y anticuerpos que se unen a HER4 e inhiben su dimerización con uno o más receptores HER de otro tipo.

Un anticuerpo que "inhibe la dimerización de HER más eficazmente que trastuzumab" es uno que reduce o elimina los dímeros de HER más eficazmente (por ejemplo al menos aproximadamente 2 veces más eficazmente) que trastuzumab. Preferentemente, dicho anticuerpo inhibe la dimerización de HER2 al menos aproximadamente tan eficazmente como un anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste en el anticuerpo monoclonal murino 2C4, un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal murino 2C4, pertuzumab y un fragmento Fab de pertuzumab. Se puede evaluar la inhibición de la dimerización de HER estudiando los dímeros de HER directamente, o evaluando la activación de HER, o la señalización corriente abajo, que resulta de la dimerización de HER y/o evaluando el sitio de unión de anticuerpo-HER2, etc. Se describen ensayos para detectar anticuerpos con la capacidad para inhibir la dimerización de HER más eficazmente que trastuzumab en Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002) y el documento WO01/00245 (Adams *et al.*). Únicamente a modo de ejemplo, se puede analizar la inhibición de la dimerización de HER, evaluando, por ejemplo, la inhibición de la formación de dímeros HER (véase, por ejemplo, la fig. 1A-B de Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002); y el documento WO01/00245); la reducción en la activación del ligando HER de células que expresan dímeros HER (WO01/00245 y la fig. 2A-B de Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo); el bloqueo de la unión del ligando de HER a células que expresan dímeros HER (documento WO01/00245, y la fig. 2E de Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo); la inhibición del crecimiento celular de las células cancerosas (por ejemplo, MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, células T-47D) que expresan dímeros de HER en presencia (o ausencia) del ligando de HER (documento WO01/00245 y las fig. 3A-D de Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo); la inhibición de la señalización corriente abajo (por ejemplo, la inhibición de la fosforilación de AKT dependiente de HRG o la inhibición de la fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF α) (véase, el documento WO01/00245 y la fig. 2C-D de Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo). También se puede evaluar si el anticuerpo inhibe la dimerización de HER estudiando el sitio de unión de anticuerpo-HER2, por ejemplo, evaluando una estructura o modelo, tal como una estructura cristalina, del anticuerpo unido con HER2 (véase, por ejemplo, Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004)).

Un "sitio de unión heterodimérico" en HER2, se refiere a un región en el dominio extracelular de HER2 que entra en contacto, o forma interfase, con una región en el dominio extracelular de EGFR, HER3 o HER4 tras la formación de un dímero con el mismo. La región se encuentra en el dominio II de HER2. Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

El anticuerpo de HER2 puede "inhibir la fosforilación de AKT dependiente de HRG" y/o inhibir la "fosforilación de MAPK dependiente de HRG o TGF α " más eficazmente (por ejemplo al menos 2 veces más eficazmente) que trastuzumab (véase Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002) y el documento WO01/00245, a modo de ejemplo).

El anticuerpo de HER2 puede ser uno que "no inhibe la escisión del ectodominio de HER2" (Molina *et al. Cancer Res.* 61:4744-4749 (2001)).

Un anticuerpo de HER2 que "se une con un sitio de unión heterodimérico" de HER2, se une con restos en el dominio II (y opcionalmente también se une con restos en otro de los dominios del dominio extracelular de HER2, tales como los dominios I y III) y puede impedir de forma estérica, al menos hasta cierto punto, la formación de un heterodímero de HER2-EGFR, HER2-HER3 o HER2-HER4. Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004) caracteriza la estructura cristalina de HER2-pertuzumab, depositada en el Banco de Datos de Proteínas RCSB (ID Código IS78), que ilustra un anticuerpo a modo de ejemplo que se une con el sitio de unión heterodimérico de HER2.

Un anticuerpo que "se une con el dominio II" de HER2 se une con restos en el dominio II y opcionalmente restos en otro u otros dominios de HER2, tales como los dominios I y III. Preferentemente, el anticuerpo que se une al dominio II se une a la unión entre los dominios I, II y III de HER2.

Un polipéptido de "secuencia nativa" es uno que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (por ejemplo, receptor HER o ligando HER) procedente de la naturaleza. Dichos polipéptidos de secuencia natural se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir por medios recombinantes o sintéticos. Por lo tanto, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos del polipéptido humano de origen natural, polipéptido murino o polipéptido de cualquier otra especie de mamífero.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y específicamente abarca anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados por al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren la actividad biológica deseada.

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al (los) mismo(s) epítipo(s), excepto por posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes dichas variantes generalmente en cantidades menores. Dicho anticuerpo monoclonal normalmente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica que se une a la diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a la diana de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tal como un conjunto de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que la secuencia de unión a la diana seleccionada se puede alterar adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada también es un anticuerpo monoclonal. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un solo determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpo monoclonal son ventajosas en cuanto a que normalmente no están contaminadas con otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden producirse mediante diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975); Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624- 628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 101(34):12467-12472 (2004); y Lee *et al.* *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o de tipo humano en animales que tienen partes o todos los locus o genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento WO 1998/24893; el documento WO 1996/34096; el documento WO 1996/33735; el documento WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255- 258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); las patentes de EE.UU. n.º 5.545.806; 5.569.825; 5.591.669 (todas de GenPharm); la patente de EE.UU. n.º 5.545.807; el documento WO 1997/17852; las patentes de EE.UU. n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos procedentes de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que la cadena (o las cadenas) restante(s) es(son) idéntica(s) u homóloga(s) a secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable procedentes de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, simio, etc.) y secuencias de región constante humanas.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpo.

Un "anticuerpo intacto" en el presente documento es uno que comprende dos regiones de unión a antígeno, y una región Fc. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

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

Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Ejemplos de

funciones efectoras de anticuerpos incluyen unión con C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B; BCR), etc.

- 5 La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar en la ADCC, linfocitos NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan, FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991).
 10 Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa o además, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un
 15 modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.* *PNAS (EE.UU.)* 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las PBMC y los linfocitos NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo de sangre o PBMC como se describe en el presente documento.

Las expresiones "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une con la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferente es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo las variantes alélicas y las formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores de FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activante") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase una revisión de M. en Daéron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457- 92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), y regula la homeostasis de las inmunoglobulinas.

La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula para lisar una diana en presencia del complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) con una molécula (por ejemplo un anticuerpo) en complejo con un antígeno afín. Para evaluar la activación de complemento, puede realizarse un ensayo CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

45 Los "anticuerpos nativos" son generalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena ligera está unida con una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera tiene también enlaces disulfuro intracatenarios a espacios regulares. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

55 El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto a su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en todos los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones hipervariables en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se denominan "regiones marco conservada" (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración en lámina β, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura de lámina β. La regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health

Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

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

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar con facilidad. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de unión con antígeno y sigue siendo capaz de reticularse con el antígeno.

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

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes portan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994). Se describen fragmentos scFv de anticuerpo de HER2 en el documento WO93/16185; la patente de EE.UU. n.º 5.571.894; y la patente de EE.UU. n.º 5.587.458.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Usando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen los diacuerpos más completamente en, por ejemplo, el documento EP 404,097; el documento WO 93/11161; y Hollinger *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:6444-6448 (1993).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima procedente de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en la que los restos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá

sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana o todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Los anticuerpos de HER2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5/-2, huMAb4D5/-3, huMAb4D5/-4, huMAb4D5/-5, huMAb4D5/-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 o trastuzumab (HERCEPTIN®) como se describe en la tabla 3 de la patente de EE.UU. 5.821.337; 520C9 humanizado (documento WO93/21319); y anticuerpos 2C4 humanizados como se describe en el presente documento.

Para los fines del presente documento, "trastuzumab," "HERCEPTIN®," y "huMAb4D5-8" se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácido de cadena ligera y pesada en las SEQ ID NO:15 y 16, respectivamente.

En el presente documento, "pertuzumab" y "OMNITARG™" se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácido de cadena ligera y pesada en SEQ ID NO:13 y 14, respectivamente.

Las diferencias entre las funciones de trastuzumab y pertuzumab se ilustran en la fig. 6.

Un anticuerpo "desnudo" es un anticuerpo que no está conjugado con una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico o radiomarcador.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En las realizaciones preferentes, el anticuerpo se purificará (1) en más de un 95 % en peso de anticuerpo, según se determina mediante el método de Lowry y, lo más preferentemente, en más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en uno o más regiones hipervariables del mismo que da como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee dicha(s) alteraciones(s). Los anticuerpos madurados por afinidad preferentes tendrán afinidades nanomolar o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al. Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad por la redistribución de dominios V_H y V_L. La mutagénesis aleatoria de los restos HVR y/o estructurales se describe en: Barbas *et al. Proc Nat. Acad. Sci.*, EE.UU. 91:3809-3813 (1994); Schier *et al. Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al. J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al., J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins *et al, J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

La expresión "anticuerpo de especie principal" en el presente documento se refiere a la estructura de anticuerpo en una composición que es la molécula de anticuerpo cuantitativamente predominante en la composición. El principal anticuerpo de la especie es uno que comprende las secuencias de aminoácidos variables ligeras y pesadas variables en la SEQ ID NO:3 y 4, y que comprende más preferentemente las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada en las SEQ ID NO:13 y 14 (pertuzumab).

Un anticuerpo "variante de secuencia de aminoácidos" en el presente documento es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos que difiere de un anticuerpo de especie principal. Habitualmente, las variantes de secuencia de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente un 70 % de homología con el anticuerpo de especie principal y, preferentemente, será de al menos aproximadamente un 80 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % de homólogos con el anticuerpo de la especie principal. Las variantes de secuencia de aminoácidos tienen sustituciones, deleciones y/o adiciones en determinadas posiciones dentro o adyacentes a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de especie principal. Ejemplos de variantes de secuencia de aminoácidos en el presente documento incluyen una variante ácida (por ejemplo, una variante de anticuerpo desamidada), una variante básica, el anticuerpo con una extensión líder aminoterminal (por ejemplo VHS-) en una o dos cadenas ligeras del mismo, anticuerpo con un resto de lisina C-terminal en una o dos cadenas pesadas del mismo, etc. e incluye combinaciones de variaciones de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y/o ligeras. La variante de anticuerpo de interés particular en el presente documento es el anticuerpo que comprende una extensión líder amino-terminal en una o dos cadenas ligeras de la misma, que opcionalmente comprende además otra

secuencia de aminoácidos y/o diferencias de glucosilación con respecto al anticuerpo de especie principal.

Un anticuerpo de "variante de glucosilación" en el presente documento es un anticuerpo con uno o más restos de carbohidratos unidos al mismo que difieren de uno o más restos de carbohidratos unidos a un anticuerpo de especie principal. Ejemplos de variantes de glucosilación en el presente documento incluyen anticuerpo con una estructura de oligosacáridos G1 o G2, en lugar de una estructura de oligosacárido G0, unida con una región de Fc del mismo, anticuerpo con uno o dos restos de carbohidratos unidos con una o dos cadenas ligeras del mismo, anticuerpo sin carbohidratos unidos a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, y combinaciones de alteraciones de glucosilación.

Cuando el anticuerpo tiene una región Fc, una estructura de oligosacárido tal como la que se muestra en la figura 9 en el presente documento puede estar unida con una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, por ejemplo, al resto 299 (298, numeración de restos Eu). Para pertuzumab, G0 fue la estructura del oligosacárido predominante, encontrándose con otras estructuras de oligosacáridos tales como GO-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) y G2 en cantidades menores en la composición de pertuzumab.

A menos que se indique otra cosa, una "estructura oligosacárida G1" en el presente documento incluye las estructuras G-1, G1-1, G1 (1-6) y G1 (1-3).

Una "extensión líder amino-terminal" en el presente documento se refiere a uno o más restos de aminoácidos de la secuencia líder amino-terminal que están presentes en el extremo amino de una cualquiera o más cadenas pesadas o ligeras de un anticuerpo. Una extensión líder amino-terminal a modo de ejemplo comprende o consiste en tres restos de aminoácidos, VHS, presentes en una o ambas cadenas ligeras de una variante de anticuerpo.

Un anticuerpo "desamidado" es uno en el que se han derivatizado uno o más restos de asparagina del mismo, por ejemplo, a un ácido aspártico, una succinimida o un ácido iso-aspártico.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma "incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma y cáncer de células de isleta), mesotelioma, schwannoma (incluido el neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epitelial), cáncer de pulmón que incluye cáncer microcítico pulmonar (CPCP), cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (incluido el cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, cáncer de testículos, cáncer esofágico, tumores del tracto biliar, así como cáncer de cabeza y cuello.

En el presente documento, un "paciente" es un ser humano. El paciente puede ser un "paciente con cáncer", es decir, uno que padece o está en riesgo de padecer uno o más síntomas de cáncer u otro paciente que podría beneficiarse del tratamiento con un anticuerpo HER.

Una "muestra biológica" se refiere a una muestra, generalmente células o tejidos procedentes de una fuente biológica.

Una "muestra de paciente" se refiere a una muestra obtenida de un paciente, tal como un paciente con cáncer.

Una "muestra de tumor" en el presente documento es una muestra procedente de, o que comprende células tumorales de, un tumor de un paciente. Ejemplos de muestras de tumores en el presente documento incluyen, pero sin limitación, biopsias de tumores, células tumorales circulantes, proteínas plasmáticas circulantes, líquido ascítico, cultivos celulares primarios o líneas celulares procedentes de tumores o que muestran propiedades similares a los tumores, así como muestras tumorales preservadas, tales como muestras de tumores embebidas en parafina fijadas con formalina o muestras de tumores congeladas.

Una muestra tumoral "fija" es aquella que se ha preservado histológicamente usando un fijador.

Una muestra de tumor "fijada con formalina" es aquella que se ha preservado usando formaldehído como fijador.

Una muestra de tumor "embebida" es una rodeada por un medio firme y generalmente duro, tal como parafina, cera, celloidina o una resina. La incrustación hace posible el corte de secciones delgadas para examen microscópico o para la generación de micromatrices de tejido (TMA).

Una muestra de tumor "embebida en parafina" es una rodeada por una mezcla purificada de hidrocarburos sólidos procedentes del petróleo.

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

Una muestra biológica o de cáncer que "muestra la expresión, amplificación o activación de HER", es aquella que, en una prueba de diagnóstico, expresa (incluso sobreexpresa) un receptor HER, tiene el gen HER amplificado y/o demuestra de otra manera la activación o la fosforilación de un receptor HER. Dicha activación se puede determinar directamente (por ejemplo, midiendo la fosforilación de HER) o indirectamente (por ejemplo, mediante el perfil de expresión génica o detectando heterodímeros de HER, como se describe en el presente documento).

Un cáncer con "sobreexpresión o amplificación del receptor HER" es uno que tiene niveles significativamente más altos de una proteína o gen del receptor HER en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha expresión en exceso puede estar provocada por la amplificación génica o por transcripción o traducción aumentadas. La sobreexpresión o amplificación del receptor HER puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando los niveles aumentados de la proteína HER presente en la superficie de una célula (por ejemplo mediante un ensayo inmunohistoquímico; IHC). Como alternativa o además, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica HER en la célula, por ejemplo mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia de Southern o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (RCP), tales como RCP cuantitativa en tiempo real (RCP-TRC). También se puede estudiar la sobreexpresión o amplificación del receptor HER midiendo el antígeno desprendido (por ejemplo, el dominio extracelular de HER) en un fluido biológico tal como el suero (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.933.294 expedida el 12 de junio de 1990; el documento WO91/05264 publicado el 18 de abril de 1991; la patente de EE.UU. 5.401.638 expedida el 28 de marzo de 1995 y Sias *et al.* *J. Immunol. Methods* 132: 73-80 (1990)). Además de los anteriores ensayos, están disponibles diversos ensayos *in vivo* para el facultativo experto. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está marcado opcionalmente con un marcador detectable, por ejemplo un isótopo radioactivo, y puede evaluarse la unión del anticuerpo con células en el paciente, por ejemplo, mediante exploración externa por radioactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

Por el contrario, un cáncer que "no sobreexpresa o amplifica el receptor HER" es uno que no expresa niveles mayores de lo normal de proteína o gen del receptor de HER en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo tisular. Los anticuerpos que inhiben la dimerización de HER, tal como pertuzumab, se pueden usar para tratar el cáncer que no sobreexpresa ni amplifica el receptor HER2.

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 expresa HER *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor de crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan HER en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueadores de la fase M clásicos incluyen los agentes de la vinca (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de la topoisomerasa II, tales como doxorrubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen la G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Se puede encontrar más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la página 13.

Son ejemplos de anticuerpos "inhibidores del crecimiento" los que se unen con HER2 e inhiben el crecimiento de células cancerosas que sobreexpresan HER2. Los anticuerpos de HER2 inhibidores del crecimiento preferentes inhiben el crecimiento de células tumorales de mama SK-BR-3 en cultivo celular en más del 20 %, y preferentemente en más del 50 % (por ejemplo de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 %) a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml, en el que la inhibición del crecimiento se determina seis días después de la exposición de las células SK-BR-3 al anticuerpo (véase, la patente de EE.UU. n.º 5.677.171 expedida el 14 de octubre de 1997). El ensayo de inhibición del crecimiento de células SK-BR-3 se describe con más detalle en esa patente y más adelante en el presente documento.

El anticuerpo inhibidor del crecimiento preferente es una variante humanizada del anticuerpo monoclonal murino 4D5, por ejemplo, trastuzumab. Un anticuerpo que "induce apoptosis" es uno que induce la muerte celular programada como se determina por la unión de anexina V, fragmentación de ADN, encogimiento celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominados cuerpos apoptóticos). La célula es generalmente una que sobreexpresa el receptor HER2. Preferentemente la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de mama, de ovario, de estómago, endometrial, de glándulas salivales, de pulmón, de riñón, de colon, de tiroides, pancreática o de vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, célula Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. Están disponibles diversos métodos para evaluar los

acontecimientos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de fosfatidil serina (PS) puede medirse por unión de anexina; la fragmentación de ADN puede evaluarse mediante comparación con marcadores de ADN; y la condensación nuclear/de cromatina junto con fragmentación a lo largo del ADN puede evaluarse por cualquier aumento en células hipodiploides. Preferentemente, el anticuerpo que induce la apoptosis es uno que da como resultado aproximadamente 2 a 50 veces, preferentemente de aproximadamente 5 a 50 veces, y más preferentemente de aproximadamente 10 a 50 veces, inducción de unión de anexina en relación con la célula no tratada en un ensayo de unión de anexina usando células BT474 (véase posteriormente). Ejemplos de anticuerpos de HER2 que inducen la apoptosis son 7C2 y 7F3.

El "epítipo 2C4" es la región del dominio extracelular de HER2 con la que se une el anticuerpo 2C4. Para detectar anticuerpos que se unen con el epítipo 2C4, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado habitual tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Preferentemente, el anticuerpo bloquea la unión de 2C4 con HER2 en aproximadamente un 50 % o más. Como alternativa, se puede realizar mapeo de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 2C4 de HER2. El epítipo 2C4 comprende restos del dominio II en el dominio extracelular de HER2. 2C4 y pertuzumab se unen al dominio extracelular de HER2 en la unión de los dominios I, II y III. Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

El "epítipo 4D5" es la región en el dominio extracelular de HER2 a la que se une el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y trastuzumab. Este epítipo está cerca del dominio transmembrana de HER2, y dentro del dominio IV de HER2. Para detectar anticuerpos que se unen con el epítipo 4D5, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado habitual tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, se puede realizar mapeo de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une con el epítipo 4D5 de HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más restos en la región de aproximadamente el resto 529 a aproximadamente el resto 625, incluido el ECD de HER2, incluyendo la numeración del resto el péptido señal).

El "epítipo 7C2/7F3" es la región en el extremo N, dentro del dominio I, del dominio extracelular de HER2 con el que se unen los anticuerpos 7C2 y/o 7F3 (cada uno depositado en la ATCC, véase posteriormente). Para detectar anticuerpos que se unen con el epítipo 7C2/7F3, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado habitual tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, se puede realizar mapeo de epítipos para establecer si el anticuerpo se une con el epítipo 7C2/7F3 en el HER2 (por ejemplo, uno cualquiera o más de los restos en la región de aproximadamente el resto 22 a aproximadamente el resto 53 del ECD de HER2, incluyendo la numeración del resto el péptido señal).

"Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los que necesiten tratamiento incluyen los que ya tienen la enfermedad así como en los que va a prevenirse la enfermedad. Por lo tanto, el paciente a tratar en el presente documento puede haber sido diagnosticado que tiene la enfermedad o puede estar predispuesto o ser susceptible a la enfermedad.

La expresión "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar el cáncer en el paciente. la cantidad efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento del tumor; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco pueda evitar el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La cantidad efectiva puede extender la supervivencia libre de progresión (por ejemplo, según lo medido por los criterios de evaluación de respuesta para tumores sólidos, RECIST o cambios en CA-125), dan como resultado una respuesta objetiva (que incluye una respuesta parcial, RP, o respuesta completa, RC), aumentar el tiempo de supervivencia general y/o mejorar uno o más síntomas del cáncer (por ejemplo, según lo evaluado por FOSI).

"Supervivencia general" se refiere a que el paciente permanezca con vida durante un período de tiempo definido, tal como 1 año, 5 años, etc., por ejemplo, desde el momento del diagnóstico o tratamiento.

"Supervivencia libre de progresión" se refiere a que el paciente sigue vivo, sin que el cáncer empeore. Una "respuesta objetiva" se refiere a una respuesta medible, incluida la respuesta completa (RC) o la respuesta parcial (RP).

Por "respuesta completa" o "remisión completa" se entiende la desaparición de todos los signos de cáncer en respuesta al tratamiento. Esto no siempre significa que el cáncer se haya curado.

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

La expresión "agente citotóxico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o produce la destrucción de las células. Con el término se pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radioactivos de Lu), agentes

quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngicas, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN[®] ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; TLK 286 (TELCYTA[™]); acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL[®]); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético de topotecan (HYCANTIN[®]), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR[®]), acetilcamptotecina, escoplectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiastatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; bisfosfonatos, tal como clodronato; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omega11 (véase, por ejemplo, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33:183-186 (1994)) y antraciclina tales como annamicina, AD 32, alcarrubicina, daunorubicina, dextrazoxano, DX-52-1, epirubicina, GPX-100, idarubicina, KRN5500, menogaril, dinemicina, incluyendo dinemicina A, una esperamicina, cromóforos de neocarzinostatina y cromóforos del antibiótico enediina de la cromoproteína relacionada, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN[®] doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, doxorubicina liposómica y desoxidoxorrubicina), esorrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina y zorrubicina; análogos del ácido fólico tales como denopterina, pteropterina, y trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, y tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, y floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestanol, y testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, y trilostano; relleno de ácido fólico tal como ácido folínico (leucovorina); aceglatona; agentes antineoplásicos dirigidos contra folato tales como ALIMTA[®], LY231514 pemetrexed, inhibidores de la dihidrofolato reductasa tales como metotrexato, antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo (5-FU) y sus profármacos tales como UFT, S-I y capecitabina, e inhibidores de la timidilato sintasa e inhibidores de la glicinamida ribonucleótido formiltransferasa tales como raltitrexed (TOMUDEX[™], TDX); inhibidores de la dihidropirimidina deshidrogenasa tal como eniluracilo; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguzona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK[®] (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE[®], FILDESIN[®]); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides y taxanos, por ejemplo, TAXOL[®] paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE[™] exento de cremóforo, formulación de nanopartículas de paclitaxel diseñadas por ingeniería con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y TAXOTERE[®] doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR[®]); 6-tioguanina; mercaptopurina; platino; análogos de platino o análogos basados en platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN[®]); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN[®]); alcaloide de la vinca; vinorelbina (NAVELBINE[®]); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxiplatino (ELOXATIN[™]) combinado con 5-FU y leucovorina.

También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los tumores tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluido NOLVADEX[®] tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON[®] toremifeno; inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE[®] acetato de megestrol, AROMASIN[®] exemestano, formestano, fadrozol, RIVISOR[®] vorozol, FEMARA[®] letrozol y ARIMIDEX[®] anastrozol; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo nucleosídico de 1,3-dioxolano citosina; oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la

expresión de genes en las rutas de señalización de la proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacunas para terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN[®], la vacuna LEUVECTIN[®] y la vacuna VAXID[®]; PROLEUKIN[®] rIL-2; Inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN[®]; ABARELIX[®] rmRH; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Un "agente quimioterapéutico antimetabolito" es un agente que es estructuralmente similar a un metabolito, pero el cuerpo no puede usarlo de manera productiva. Muchos agentes quimioterapéuticos antimetabolitos interfieren con la producción de los ácidos nucleicos, ARN y ADN. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos antimetabolitos incluyen gemcitabina (GEMZAR[®]), 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina (XELODA[™]), 6-mercaptopurina, metotrexato, 6-tioguanina, pemetrexed, raltitrexed, arabinosilcitosina ARA-C citarabina (CYTOSAR-U[®]), dacarbacina (DTIC-DOME[®]), azocitosina, desoxicitosina, piridmideno, fludarabina (FLUDARA[®]), cladribina, 2-deoxi-D-glucosa, etc. El agente quimioterapéutico antimetabolito preferente es gemcitabina.

"Gemcitabina" o "2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina monohidrocloreto (isómero b)" es un análogo de nucleósido que muestra actividad antitumoral. La fórmula empírica para el HCl de gemcitabina es C₉H₁₁F₂N₃O₄ · HCl. El HCl de gemcitabina es comercializado por Eli Lilly bajo la marca comercial GEMZAR[®].

Un "agente quimioterapéutico basado en platino" comprende un compuesto orgánico que contiene platino como parte integral de la molécula. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos basados en platino incluyen carboplatino, cisplatino y oxaliplatino.

Por "quimioterapia basada en platino" se entiende el tratamiento con uno o más agentes quimioterapéuticos basados en platino, opcionalmente en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos de otro tipo.

Por "resistente al platino" se entiende que el paciente con cáncer ha progresado mientras recibe quimioterapia basada en platino (es decir, el paciente es "refractario al platino"), o que el paciente ha progresado dentro de los 12 meses (por ejemplo, dentro de los 6 meses) después de completar un régimen de quimioterapia basado en platino.

Un "agente anti-angiogénico" se refiere a un compuesto que bloquea, o interfiere en algún grado, con el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor anti-angiogénico puede, por ejemplo, ser una molécula pequeña o anticuerpo que se une a un factor de crecimiento o receptor del factor de crecimiento implicado en la promoción de angiogénesis. El factor anti-angiogénico preferente en el presente documento es un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), tal como bevacizumab (AVASTIN[®]).

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas del crecimiento, tal como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humana con N-metionilo y la hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glucoproteicas, tales como la hormona folículo estimulante (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factores α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora de mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento neural, tal como NGF- β ; factor de crecimiento procedente de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF), tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón- α , - β y - γ ; factores estimulantes de colonias (CSF), tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando de kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

Como se usa en el presente documento, la expresión "fármaco dirigido a EGFR" se refiere a un agente terapéutico que se une con EGFR y, opcionalmente, inhibe la activación de EGFR. Ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, la patente de EE.UU. n.º 4.943.533, Mendelsohn *et al.*) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBITUX[®]) y 225 humano remodelado (H225) (véase el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); anticuerpos que se unen con EGFR mutante de tipo II (patente de EE.UU. n.º 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen con EGFR como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF (véase el documento WO 98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto *et al.* *Eur. J. Cancer* 32A:636-640 (1996)); y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR puede conjugarse con un agente citotóxico, generando de este modo un inmunocóncugado (véase, por ejemplo, el documento EP659.439A2, Merck Patent GmbH). Ejemplos de moléculas pequeñas que se unen a EGFR incluyen ZD1839 o Gefitinib (IRESSA[™];

Astra Zeneca); CP-358774 o Erlotinib HCL (TARCEVA™; Genentech/OSI); y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen).

Un "inhibidor de tirosina quinasa" es una molécula que inhibe la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa tal como un receptor HER. Ejemplos de dichos inhibidores incluyen los fármacos dirigidos a EGFR indicados en el párrafo anterior; molécula pequeña inhibidora de tirosina quinasa HER2 tal como TAK165 disponible en Takeda; inhibidores de HER duales tales como EKB-569 (disponible en Wyeth) que se une preferentemente con EGFR pero inhibe células que sobreexpresan tanto HER2 como EGFR; GW572016 (disponible en Glaxo) un inhibidor de tirosina quinasa HER2 y EGFR oral; PKI-166 (disponible en Novartis); inhibidores pan-HER tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de Raf1 tales como el agente antisentido ISIS-5132 disponible en ISIS Pharmaceuticals que inhibe la señalización de Raf-1; inhibidores de TK no dirigidos a HER tales como Imatinib mesilato (Gleevac™) disponibles en Glaxo; inhibidor de quinasa I regulada extracelular MAPK CI-1040 (disponible en Pharmacia); quinazolininas, tales como PD 153035,4-(3-cloroanilino) quinazolinina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrol[2,3-d] pirimidinas; curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen restos de nitrofenol; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (por ejemplo las que se unen con ácido nucleico que codifica a HER); quinoxalinas (patente de EE.UU n.º 5.804.396); trifostinas (patente de EE.UU n.º 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-HER tales como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/lilly); Imatinib mesilato (Gleevac; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o como se ha descrito en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: patente de EE.UU n.º 5.804.396; patente WO99/09016 (American Cyanamid); patente WO98/43960 (American Cyanamid); patente WO97/38983 (Warner Lambert); patente WO99/06378 (Warner Lambert); patente WO99/06396 (Warner Lambert); patente WO96/30347 (Pfizer, Inc); patente WO96/33978 (Zeneca); patente WO96/3397 (Zeneca); y WO96/33980 (Zeneca).

Un "trastorno hiperproliferativo benigno" significa un estado en un paciente que se relaciona con la proliferación celular y que los miembros de la comunidad médica reconocen como anormal. Un estado anormal se caracteriza por un nivel de una propiedad que es estadísticamente diferente del nivel observado en organismos que no padecen el trastorno. La proliferación celular se refiere al crecimiento o extensión por multiplicación de células e incluye la división celular. La velocidad de proliferación celular puede medirse contando el número de células producidas en una unidad de tiempo determinada. Ejemplos de trastornos hiperproliferativos benignos incluyen la psoriasis y los pólipos.

"Pólipos" se refiere a una masa de tejido que sobresale o se proyecta hacia afuera o hacia arriba desde el nivel normal de la superficie, por lo que es visible macroscópicamente como una estructura hemisférica, esférica o irregular de tipo montículo que crece desde una base relativamente ancha o un tallo delgado. Ejemplos incluyen pólipos de colon, recto y nasal.

"Fibroadenoma" hace referencia a una neoplasia benigna procedente de epitelio glandular, en la que hay un estroma visible de fibroblastos en proliferación y elementos de tejido conectivo. Esto se produce comúnmente en el tejido mamario.

Para los fines del presente documento, un "vial" se refiere a un recipiente que contiene un agente terapéutico. El vial puede sellarse con un tapón perforable con una jeringa. En general, el vial está formado de material de vidrio. El agente terapéutico en el vial puede estar en diversos estados, incluido líquido, liofilizado, congelado, etc.

Un "prospecto" se refiere a las instrucciones habitualmente incluidas en los paquetes comerciales de agentes terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias en referencia al uso de dichos productos terapéuticos.

II. Producción de anticuerpos

A continuación se proporciona una descripción de técnicas a modo de ejemplo para la producción de anticuerpos contra HER usados de acuerdo con la presente invención. El antígeno HER a usar para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de HER o una porción del mismo, que contiene el epítipo deseado. Como alternativa, las células que expresan HER en su superficie celular (por ejemplo, células NIH-3T3 transformadas para sobreexpresar HER2; o una línea celular de carcinoma tal como células SK-BR3, véase Stancovski *et al.* PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991) se puede usar para generar anticuerpos. Otras formas de receptor HER útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica.

(i) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se producen preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que es inmunógena en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina de bovino, o un inhibidor de la tripsina de soja usando un agente

bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en la que R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

- 5 Los animales se inmunizan frente al antígeno, conjugados inmunógenos, o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (de conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después se estimula a los animales con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días después los animales se sangran y el suero se evalúa para el título de anticuerpos. Los animales se estimulan hasta la meseta del título. Preferentemente, el animal se estimula con el conjugado del mismo antígeno, pero se conjuga con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. También pueden prepararse conjugados en un cultivo de células recombinantes como proteínas de fusión. Además, se usan de forma adecuada agentes de agregación tales como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria.

15 (ii) *Anticuerpos monoclonales*

En la técnica se dispone de diversos métodos para fabricar anticuerpos monoclonales en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), por métodos de ADN recombinante (patente de EE.UU. n.º 4.816.567).

En el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped adecuado, tal como un hámster, como se ha descrito anteriormente en el presente documento para estimular a los linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. A continuación se fusionan los linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)).

30 Las células de hibridoma así preparadas se siembran y desarrollan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma precursoras no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferentes son aquellas que se fusionan de manera eficaz, apoyan la producción estable de altos niveles del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como un medio HAT. Entre estas, las líneas de células de mieloma preferentes son las líneas de mieloma murino, tales como las procedentes de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU. y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); y Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que se desarrollan las células de hibridoma se analiza para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o un enzoinmunoanálisis de absorción (ELISA).

Se puede determinar la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

55 Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de líquido ascítico en un animal.

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

65 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencía usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los

genes que codifican las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislados, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

En un enfoque adicional, pueden aislarse anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo de bibliotecas de fagos de anticuerpo generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.* *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por intercambio de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas del hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y cadena ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU n.º 4.816.567; y Morrison, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 81:6851 (1984)), o mediante la unión covalente a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no inmunoglobulina.

Normalmente dichos polipéptidos no de inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

(iii) Anticuerpos humanizados

Se han descrito en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU n.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y, posiblemente algunos restos de la FR, están sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se examina respecto toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como la región marco conservada humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método usa una región marco conservada concreta procedente de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de cadenas ligera o pesada. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Además, es importante que los anticuerpos se humanicen con la retención de una afinidad elevada para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferente, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles habitualmente y son familiares para aquellos expertos en la técnica. Se dispone de programas informáticos que ilustran y exponen posibles estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidata. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, tal como una afinidad aumentada por el antígeno (o los antígenos) diana. En general, los restos de la

región hipervariable están directamente, y más sustancialmente, implicados en la influencia de la unión a antígeno.

El documento WO01/00245 describe la producción de anticuerpos de HER2 humanizados a modo de ejemplo que se unen con HER2 y bloquean la activación del ligando de un receptor HER. El anticuerpo humanizado de interés particular en el presente documento bloquea la activación mediada por EGF, TGF- α y/o HRG de MAPK esencialmente tan eficazmente como el anticuerpo monoclonal murino 2C4 (o un fragmento Fab del mismo) y/o se une con HER2 esencialmente tan eficazmente como el anticuerpo monoclonal murino 2C4 (o un fragmento Fab del mismo). El anticuerpo humanizado en el presente documento puede, por ejemplo, comprender restos de región hipervariable no humana incorporados en un dominio pesado variable humano y puede comprender además una sustitución de la región marco conservada (FR) en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en 69H, 71H y 73H utilizando el sistema de numeración de dominio variable expuesto en Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones de FR en dos o todas las posiciones 69H, 71H y 73H.

Un anticuerpo humanizado a modo de ejemplo de interés en el presente documento comprende restos determinantes de complementariedad de dominio pesado variable GFTFTDYTMX, en los que X es preferentemente D o S (SEQ ID NO:7); DVNPNSSGGSINQRFKG (SEQ ID NO:8); y/o NLGPSFYFDY (SEQ ID NO:9), que comprende opcionalmente modificaciones de aminoácidos de esos restos de CDR, por ejemplo en los que las modificaciones esencialmente mantienen o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o de aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR pesadas variables anteriores. Dichas variantes de anticuerpo pueden prepararse por maduración de afinidad, por ejemplo, como se describe más adelante. El anticuerpo humanizado más preferente comprende la secuencia de aminoácidos de dominio pesado variable en la SEQ ID NO:4.

El anticuerpo humanizado puede comprender restos determinantes de complementariedad de dominio ligero variable KASQDVSIGVA (SEQ ID NO:10); SASYX¹X²X³, en la que X¹ es preferentemente en R o L, X² es preferentemente Y o E, y X³ es preferentemente T o S (SEQ ID NO:11); y/o QQYYIYPYT (SEQ ID NO:12), por ejemplo además de los restos de CDR de dominio pesado variable en el párrafo anterior. Dichos anticuerpos humanizados comprenden opcionalmente modificaciones de aminoácidos de los restos CDR anteriores, por ejemplo en los que las modificaciones esencialmente mantienen o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente una a aproximadamente siete o de aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR ligeras variables anteriores. Dichas variantes de anticuerpo pueden prepararse por maduración de afinidad, por ejemplo, como se describe más adelante. El anticuerpo humanizado más preferente comprende la secuencia de aminoácidos de dominio ligero variable en la SEQ ID NO:3.

La presente solicitud también contempla anticuerpos madurados por afinidad que se unen con HER2 y bloquea la activación del ligando de un receptor HER. El anticuerpo precursor puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, por ejemplo, uno que comprende las secuencias variables ligeras y/o pesadas de la SEQ ID NO:3 y 4, respectivamente (es decir la variante 574). El anticuerpo madurado por afinidad preferentemente se une con el receptor HER2 con una afinidad superior a la del 2C4 murino o variante 574 (por ejemplo afinidad mejorada de aproximadamente dos o aproximadamente cuatro veces a aproximadamente 100 veces o aproximadamente 1000 veces, por ejemplo, como se evalúa usando un ELISA de dominio extracelular de HER2 (ECD)). Los restos de CDR variables pesados a modo de ejemplo para sustitución incluyen H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99 o combinaciones de dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de estos restos). Ejemplos de restos de CDR variables ligeros para alteración incluyen L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 o combinaciones de dos o más (por ejemplo, de dos a tres, cuatro, cuatro, cinco o hasta aproximadamente diez de estos restos).

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que está opcionalmente conjugado con uno o más agente(s) citotóxicos para generar un inmunoconjugado. Como alternativa, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto. El anticuerpo IgG1 intacto preferente comprende la secuencia de cadena ligera en la SEQ ID NO:13 y la secuencia de cadena pesada en la SEQ ID NO:14.

(iv) Anticuerpos humanos

Como una alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, es ahora posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal tendrá como resultado la producción de anticuerpos humanos tras el desafío al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y las patentes de EE.UU. n.º

5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

Como alternativa, se puede usar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina (V) de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de dominio V de anticuerpo en el marco de un gen de proteína recubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosos contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fagos puede realizarse en diversos formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación en fagos. Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) aislaron una serie de diversos anticuerpos dirigidos contra oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V procedentes de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo auto antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas en Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), o Griffith *et al.*, EMBO J., 12:725-734 (1993). Véase, también, la patente de EE.UU n.º 5.565.332 y 5.573.905.

Como se ha analizado anteriormente, también pueden generarse anticuerpos humanos por células B activadas *in vitro* (véase las patentes de EE.UU 5.567.610 y 5.229.275).

Se describen anticuerpos de HER2 humanos en la patente de EE.UU n.º 5.772.997 expedida el 30 de junio de 1998 y el documento WO 97/00271 publicado el 3 de enero de 1997.

(v) Fragmentos de anticuerpos

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos que comprenden una o más regiones de unión a antígeno. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse directamente fragmentos F(ab')₂ de cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica. En otros enfoques, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la patente de EE.UU. n.º 5.571.894; y la patente de EE.UU. n.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos pueden unirse a dos epítopos diferentes de la proteína HER2. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a HER2 con un sitio o sitios de unión para EGFR, HER3 y/o HER4. Como alternativa, puede combinarse una rama de HER2 con una rama que se une con una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula de receptor de células T (por ejemplo CD2 o CD3) o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) con el fin de centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa HER2. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan HER2. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a HER2 y un brazo que se une a un agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloides de la vinca, la cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos de F(ab')₂).

El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico de HER2/FcγRIII y la patente de EE.UU. n.º 5.837.234 divulga un anticuerpo biespecífico de HER2/FcγRI IDM1 (Osidem). En el documento WO98/02463 se muestra un anticuerpo biespecífico de HER2/Fcα. La patente de EE.UU. n.º 5.821.337 enseña un anticuerpo biespecífico de HER2/CD3. MDX-210 es un Ab biespecífico de HER2-FcγRIII.

Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión conjunta de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina, en la que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein *et al.*, Nature, 305:537-

539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpos, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es demasiado complicada y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares se divulgan en el documento WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos una parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión con la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se inserta en vectores de expresión separados, y se transfecta simultáneamente en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las relaciones no son de significancia particular.

En un enfoque preferente, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de la inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO/94/04690. Para más detalles acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210(1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.731.168, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo se puede diseñar por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferente comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera moléculas de anticuerpo son sustituidas por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensadoras de tamaño idéntico o similar a las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos "heteroconjugados" o reticulados. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Se ha propuesto, por ejemplo, que dichos anticuerpos dirijan células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente de EE.UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden fabricarse usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se divulgan en la patente de EE.UU. n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

Se han descrito también en la bibliografía las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando unión química. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de formación de complejos de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que puede estar químicamente acoplado para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo F(ab')₂ específico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. Coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor HER2 y las células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de células citotóxicas humanas contra objetivos de tumores de mama humanos.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los anticuerpos homodiméricos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología del "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(vii) Otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos

Se contemplan la modificación o modificaciones de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos introduciendo los cambios de nucleótidos adecuados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción, y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos pueden alterar también los procesos posteriores a la traducción del anticuerpo, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glucosilación.

Un método útil para la identificación de determinados restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferentes para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" como se describe en Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). En este caso, se identificaron un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferente alanina o polialanina) que influye sobre la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque se predetermine el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita determinarse. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se llevó a cabo el barrido de ala o la mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y se cribaron las variantes de anticuerpos expresadas para la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos únicos o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un resto aminoácido en la molécula del anticuerpo sustituido por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero se contemplan también alteraciones de la región FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la tabla 1 bajo el encabezado de "sustituciones preferentes". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales, denominados "sustituciones a modo de ejemplo" en la tabla 1, o como se describe además posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y explorarse los productos.

Tabla 1

Resto original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser

Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento (a) de la estructura principal del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, Nueva York 1975)):

- (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

Como alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gli, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

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

Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede sustituirse, en general con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el reticulado aberrante. Por el contrario, pueden añadirse un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particular preferente de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo un anticuerpo humano o humanizado). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para el desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo precursor a partir del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica la maduración por afinidad usando una biblioteca de presentación en fagos. En resumen, varios sitios en la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) están mutados para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpos generadas de esta manera se expresan de manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto génico III del paquete M13 en cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se seleccionan a continuación para su actividad biológica (por

ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en el presente documento. A fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede llevar a cabo la mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de regiones hipervariables que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. Como alternativa o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el HER2 humano. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a selección como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por alteración se entiende la delección de uno o más restos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de anticuerpos es normalmente una unión al átomo de N o una unión al átomo de O. La unión al átomo de N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es un aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación unida al átomo de O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se realiza sistemáticamente alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glucosilación unida al átomo de N). La alteración puede realizarse también mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación unidos a O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el carbohidrato unido a esta. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la solicitud de patente de EE.UU. n.º US2003/0157108 A1, Presta, L. Véase también el documento US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina bisecante (GlcNAc) en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo se mencionan en el documento WO03/ 011878, Jean-Mairet *et al.* y la patente de EE.UU. n.º 6.602.684, Umana *et al.* Los anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se reportarán en el documento WO97/ 30087, Patel *et al.* Véase, también, el documento WO98/58964 (Raju, S.) y el documento WO99/22764 (Raju, S.) con respecto a anticuerpos con carbohidratos alterados unidos con la región Fc de los mismos.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, con el fin de potenciar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, pueden introducirse uno o varios restos cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una eliminación de células mediada por complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas. Véase Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al. Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Como alternativa, puede diseñarse mediante ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y puede de este modo potenciarse la lisis por el complemento y las capacidades de ADCC. Véase Stevenson *et al. Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

El documento WO00/42072 (Presta, L.) describe anticuerpos con función ADCC mejorada en presencia de células efectoras humanas, en el que los anticuerpos comprenden sustituciones de aminoácidos en la región Fc del mismo. Preferentemente, el anticuerpo con ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc. Preferentemente la región Fc alterada es una región Fc IgG1 que comprende o consiste en sustituciones en una, dos o tres de estas posiciones.

Se describen anticuerpos con unión C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas en el documento WO99/51642, la patente de EE.UU. n.º 6.194.551B1, la patente de EE.UU. n.º 6.242.195B1, la patente de EE.UU. n.º 6.528.624B1 y la patente de EE.UU. n.º 6.538.124 (Idusogie *et al.*). Los anticuerpos comprenden una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de la región Fc de los mismos.

Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de rescate

en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida en suero de la molécula de IgG *in vivo*.

Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), se describen en el documento WO00/42072 (Presta, L.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Por ejemplo, la región Fc puede tener sustituciones en una o más posiciones 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434. La variante de anticuerpo que comprende la región Fc preferente con unión mejorada a FcRn comprende sustituciones de aminoácidos en una, dos o tres de las posiciones 307, 380 y 434 de la región Fc de las mismas.

También se contemplan anticuerpos modificados por ingeniería genética con tres o más (preferentemente cuatro) sitios de unión a antígeno funcionales (solicitud de EE.UU. n.º US2002/0004587 A1, Miller *et al.*).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), la mutagénesis mediante la RCP, y la mutagénesis de casete de una variante preparada inicialmente o una versión no variante del anticuerpo.

(viii) Selección de anticuerpos con las propiedades deseadas

Se han descrito anteriormente técnicas para generar anticuerpos. Se pueden seleccionar adicionalmente anticuerpos con determinadas características biológicas, según se desee.

Para identificar un anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER, puede determinarse la capacidad del anticuerpo para bloquear la unión del ligando de HER con células que expresan el receptor HER (por ejemplo, conjugación con otro receptor HER con el que el receptor HER de interés forma un hetero-oligómero de HER). Por ejemplo, pueden incubarse células que expresan de forma natural o se transfectan para expresar, receptores HER del hetero-oligómero de HER con el anticuerpo y después exponerse al ligando de HER marcado. A continuación puede evaluarse la capacidad del compuesto para bloquear la unión del ligando con el receptor de HER en el hetero-oligómero de HER.

Por ejemplo, puede realizarse inhibición de la unión de HRG con líneas celulares de tumor de mama MCF7 por anticuerpos de HER2 usando cultivos de MCF7 en monocapa en hielo en un formato de placa de 24 pocillos esencialmente como se ha descrito en el documento WO01/00245. Pueden añadirse entonces anticuerpos monoclonales de HER2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos. Puede añadirse entonces rHRGβ₁₁₇₇₋₂₂₄ marcado con ¹²⁵I (25 pm), y la incubación puede continuarse durante 4 a 16 horas. Pueden prepararse curvas de respuesta a dosis y puede calcularse un valor de CI₅₀ para el anticuerpo de interés. En un enfoque, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER tendrá una CI₅₀ para inhibir la unión de HRG con células MCF7 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferentemente 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, la CI₅₀ para inhibir la unión de HRG con células MCF7 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menos, más preferentemente 50 nM o menos.

Como alternativa o además, la capacidad del anticuerpo de HER para bloquear la fosforilación de tirosina estimulada por ligando de HER de un receptor HER presente en un hetero-oligómero de HER puede evaluarse. Por ejemplo, pueden incubarse células que expresan de forma endógena los receptores HER o transfectarse para expresarlos con el anticuerpo y después ensayarse con respecto a actividad de fosforilación de tirosina dependiente de ligando de HER usando un anticuerpo monoclonal antifosforotirosina (que está conjugado opcionalmente con un marcador detectable). El ensayo de activación del receptor quinasa descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.766.863 también está disponible para determinar la activación del receptor HER y el bloqueo de esa actividad por un anticuerpo.

En un enfoque, se puede seleccionar un anticuerpo que inhiba la estimulación de HRG de fosforilación de tirosina en p180 en células MCF7 esencialmente como se describe en el documento WO01/00245. Por ejemplo, las células MCF7 pueden sembrarse en placas de 24 pocillos y pueden añadirse anticuerpos monoclonales a HER2 a cada pocillo e incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente; después puede añadirse rHRGβ₁₁₇₇₋₂₄₄ a cada pocillo hasta una concentración final de 0,2 nM, y la incubación puede continuarse durante 8 minutos. Puede aspirarse el medio de cada pocillo, y pueden detenerse las reacciones mediante la adición de 100 µl de tampón de muestra SDS (SDS al 5 %, DTT 25 mM; y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25 µl) puede someterse a electroforesis en un gel de un gradiente 4-12 % (Novex) y después transferirse electroforéticamente a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Pueden desarrollarse inmunotransferencias antifosfotirosina (a 1 µg/ml), y puede cuantificarse la intensidad de la banda reactiva predominante a M_r 180.000 mediante densitometría de reflectancia. El anticuerpo seleccionado inhibirá preferentemente de forma significativa la estimulación de HRG de fosforilación de tirosina en p180 a aproximadamente 0-35 % de control en este ensayo. Puede prepararse una curva

de respuesta a dosis para la inhibición de estimulación de HRG de fosforilación de tirosina de p180 como se determina por densitometría de reflectancia y puede calcularse una CI_{50} para el anticuerpo de interés. En un enfoque, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER tendrá una CI_{50} para inhibir la estimulación de HRG de fosforilación de tirosina en p180 en este ensayo de aproximadamente 50 nM o menos, más preferentemente 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab, la CI_{50} para inhibir la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina en p180 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menos, más preferentemente 50 nM o menos.

También se puede evaluar los efectos inhibidores en el crecimiento del anticuerpo en células MDA-MB-175, por ejemplo, esencialmente como se describe en Schaefer *et al.* *Oncogene* 15:1385-1394 (1997). De acuerdo con este ensayo, las células MDA-MB-175 pueden tratarse con un anticuerpo monoclonal de HER2 (10 µg/ml) durante 4 días y teñirse con cristal violeta.

La incubación con un anticuerpo de HER2 puede mostrar un efecto inhibidor de crecimiento en esta línea celular similar al presentado por el anticuerpo monoclonal 2C4. En un enfoque adicional, la HRG exógena puede no invertir significativamente esta inhibición. Preferentemente, el anticuerpo será capaz de inhibir la proliferación celular de células MDA-MB-175 en un mayor grado que el anticuerpo monoclonal 4D5 (y opcionalmente en un mayor grado que el anticuerpo monoclonal 7F3), tanto en presencia como en ausencia de HRG exógena.

En una realización, el anticuerpo de HER2 de interés puede bloquear la asociación dependiente de herregulina de HER2 con HER3 tanto en células MCF7 como SK-BR-3 como se determina en un experimento de co-inmunoprecipitación tal como el descrito en el documento WO01/00245 de forma sustancialmente más eficaz que el anticuerpo monoclonal 4D5, y preferentemente de forma sustancialmente más eficaz que el anticuerpo monoclonal 7F3. Para identificar anticuerpos de HER2 inhibidores del crecimiento, se puede seleccionar anticuerpos que inhiben el crecimiento de células cancerosas que sobreexpresan HER2. En un enfoque, el anticuerpo inhibidor del crecimiento elegido es capaz de inhibir el crecimiento de células SK-BR-3 en cultivo celular en aproximadamente el 20-100 % y preferentemente en aproximadamente 50-100 % a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. Para identificar dichos anticuerpos, puede realizarse el ensayo de SK-BR-3 descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.677.171. De acuerdo con este ensayo, las células SK-BR-3 se cultivan en una mezcla 1:1 de F12 y medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina y penicilina estreptomycin. Las células SK-BR-3 se siembran a 20.000 células en una placa de cultivo celular de 35 mm (2 ml/placa de 35 mm). Se añaden de 0,5 a 30 µg/ml del anticuerpo de HER2 por placa. Después de seis días, se cuenta el número de células, en comparación con las células no tratadas, usando un contador celular electrónico COULTER™. Los anticuerpos que inhiben el crecimiento de las células SK-BR-3 en aproximadamente 20-100 % o aproximadamente 50-100 % pueden seleccionarse como anticuerpos inhibidores del crecimiento. Véase la patente de EE.UU. n.º 5.677.171 para ensayos de selección de anticuerpos inhibidores del crecimiento, tales como 4D5 y 3E8.

Para seleccionar los anticuerpos que inducen la apoptosis, está disponible un ensayo de unión a anexina usando células BT474. Las células BT474 se cultivan y siembran en placas como se ha analizado en el párrafo anterior. El medio se retira después y se reemplaza con medio nuevo solo o medio que contiene 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal. Después de un periodo de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se separan mediante tripsinización. Las células se centrifugan a continuación, se resuspenden en tampón de unión con Ca^{2+} y se distribuyen en alícuotas en tubos como se ha analizado anteriormente para el ensayo de muerte celular. Los tubos reciben después anexina marcada (por ejemplo anexina V-FTIC) (1 µg/ml).

Las muestras se pueden analizar usando el citómetro de flujo FACSCAN™ y el programa informático FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Los anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión de anexina en relación con el control se seleccionan como anticuerpos inductores de apoptosis. Además del ensayo de unión a anexina, está disponible un ensayo de tinción de ADN usando células BT474. Para realizar este ensayo, se incuban células BT474 que se han tratado con el anticuerpo de interés como se ha descrito en los dos párrafos anteriores con HOECHST 33342™ 9 µg/ml durante 2 horas a 37 °C, después se analizan en un citómetro de flujo EPICS ELITE™ (Coulter Corporation) usando software MODFIT LT™ (Verity Software House). Pueden seleccionarse anticuerpos que inducen un cambio en el porcentaje de células apoptóticas que es 2 veces o más (y preferentemente 3 o más) más alto que las células no tratadas (hasta 100 % de células apoptóticas) como anticuerpos pro-apoptóticos usando este ensayo. Véase el documento WO98/17797 para ensayos de selección de anticuerpos que inducen apoptosis, tales como 7C2 y 7F3.

Para seleccionar anticuerpos que se unen a un epítipo en HER2 unido con un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado habitual tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988), para evaluar si el anticuerpo bloquea de forma cruzada la unión de un anticuerpo, tal como 2C4 o pertuzumab, con HER2. Como alternativa o además, puede realizarse un mapeo de epítopos por métodos conocidos en la técnica y/o se puede estudiar la estructura de anticuerpo-HER2 (Franklin *et al.* *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)) para ver qué dominio o dominios de HER2 se unen con el anticuerpo.

(ix) Composiciones de pertuzumab

En una composición de anticuerpo HER2, la composición comprende una mezcla de una especie principal de anticuerpo pertuzumab y una o más variantes del mismo. El anticuerpo de la especie principal de pertuzumab es uno que comprende las secuencias de aminoácidos variables ligeras y variables pesadas en las SEQ ID NO:3 y 4, y lo más preferentemente que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada de las SEQ ID NO:13 y 17, y una cadena pesada secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO:14 y 18 (incluidas las variantes desamidadas y/u oxidadas de esas secuencias). En una realización, la composición comprende una mezcla del anticuerpo pertuzumab de la especie principal y una variante de la secuencia de aminoácidos del mismo que comprende una extensión líder amino-terminal. Preferentemente, la extensión líder amino-terminal está en una cadena ligera de la variante de anticuerpo (por ejemplo, en una o dos cadenas ligeras de la variante de anticuerpo). El anticuerpo HER2 de la especie principal o la variante del anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos Fab de $F(ab')_2$, pero preferentemente ambos son anticuerpos de longitud completa. La variante de anticuerpo del presente documento puede comprender una extensión líder amino-terminal en una cualquiera o más de las cadenas pesadas o ligeras de la misma. Preferentemente, la extensión líder amino-terminal se encuentra en una o dos cadenas ligeras del anticuerpo. La extensión líder amino-terminal preferentemente comprende o consiste en VHS-. La presencia de la extensión líder amino-terminal en la composición puede detectarse mediante diversas técnicas analíticas que incluyen, pero sin limitación, análisis de secuencia N-terminal, ensayo para heterogeneidad de carga (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico o electroforesis de zona capilar), espectrometría de masas, etc. La cantidad de la variante de anticuerpo en la composición generalmente varía desde una cantidad que constituye el límite de detección mínimo de cualquier ensayo (preferentemente análisis de secuencia N-terminal) usado para detectar la variante hasta una cantidad inferior que la cantidad del anticuerpo de la especie principal. En general, aproximadamente el 20 % o menos (por ejemplo, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 15 %, por ejemplo, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 %) de las moléculas de anticuerpo en la composición comprenden una extensión líder amino-terminal. Dichas cantidades porcentuales se determinan preferentemente usando un análisis cuantitativo de secuencia N-terminal o un análisis de intercambio catiónico (preferentemente usando una columna de intercambio de catión débil de alta resolución, tal como una columna de intercambio catiónico PROPAC WCX-10™). Aparte de la variante de extensión líder amino-terminal, se contemplan otras alteraciones de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo y/o variante de la especie principal, que incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo que comprende un resto de lisina C-terminal en una o ambas cadenas pesadas del mismo, una variante de anticuerpo desamidado, etc.

Además, el anticuerpo o variante de la especie principal puede comprender además variaciones de glucosilación, cuyos ejemplos no limitativos incluyen un anticuerpo que comprende una estructura oligosacárida G1 o G2 unida a la región Fc del mismo, un anticuerpo que comprende un resto de carbohidrato unido a una cadena ligera del mismo (por ejemplo, uno o dos restos de carbohidratos, tales como glucosa o galactosa, unidos a una o dos cadenas ligeras del anticuerpo, por ejemplo unidos a uno o más restos de lisina), un anticuerpo que comprende una o dos cadenas pesadas no glucosiladas, o un anticuerpo que comprende un oligosacárido sialidado unido a una o dos cadenas pesadas del mismo, etc.

La composición puede recuperarse de una línea celular modificada por ingeniería genética, por ejemplo, una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) que expresa el anticuerpo de HER2 o puede prepararse por síntesis peptídica.

(x) Inmunoconjugados

También se describen inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo una toxina de moléculas pequeñas o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados. También se contemplan en el presente documento conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una calicheamicina, una maitansina (patente de EE.UU. n.º 5.208.020), un tricoteno, y CC1065.

En un enfoque, el anticuerpo se conjuga con una o más moléculas de maitansina (por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina puede, por ejemplo, convertirse a May-SS-Me que puede reducirse a May-SH3 y hacerse reaccionar con el anticuerpo modificado (Chari *et al. Cancer Research* 52: 127-131 (1992)) para generar un inmunoconjugado de maitansinoide-anticuerpo.

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia de antibióticos de la calicheamicina es capaz de producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones sub-picomolares. Los análogos estructurales de calicheamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG y θ_1^I (Hinman *et al. Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993) y Lode *et al. Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)). Véase, también, la patente de EE.UU. n.º 5.714.586; 5.712.374; 5.264.586; y 5.773.001.

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, los fragmentos activos de no unión de la toxina de difteria, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, sarcina alfa, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, el inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente divulgación contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Están disponibles diversos isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos de HER2 radioconjugados. Ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioactivos de Lu.

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil -4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidioésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisocianato) y compuestos de bis-activo fluorina (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina ricina como se ha descrito en Vitetta *et al. Science* 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil por ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al. Cancer Research* 52: 127-131 (1992)).

Como alternativa, puede fabricarse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo por técnicas recombinantes o síntesis peptídica.

Otros inmunoconjugados se contemplan en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a uno de diversos polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede inmovilizarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 82:3688 (1985); Hwang *et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 77:4030 (1980); las patentes de EE.UU n.º 4.485.045 y 4.544.545; y el documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se divulgan en la patente de EE.UU. n.º 5.013.556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Pueden conjugarse fragmentos Fab' del anticuerpo con los liposomas como se describe en Martin *et al. J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982)) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está contenido opcionalmente dentro del liposoma. Véase, Gabizon *et al. J. National Cancer Inst.* 81(19)1484 (1989).

III. Selección de pacientes para terapia

El paciente en el presente documento se somete opcionalmente a una prueba de diagnóstico antes de la terapia. Por ejemplo, la prueba de diagnóstico puede evaluar la expresión de HER (por ejemplo, HER2 o EGFR) (incluida la sobreexpresión), la amplificación y/o la activación (incluida la fosforilación o la dimerización).

En general, si se realiza una prueba de diagnóstico, se puede obtener una muestra de un paciente que necesita terapia. Cuando el sujeto tiene cáncer, la muestra es generalmente una muestra de tumor.

Sin embargo, se observa que en el presente documento se describen diversas indicaciones terapéuticas no malignas para los anticuerpos contra HER. Cuando el paciente se va a tratar por esas indicaciones no malignas, se

puede obtener una muestra adecuada del paciente y someterla a un ensayo de diagnóstico como se describe en el presente documento.

La muestra biológica en el presente documento puede ser una muestra fija, por ejemplo, una muestra fijada con formalina, embebida en parafina (FFPE), o una muestra congelada.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el paciente seleccionado para terapia tiene un tumor que muestra la activación de HER (y preferentemente HER2). En una realización, el grado de activación de HER (o HER2) en células cancerosas excede significativamente el nivel de activación de ese receptor en células no cancerosas del mismo tipo de tejido. Dicha activación excesiva puede resultar de la sobreexpresión del receptor HER y/o niveles más altos que los normales de un ligando HER disponible para activar el receptor HER en las células cancerosas. Dicha activación excesiva puede producir y/o estar causada por el estado maligno de una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el cáncer se someterá a un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si la amplificación y/o la expresión en exceso de un receptor de HER se está produciendo y da como resultado dicha activación excesiva del receptor de HER. Como alternativa o además, el cáncer se puede someter a un ensayo de diagnóstico o pronóstico para determinar si la amplificación y/o la expresión en exceso de un ligando de HER se está produciendo en el cáncer, lo que se atribuye a una activación excesiva del receptor. En un subconjunto de dichos cánceres, una activación excesiva del receptor puede ser el resultado de una ruta de estimulación autocrina. Diversos ensayos para determinar la activación de HER se describirán con más detalle a continuación.

(I) Dímeros HER

Las muestras de tumores se pueden evaluar para detectar la presencia de dímeros HER, lo que indica la activación de HER o HER2. Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para detectar dímeros de HER2, tales como EGFR-HER2, HER2-HER3, en tumores. A continuación se describen varios métodos preferentes. Estos métodos detectan interacciones proteína-proteína no covalentes o, indican, de otro modo, la proximidad entre proteínas de interés.

Se pueden usar métodos basados en la inmutafinidad, tales como la inmunoprecipitación o ELISA, para detectar los dímeros de HER. En un enfoque, los anticuerpos contra HER2 se usan para inmunoprecipitar complejos que comprenden HER2 de células tumorales, y el inmunoprecipitante resultante se analiza luego para detectar la presencia de EGFR o HER3 mediante inmunotransferencia. En otro enfoque, los anticuerpos contra EGFR o HER3 se pueden usar para la etapa de inmunoprecipitación y el inmunoprecipitante luego se prueba con anticuerpos contra HER2. En un enfoque adicional, los ligandos HER específicos de los complejos EGFR, HER3, EGFR/HER2 o complejos HER2/HER3 se pueden usar para precipitar complejos, que luego se sondean para detectar la presencia de HER2. Por ejemplo, los ligandos pueden conjugarse con avidina y los complejos se pueden purificar en una columna de biotina.

En otros enfoques, tales como los ensayos ELISA o de tipo "sándwich" de anticuerpos, los anticuerpos contra HER2 se inmovilizan en un soporte sólido, se ponen en contacto con células tumorales o lisado de células tumorales, se lavan y luego se exponen a anticuerpos contra EGFR o HER3. La unión de este último anticuerpo, que puede detectarse directamente o mediante un anticuerpo secundario conjugado con un marcador detectable, indica la presencia de heterodímeros. En determinados enfoques, el anticuerpo EGFR o HER3 está inmovilizado, y el anticuerpo HER2 se usa para la etapa de detección. En otros enfoques, los ligandos de HER pueden usarse en lugar de, o en combinación con anticuerpos contra HER.

La reticulación química o UV también se puede usar para unir covalentemente dímeros en la superficie de las células vivas. Hunter *et al.*, *Biochem. J.*, 320: 847-53. Ejemplos de agentes de reticulación químicos incluyen ditiobis (succinimidil)propionato (DSP) y 3,3ditiobis(sulfosuccinimidil)propionato (DTSSP). En un enfoque, los extractos celulares de células tumorales reticuladas químicamente se analizan mediante SDS-PAGE y se inmunotransferen con anticuerpos contra EGFR y/o HER3. Una banda superdesplazada del peso molecular adecuado representa probablemente dímeros EGFR-HER2 o HER2-HER3, ya que HER2 es el compañero de dimerización preferente para EGFR y HER3. Este resultado se puede confirmar mediante una inmunotransferencia posterior con anticuerpos contra HER2.

La transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) también se puede usar para detectar dímeros de EGFR-HER2 o HER2-HER3. FRET detecta cambios conformacionales de proteínas e interacciones proteína-proteína *in vivo* e *in vitro* basándose en la transferencia de energía de un fluoróforo donante a un fluoróforo aceptor. Selvin, *Nat. Struct. Biol.* 7:730-34 (2000). La transferencia de energía tiene lugar solo si el fluoróforo donante está lo suficientemente cerca del fluoróforo aceptor. En un experimento típico de FRET, dos proteínas o dos sitios en una sola proteína se marcan con diferentes sondas fluorescentes. Una de las sondas, la sonda donante, se excita a un estado de mayor energía por la luz incidente de una longitud de onda específica. La sonda donante luego transmite su energía a la segunda sonda, la sonda aceptor, lo que resulta en una reducción en la intensidad de fluorescencia del donante y un aumento en la emisión de fluorescencia del aceptor. Para medir el alcance de la transferencia de energía, la intensidad del donante en una muestra marcada con sondas donantes y aceptoras se compara con su

intensidad en una muestra marcada con sonda donante solamente. Opcionalmente, la intensidad del aceptador se compara en muestras de donante/aceptor y aceptor solamente. Las sondas adecuadas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, colorantes permeantes de membrana, tales como fluoresceína y rodamina, colorantes orgánicos, tales como los colorantes de cianina, y átomos de lantánido. Selvin, *supra*. Los métodos y la instrumentación para detectar y medir la transferencia de energía también son conocidos en la técnica. Selvin, *supra*.

Las técnicas basadas en FRET adecuadas para detectar y medir interacciones proteína-proteína en células individuales también se conocen en la técnica. Por ejemplo, la microscopía de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia fotoblanqueante de donante (pbFRET) y la microscopía de formación de imágenes del período de vida de fluorescencia (FLIM) se pueden usar para detectar la dimerización de los receptores de la superficie celular. Selvin, *supra*; Gadella & Jovin, *J. Cell Biol.*, 129:1543-58 (1995)). En un enfoque, pbFRET se usa en células "en suspensión" o "*in situ*" para detectar y medir la formación de dímeros de EGFR-HER2 o HER2-HER3, como se describe en Nagy *et al.*, *Cytometry*, 32:120-131 (1998). Estas técnicas miden la reducción en el período de vida útil de la fluorescencia de un donante debido a la transferencia de energía. En un enfoque particular, se puede usar una técnica de FRET tipo Foerster (FCET) de citometría de flujo para investigar la dimerización de EGFR-HER2 y HER2-HER3, como se describe en Nagy *et al.*, *supra*, y Brockhoff *et al.*, *Cytometry*, 44:338-48 (2001).

La FRET se usa preferentemente junto con las técnicas convencionales de marcado inmunohistoquímico. Kenworthy, *Methods*, 24:289-96 (2001). Por ejemplo, los anticuerpos conjugados con colorantes fluorescentes adecuados pueden usarse como sondas para marcar dos proteínas diferentes. Si las proteínas están cerca unas de otras, los colorantes fluorescentes actúan como donantes y aceptadores de FRET. La transferencia de energía se detecta por medios convencionales. La transferencia de energía se puede detectar por medios de citometría de flujo o por sistemas de microscopía digital, como microscopía confocal o microscopía de fluorescencia de campo amplio acoplada a una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD).

En un enfoque, los anticuerpos contra HER2 y los anticuerpos contra EGFR o HER3 se marcan directamente con dos fluoróforos diferentes, por ejemplo, como se describe en Nagy *et al.*, *supra*. Las células tumorales o los lisados de células tumorales se ponen en contacto con los anticuerpos marcados diferencialmente, que actúan como donantes y aceptores de FRET en presencia de dímeros de EGFR-HER2 o HER2-HER3. Como alternativa, los anticuerpos no marcados contra HER2 y EGFR o HER3 se usan junto con los anticuerpos secundarios marcados diferencialmente que sirven como donantes y aceptores. Véase, por ejemplo, Brockhoff *et al.*, *supra*. Se detecta la transferencia de energía y se determina la presencia de dímeros si se encuentra que las etiquetas están muy cerca.

En otros enfoques, los ligandos del receptor HER que son específicos para HER2 y HER1 o HER3 se marcan de forma fluorescente y se usan para estudios de FRET.

En otros enfoques más, la presencia de dímeros en la superficie de las células tumorales se demuestra mediante la co-localización de HER2 con EGFR o HER3 usando técnicas convencionales de inmunofluorescencia directa o indirecta y microscopía de barrido láser confocal. Como alternativa, el escáner láser de formación de imágenes (LSI) se usa para detectar la unión del anticuerpo y la co-localización de HER2 con EGFR o HER3 en un formato de alto rendimiento, tal como una placa de micropocillos, como se describe en Zuck *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 96:11122- 27(1999).

En enfoques adicionales, la presencia de dímeros EGFR-HER2 y/o HER2-HER3 se determina identificando la actividad enzimática que depende de la proximidad de los componentes del dímero. Un anticuerpo HER2 se conjuga con una enzima y un anticuerpo EGFR o HER3 se conjuga con una segunda enzima. Se añade un primer sustrato para la primera enzima y la reacción produce un segundo sustrato para la segunda enzima. Esto conduce a una reacción con otra molécula para producir un compuesto detectable, tal como un colorante. La presencia de otro producto químico descompone el segundo sustrato, por lo que se evita la reacción con la segunda enzima a menos que la primera y la segunda enzimas, y por lo tanto los dos anticuerpos, estén muy cerca. En un enfoque particular, las células tumorales o los lisados celulares se ponen en contacto con un anticuerpo HER2 que está conjugado con glucosa oxidasa y un anticuerpo HER3 o HER1 que está conjugado con peroxidasa de rábano picante. Se añade glucosa a la reacción, junto con un precursor de colorante, tal como DAB y catalasa. La presencia de dímeros se determina por el desarrollo de color en la tinción para DAB.

Los dímeros también pueden detectarse usando métodos basados en el sistema de ensayo eTag™ (Aclara Bio Sciences, Mountain View, CA), como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE.UU. 2001/0049105, publicada el 06 de diciembre de 2001. Un eTag™, o "etiqueta electroforética", comprende un resto indicador detectable, tal como un grupo fluorescente. También puede comprender un "modificador de movilidad", que consiste esencialmente en un resto que tiene una movilidad electroforética única. Estos restos permiten la separación y detección del eTag™ de una mezcla compleja en condiciones electroforéticas definidas, tal como la electroforesis capilar (EC). La porción del eTag™ que contiene el resto indicador y, opcionalmente, el modificador de la movilidad está unida a un primer resto de unión a la diana mediante un grupo de unión escindible para producir un primer compuesto de unión. El primer resto de unión a la diana reconoce específicamente un primer objetivo particular, tal como un ácido nucleico o proteína. El primer resto de unión a la diana no está limitado de ninguna manera, y puede ser, por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido. Preferentemente, el primer resto de unión a la diana es un

anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Como alternativa, el primer resto de unión a la diana puede ser un ligando del receptor HER o un fragmento competente de unión del mismo.

El grupo de enlace comprende preferentemente un resto escindible, tal como un sustrato enzimático, o cualquier enlace químico que pueda escindirse en condiciones definidas. Cuando el primer resto de unión a la diana se une a su objetivo, el agente de escisión se introduce y/o se activa, y el grupo de enlace se escinde, liberando así la porción del eTag™ que contiene el resto indicador y el modificador de movilidad. Por lo tanto, la presencia de un eTag™ "libre" indica la unión del resto de unión a su objetivo.

Preferentemente, un segundo compuesto de unión comprende el agente de escisión y un segundo resto de unión a la diana que reconoce específicamente un segundo objetivo. El segundo resto de unión a la diana tampoco está limitado de ninguna manera y puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o un ligando del receptor HER o un fragmento de ligando competente de unión. El agente de escisión es tal que solo escindirá el grupo de enlace en el primer compuesto de unión si el primer compuesto de unión y el segundo compuesto de unión están muy próximos.

En un enfoque, un primer compuesto de unión comprende un eTag™ en el que un anticuerpo contra HER2 sirve como el primer resto de unión a la diana. Un segundo compuesto de unión comprende un anticuerpo contra EGFR o HER3 unido a un agente de escisión capaz de romper el grupo de enlace del eTag™. Preferentemente, el agente de escisión debe activarse para poder escindir el grupo de enlace. Las células tumorales o los lisados de células tumorales se ponen en contacto con el eTag™, que se une a HER2, y con el anticuerpo modificado contra EGFR o HER3, que se une a EGFR o HER3 en la superficie celular. Se prefiere que el compuesto de unión sin unir se elimine, y el agente de escisión se active, si es necesario. Si los dímeros de EGFR-HER2 o HER2-HER3 están presentes, el agente de escisión escindirá el grupo de enlace y liberará el eTag™ debido a la proximidad del agente de escisión al grupo de enlace. eTag™ libre puede detectarse mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como la electroforesis capilar.

En un enfoque, el agente de escisión es una especie química activable que actúa sobre el grupo de enlace. Por ejemplo, el agente de escisión puede activarse exponiendo la muestra a la luz.

En otro enfoque, el eTag™ se construye usando un anticuerpo para EGFR o HER3 como el primer resto de unión a la diana, y el segundo compuesto de unión se construye a partir de un anticuerpo para HER2.

En otro enfoque más, el dímero HER se detecta usando un anticuerpo u otro reactivo que se une específicamente o preferentemente al dímero en comparación con la unión del mismo a cualquiera de los receptores HER en el dímero.

(ii) Fosforilación de HER2

La inmunoprecipitación con el anticuerpo EGFR, HER2 o HER3 como se analizó en la sección anterior puede ser seguida opcionalmente por un ensayo funcional para dímeros, como alternativa o suplemento a la inmunotransferencia. En un enfoque, la inmunoprecipitación con el anticuerpo HER3 es seguida por un ensayo para la actividad de la tirosina quinasa del receptor en el inmunoprecipitante. Debido a que HER3 no tiene actividad intrínseca de tirosina quinasa, la presencia de actividad de tirosina quinasa en el inmunoprecipitante indica que HER3 está más probablemente asociado con HER2. Graus-Porta *et al.*, *EMBO J.*, 16:1647-55 (1997); Klapper *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 96:4995-5000 (1999). Este resultado se puede confirmar mediante inmunotransferencia con anticuerpos contra HER2. En otro enfoque, la inmunoprecipitación con el anticuerpo HER2 es seguida por un ensayo para la actividad de la tirosina quinasa del receptor EGFR. En este ensayo, el inmunoprecipitante se pone en contacto con ATP radiactivo y un sustrato peptídico que imita el sitio *in vivo* de transfosforilación de HER2 por EGFR. La fosforilación del péptido indica co-inmunoprecipitación y, por lo tanto, dimerización de EGFR con HER2. Los ensayos de actividad de la tirosina quinasa del receptor son bien conocidos en la técnica e incluyen ensayos que detectan la fosforilación de sustratos diana, por ejemplo, mediante el anticuerpo de fosfotirosina, y la activación de rutas de transducción de señales afines, tales como la ruta MAPK.

La fosforilación del receptor HER se puede evaluar mediante inmunoprecipitación de uno o más receptores HER, tal como el receptor HER2 y el análisis de transferencia Western. Por ejemplo, la positividad se determina por la presencia de una banda de fosfo-HER2 en el gel, usando un anticuerpo antifosfotirosina para detectar el(los) residuo(s) de tirosina fosforilados en el(los) receptor(es) de HER inmunoprecipitado. Los anticuerpos antifosfotirosina están disponibles en el mercado en PanVera (Madison, WI), una subsidiaria de Invitrogen, Chemicon International Inc. (Temecula, CA), o Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). La negatividad está determinada por la ausencia de la banda.

En otro enfoque, la fosforilación del receptor HER2 (HER2) se evalúa mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo HER2 fosfo-específico (clon PN2A; Thor *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 18(18):3230-3239 (2000)).

Otros métodos para detectar la fosforilación del(de los) receptor(es) de HER incluyen, pero sin limitación, KIRA ELISA (patentes de EE.UU. n.º 5.766.863; 5.891.650; 5.914.237; 6.025.145; y 6.287.784), espectrometría de masas

(comparando el tamaño de HER2 fosforilado y no fosforilado), y el ensayo de proximidad de etiqueta electrónica con un anticuerpo tanto HER (por ejemplo, HER2) como un anticuerpo específico de fosfo-tirosina (por ejemplo, usando el kit de ensayo eTag™ disponible en Aclara BioSciences (Mountain View, CA). Los detalles del ensayo eTag se han descrito anteriormente en el presente documento.

También se pueden usar anticuerpos fosfo-específicos en una matriz celular para detectar el estado de fosforilación en una muestra celular de proteína de transducción de señales (documento US2003/0190689).

(iii) Perfil de expresión génica

En un enfoque, un análisis de expresión génica puede servir como un sustituto para medir la fosforilación o activación de HER directamente. Esto es particularmente útil cuando la muestra es una muestra fija (por ejemplo, una muestra de tumor fijada con formalina embebida en parafina), en la que la fosforilación de HER puede ser difícil de cuantificar de forma fiable. De acuerdo con este método, se evalúa la expresión de dos o más receptores HER y uno o más ligandos HER en una muestra, en la que la expresión de los dos o más receptores HER y uno o más ligandos HER indica una fosforilación o activación positiva de HER en la muestra. En un método, se puede medir la expresión de betacelulina y/o anfiregulina en la muestra, en la que la expresión de betacelulina y/o anfiregulina indica una fosforilación o activación de HER positiva en la muestra.

De acuerdo con este método, una muestra del paciente se analiza para determinar la expresión de dos o más receptores HER (preferentemente seleccionados de EGFR, HER2 y HER3) y uno o más ligandos HER (preferentemente seleccionados de betacelulina, anfiregulina, efiregulina y TGF- α , lo más preferentemente betacelulina o anfiregulina). Por ejemplo, los dos o más receptores HER pueden ser EGFR y HER2, o HER2 y HER3. Preferentemente, se determina la expresión de HER2 y EGFR o HER3, así como la betacelulina o la anfiregulina. La muestra puede analizarse para determinar la expresión de betacelulina o anfiregulina sola, o en combinación con la prueba de expresión de dos o más receptores HER. La expresión positiva del(de los) gen(es) identificado(s) indica que el paciente es un candidato para la terapia con un anticuerpo HER, tal como pertuzumab. Además, la expresión positiva del(de los) genes indica que es más probable que el paciente responda favorablemente a la terapia con el anticuerpo HER que un paciente que no tiene dicha expresión positiva.

Diversos métodos para determinar la expresión de ARNm o proteína incluyen, pero sin limitación, perfiles de expresión génica, reacción en cadena de la polimerasa (RCP) que incluye RCP cuantitativa en tiempo real (RCP-TRC), análisis de micromatrices, análisis en serie de la expresión génica (SAGE), MassARRAY, análisis de expresión génica mediante secuenciación masiva de firma paralela (MPSS), proteómica, inmunohistoquímica (IHC), etc. Preferentemente se cuantifica el ARNm. Dicho análisis de ARNm se realiza preferentemente usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) o mediante análisis de micromatrices. Cuando se emplea la RCP, una forma preferente de RCP es la RCP cuantitativa en tiempo real (RCP-TRC). En un enfoque, la expresión de uno o más de los genes mencionados anteriormente se considera expresión positiva si se encuentra en la mediana o por encima, por ejemplo en comparación con otras muestras del mismo tipo de tumor. El nivel de expresión mediano se puede determinar esencialmente simultáneamente con la medición de la expresión génica, o se puede haber determinado previamente.

Diversos métodos a modo de ejemplo para la determinación de la expresión génica. Las etapas de un protocolo representativo para perfilar la expresión génica usando tejidos fijos, embebidos en parafina como fuente de ARN, incluido el aislamiento de ARNm, la purificación, la extensión del cebador y la amplificación se proporcionan en diversos artículos publicados de revista (por ejemplo: Godfrey *et al.* *J. Molec. Diagnostics* 2: 84-91 (2000); Specht *et al.*, *Am. J. Pathol.* 158: 419-29 (2001)). En resumen, un proceso representativo comienza con secciones espesas de aproximadamente 10 microgramos de muestras de tejido tumoral embebidas en parafina. A continuación se extrae el ARN y se eliminan las proteínas y el ADN. Después del análisis de la concentración de ARN, se pueden incluir las etapas de reparación y/o amplificación del ARN, si es necesario, y el ARN se transcribe a la inversa usando promotores específicos del gen seguidos de la RCP. Por último, los datos se analizan para identificar la(s) mejor(es) opción(es) de tratamiento disponibles para el paciente en función del patrón característico de expresión génica identificado en la muestra de tumor examinada.

(iv) Expresión y amplificación de HER

Para determinar la expresión o amplificación de HER en el cáncer, se encuentran disponibles diversos ensayos de diagnóstico/pronóstico. En un enfoque, la sobreexpresión de HER puede ser analizada por IHC, por ejemplo, usando el HERCEPTEST® (Dako). Las secciones de tejido embebidas en parafina de una biopsia de tumor se pueden someter al ensayo de IHC y se les otorga un criterio de intensidad de tinción de la proteína HER2 como sigue:

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

Puntuación 1+ se detecta una tinción de la membrana débil/apenas perceptible en más del 10 % de las células tumorales. Las células solo se tiñen en parte de su membrana.

Puntuación de 2+, se observa una tinción de membrana completa de débil a moderada en más del 10 % de las

células tumorales.

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

- 5 Los tumores con puntuaciones de 0 o 1+ para la evaluación de la sobreexpresión de HER2 pueden caracterizarse como no sobreexpresión de HER2, mientras que los tumores con puntuaciones de 2+ o 3+ pueden caracterizarse por sobreexpresar HER2.

- 10 Los tumores que sobreexpresan HER2 pueden clasificarse por puntuaciones inmunohistoquímicas correspondientes al número de copias de moléculas de HER2 expresadas por célula, y pueden determinarse bioquímicamente:

0 = 0-10.000 copias/célula,

1+ = al menos aproximadamente 200.000 copias/célula,

2+ = al menos aproximadamente 500.000 copias/célula,

- 15 3+ = al menos aproximadamente 2.000.000 copias/célula.

- 20 La sobreexpresión de HER2 en el nivel 3+, que conduce a la activación independiente de ligando de la tirosina quinasa (Hudziak *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 84:7159-7163 (1987)), se produce en aproximadamente un 30 % de los cánceres de mama y, en estos pacientes, la supervivencia libre de recaída y la supervivencia general disminuyen (Slamon *et al.*, *Science*, 244:707-712 (1989); Slamon *et al.*, *Science*, 235:177-182 (1987)).

- 25 Como alternativa o además, los análisis de FISH como el INFORM™ (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION™ (Vysis, Illinois) se pueden llevar a cabo en tejido tumoral embebido en parafina y fijado con formalina, para determinar la extensión (si corresponde) de la amplificación de HER2 en el tumor.

- En un enfoque, el cáncer será uno que exprese (y puede sobreexpresar) el EGFR, dicha expresión puede evaluarse como en los métodos para evaluar la expresión de HER2 como se señaló anteriormente.

- 30 El receptor HER o la sobreexpresión o amplificación del ligando HER también se pueden evaluar usando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo, administrando una molécula (como un anticuerpo) que se une a la molécula que se va a detectar y se marca con una etiqueta detectable (por ejemplo, un isótopo radioactivo) y escanea externamente al paciente para localizar la etiqueta.

IV. Formulaciones farmacéuticas

- 35 Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención se preparan para el almacenamiento al mezclar un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales, (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes y/o
- 40 estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilo amonio; cloruro de hexametONIO; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; parabenos de alquilo tales como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de
- 45 aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos,
- 50 tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones de anticuerpos liofilizados se describen en el documento WO 97/04801.

- La formulación de pertuzumab preferente para su uso terapéutico comprende 30 mg/ml de pertuzumab en acetato de histidina 20 mM, sacarosa 120 mM, polisorbato 20 al 0,02 %, a pH 6,0. Una formulación alternativa de
- 55 pertuzumab comprende 25 mg/ml de pertuzumab, tampón de histidina-HCl 10 mM, sacarosa 240 mM, polisorbato 20 al 0,02 %, pH 6,0.

- La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Diversos fármacos que se pueden combinar con el anticuerpo HER se describen en la sección del método de tratamiento a continuación. Dichas moléculas están presentes de manera conveniente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin que se pretende.
- 60

- Los principios activos pueden inmovilizarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo,
- 65

liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

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 con forma, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de EE.UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como la serie LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-ácido D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* son generalmente estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

V. Tratamiento y dosificación de anticuerpos HER

La invención proporciona el tratamiento del cáncer de mama metastásico (CMM). En una realización, el cáncer que se trata es un cáncer resistente a la quimioterapia o un cáncer resistente al platino. La administración de dosis fijas del anticuerpo dará como resultado una mejoría en los signos o síntomas del cáncer.

El anticuerpo HER se administra a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos, tales como la administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa del anticuerpo.

De acuerdo con la invención, se administra una dosis fija de pertuzumab de 840 mg (dosis de carga), seguida de dosis de 420 mg (dosis de mantenimiento) del anticuerpo. Las dosis de mantenimiento se administran aproximadamente cada 3 semanas, para un total de al menos dos dosis, hasta 17 o más dosis.

Cuando la enfermedad es cáncer, el paciente es tratado preferentemente con una combinación del anticuerpo HER y uno o más agentes quimioterapéuticos. Preferentemente, al menos uno de los agentes quimioterapéuticos es un agente quimioterapéutico antimetabolito tal como gemcitabina. La administración combinada incluye la administración conjunta o simultánea, 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 sus actividades biológicas de forma simultánea. Por lo tanto, el agente quimioterapéutico antimetabolito se puede administrar antes o después de la administración del anticuerpo HER. En esta realización, el tiempo entre al menos una administración del agente quimioterapéutico antimetabolito y al menos una administración del anticuerpo HER es preferentemente de aproximadamente 1 mes o menos, y lo más preferentemente de aproximadamente 2 semanas o menos. Como alternativa, el agente quimioterapéutico antimetabolito y el anticuerpo HER se administran simultáneamente al paciente, en una única formulación o formulaciones separadas. El tratamiento con la combinación del agente quimioterapéutico (por ejemplo, un agente quimioterapéutico antimetabolito tal como gemcitabina) y el anticuerpo HER (por ejemplo, pertuzumab) pueden dar como resultado un beneficio sinérgico, o mayor que el beneficio terapéutico aditivo al paciente.

Un agente quimioterapéutico antimetabolito, si se administra, generalmente se administra en dosis conocidas, o se reduce opcionalmente debido a la acción combinada de los fármacos o los efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico antimetabolito. Los esquemas de preparación y dosificación de dichos agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según lo determine empíricamente el facultativo experto en la técnica. Cuando el agente quimioterapéutico antimetabolito es la gemcitabina, preferentemente, se administra en una dosis entre aproximadamente 600 mg/m² a 1250 mg/m² (por ejemplo aproximadamente 1000 mg/m²), por ejemplo, los días 1 y 8 de un ciclo de 3 semanas.

Aparte del anticuerpo HER y el agente quimioterapéutico antimetabolito, otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con ellos. Por ejemplo, se puede administrar un segundo (tercero, cuarto etc.) agente(s) quimioterapéutico(s), en los que el segundo agente quimioterapéutico es otro agente quimioterapéutico antimetabolito diferente, o un agente quimioterapéutico que no es un antimetabolito. Por ejemplo, el segundo agente quimioterapéutico puede ser un taxano (tal como paclitaxel o docetaxel), capecitabina o un agente quimioterapéutico basado en platino (tal como carboplatino, cisplatino u oxaliplatino), antraciclina (tal como doxorubicina, incluyendo doxorubicina liposomal), topotecán, pemetrexed, alcaloide de la vinca (tal como vinorelbina) y TLK 286. Se pueden administrar "cócteles" de diferentes agentes quimioterapéuticos.

Otros agentes terapéuticos que pueden combinarse con el anticuerpo HER incluyen uno o más de: un segundo anticuerpo HER diferente (por ejemplo, un anticuerpo HER2 inhibidor del crecimiento tal como el trastuzumab, o un anticuerpo HER2 que induce la apoptosis de una célula que sobreexpresa HER2), tal como 7C2, 7F3 o variantes humanizadas de los mismos); un anticuerpo dirigido contra un antígeno asociado a un tumor diferente, tales como

EGFR, HER3, HER4; compuesto antihormonal, por ejemplo, un compuesto antiestrógeno tal como tamoxifeno, o un inhibidor de aromatasas; un cardioprotector (para evitar o reducir cualquier disfunción miocárdica asociada con la terapia); una citoquina; un fármaco dirigido a EGFR (tal como TARCEVA[®], IRESSA[®] o Cetuximab); un agente antiangiogénico (especialmente bevacizumab comercializado por Genentech con la marca comercial AVASTIN[™]); un inhibidor de tirosina quinasa; un inhibidor de COX (por ejemplo un inhibidor de COX-1 o COX-2); fármaco antiinflamatorio no esteroideo, Celecoxib (CELEBREX[®]); inhibidor de farnesil transferasa (por ejemplo, Tipifarnib/ZARNESTRA[®] R115777 disponible en Johnson y Johnson o Lonafarnib SCH66336 disponible en Schering-Plough); anticuerpo que se une con la proteína oncofetal CA 125 tal como Oregovomab (MoAb B43.13); vacuna de HER2 (tal como vacuna de HER2 AutoVac de Pharmexia, o vacuna de proteína APC8024 de Dendreon, o vacuna de péptido de HER2 de GSK/Corixa); otra terapia de dirección a HER (por ejemplo, trastuzumab, cetuximab, gefitinib, erlotinib, CI1033, GW2016 etc.); inhibidor de Raf y/o ras (véase, por ejemplo, el documento WO 2003/86467); inyección de liposomas de doxorubicina HCl (DOXIL[®]); inhibidor de la topoisomerasa I, como topotecán; taxano; inhibidor de la tirosina quinasa dual de HER2 y EGFR tales como lapatinib/GW572016; TLK286 (TELCYTA[®]); EMD-7200; un medicamento que trata las náuseas tal como un antagonista de serotonina, esteroide o benzodiacepina; un medicamento que evita o trata la erupción cutánea o terapias de acné convencionales, incluyendo antibiótico tópico u oral; un medicamento reductor de la temperatura corporal tal como un acetaminofeno, difenhidramina o meperidina; factor de crecimiento hematopoyético, etc.

Las dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriormente son las usadas en la actualidad y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y del anticuerpo de HER.

Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede someterse a retirada quirúrgica de células cancerosas y/o radioterapia.

Preferentemente, el anticuerpo administrado es un anticuerpo desnudo. Sin embargo, el anticuerpo administrado puede conjugarse con un agente citotóxico. Preferentemente, el inmunoconjugado y/o antígeno con el que se une se internaliza o internalizan por la célula, dando como resultado una eficacia terapéutica aumentada del inmunoconjugado en la destrucción de la célula cancerosa con la que se une. En una realización preferente, el agente citotóxico se dirige o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen maitansinoides, calicheamicinas, ribonucleasas y endonucleasas de ADN.

Aparte de la administración de la proteína del anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración de un anticuerpo o inhibidor de la proteína mediante terapia génica. Véase, por ejemplo, el documento WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996 en relación con el uso de la terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Hay dos enfoques principales para obtener el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células del paciente; *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, generalmente en el sitio en el que se requiere el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, las células del paciente se eliminan, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.892.538 y 5.283.187). Hay diversas técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a células cultivadas *in vitro* o *in vivo* en las células del huésped deseado. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico a células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Un vector de uso común para la administración *ex vivo* del gen es un retrovirus.

Las técnicas de transferencia de ácidos nucleicos *in vivo* actualmente preferentes incluyen la transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus Herpes simplex I o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (los lípidos útiles para la transferencia del gen mediada por lípidos son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). En algunas situaciones, es deseable proporcionar a la fuente de ácido nucleico un agente que se dirija a las células diana, tal como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se emplean liposomas, las proteínas que se unen a una proteína de la membrana de la superficie celular asociada con la endocitosis se pueden usar para dirigir y/o para facilitar la captación, por ejemplo, proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas en el trópico para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que se someten a una internalización en ciclos, y proteínas que se dirigen a la localización intracelular y mejoran la semivida intracelular. La técnica de la endocitosis mediada por receptores se describe, por ejemplo, por Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987); y Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87:3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos actualmente conocidos de marcaje genético y terapia génica, véase Anderson *et al.*, *Science* 256:808-813 (1992). Véase también el documento WO 93/25673 y las referencias citadas en el mismo.

VI. Artículos de fabricación

También se divulga, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento del

cáncer o los otros trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un vial con una dosis fija del anticuerpo HER contenido en el mismo y, opcionalmente, un prospecto. El vial se puede formar a partir de diversos materiales, tales como vidrio o plástico, y se puede sellar con un tapón perforable con una jeringa. Por ejemplo, el vial puede ser un vial tipo vitrum de vidrio I formal (por ejemplo, un vial de 20 cc para una dosis fija de 420 mg o un vial de 50 cc para una dosis fija de 1050 mg, con tapón laminado de resina de fluoruro DAIKYO GREY™ y tapa de aluminio abatible de 20 mm. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas, etc.

- 10 En el enfoque preferente, el artículo de fabricación comprende un vial que contiene una dosis fija de un anticuerpo HER (por ejemplo, pertuzumab), en el que la dosis fija es de aproximadamente 420 mg, aproximadamente 525 mg, aproximadamente 840 mg, o aproximadamente 1050 mg del anticuerpo HER.

- 15 El artículo de fabricación preferentemente comprende además un prospecto. El prospecto puede proporcionar instrucciones para administrar la dosis fija a un paciente con cáncer, incluido, pero sin limitación, un paciente con cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de mama metastásico (MBC), cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de próstata, cáncer colorrectal y/o para administrar la dosis fija a un paciente con cáncer cuyo cáncer muestra expresión, amplificación y/o fosforilación de HER.

- 20 En un enfoque, el artículo de fabricación comprende dos viales, en los que un primer vial contiene una dosis fija de aproximadamente 840 mg de pertuzumab, y un segundo vial contiene una dosis fija de aproximadamente 420 mg de pertuzumab.

VII. Depósito de materiales

- 25 Las siguientes líneas celulares de hibridomas se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU (ATCC):

Denominación del anticuerpo	Nº de ATCC	Fecha del depósito
7C2	ATCC HB-12215	17 de octubre de 1996
7F3	ATCC HB-12216	17 de octubre de 1996
4D5	ATCC CRL 10463	24 de mayo de 1990
2C4	ATCC HB-12697	08 de abril de 1999

- 30 Se ilustran más detalles de la invención por el siguiente ejemplo no limitante.

Ejemplo 1

- 35 El presente ejemplo evalúa la población farmacocinética (PK) y las covariables predictivas para el pertuzumab del anticuerpo HER, y examinó la variabilidad de las concentraciones séricas valle en estado estacionario después de los métodos de dosificación fijos, basados en el peso corporal o basados en ASC. El pertuzumab se administró mediante infusión IV (q3 semanas) como una dosis basada en el peso (0,5-15 mg/kg) o una dosis fija (420 mg o 1050 mg). Los datos de concentración sérica de pertuzumab de una fase I y dos pruebas de fase II (ovario y mama), que comprenden 153 pacientes y 1458 puntos de concentración-tiempo, se agruparon para este análisis usando NONMEM™ con la estimación condicional de primer orden con un método de interacción (interacción FOCE). Un modelo lineal de 2 compartimentos describe mejor los datos. El peso corporal, la albúmina sérica y la fosfatasa alcalina sérica fueron covariables significativas que afectan el aclaramiento (CL), y el área de la superficie corporal (ASC) fue una variable significativa que afectó el volumen de distribución en el compartimiento central (Vc). En el modelo final, CL y Vc fueron 0,214 l/día y 2,74 l, respectivamente. El peso solo explicó el 8,3 % de la variabilidad entre pacientes para la CL. La evaluación del modelo PK final de la población mediante una verificación predictiva posterior mostró un buen rendimiento. En comparación con la dosificación fija, la dosificación basada en peso y la dosificación basada en ASC solo redujo la variabilidad poblacional de las concentraciones valle en estado estacionario en 6,2 % y 5,8 %, respectivamente, en 1000 sujetos simulados retirados del conjunto de datos original usando el modelo final. Las simulaciones también mostraron que los porcentajes de sujetos con concentraciones valle previstas en estado estacionario por debajo de un objetivo de 20 mcg/ml fueron similares después de una dosificación fija, basada en peso o basada en ASC. Se concluyó que aunque los anticuerpos son normalmente dosificados en peso, los análisis en este ejemplo demuestran la conveniencia de administrar el anticuerpo HER, pertuzumab, usando una dosis fija para tratar el cáncer.

MÉTODOS

Estudios y pacientes

- 60 Los tres estudios usados en este análisis fueron aprobados por los comités de ética adecuados de los centros participantes. Se obtuvo el escrito del consentimiento informado de todos los pacientes.

El estudio 1 fue un estudio de fase Ia, sin enmascaramiento, multicéntrico, con aumento escalonado de la dosis para evaluar la seguridad, la tolerabilidad y los perfiles farmacocinéticos de pertuzumab administrado por vía intravenosa como un agente único a sujetos con tumores malignos sólidos avanzados. Estos pacientes recibieron una dosis de pertuzumab administrada por vía IV cada 3 semanas como una infusión IV de 90 minutos en el 1er ciclo, luego como infusión de 30 minutos en ciclos posteriores. Las dosis se incrementaron (0,5, 2, 5, 10 y 15 mg/kg) en cohortes de 3 o 6 sujetos hasta que se definió la dosis máxima tolerada (DMT) o se alcanzó el nivel de dosis más alto. Durante el primer ciclo de tratamiento, las muestras de suero para la determinación de las concentraciones de pertuzumab se recolectaron en puntos de tiempo en serie: antes de la dosis, al final de la infusión IV, a las 1,5, 4 y 9 horas, y en los días 2, 5, 8, y 15. Durante el segundo ciclo de tratamiento, las muestras de suero para la determinación de las concentraciones de pertuzumab se recolectaron antes de la dosis, 29 minutos después del inicio de la infusión IV y el día 8.

El estudio 2 fue un ensayo clínico de fase II, sin enmascaramiento, con un solo grupo, multicéntrico para evaluar la eficacia general, la seguridad, la tolerabilidad y el efecto de la activación de HER2 basada en el tumor sobre la eficacia del pertuzumab en pacientes con cáncer de ovario avanzado, en el que la enfermedad fue refractaria o recurrente después de la quimioterapia previa. Estas mujeres recibieron infusiones IV de pertuzumab administradas como un agente único durante un período de 90 minutos durante el 1er ciclo a una dosis fija de 840 mg, seguido de una dosis de mantenimiento de 420 mg, administradas como una infusión de 30 minutos cada 3 semanas durante los ciclos de tratamiento posteriores. Durante el primer y segundo ciclo de tratamiento, las muestras de suero para la determinación de las concentraciones de pertuzumab se recolectaron antes de la dosis, 15 minutos después del final de la infusión, y en los días 8 y 15. Se recolectaron muestras de suero adicionales para la determinación de las concentraciones de pertuzumab antes de la dosis y 15 minutos después del final de la infusión intravenosa durante los ciclos de tratamiento posteriores.

El estudio 3 fue un estudio de fase II, sin enmascaramiento, con un solo grupo, aleatorizado, multicéntrico para evaluar la eficacia y seguridad de dos dosis diferentes de pertuzumab administradas como un solo agente en pacientes con cáncer de mama metastásico con baja expresión de HER2. En la cohorte de la primera dosis, los pacientes recibieron pertuzumab como una infusión IV administrada durante un período de 90 minutos como una dosis de carga de 840 mg en el 1er ciclo, seguido de una dosis de mantenimiento de 420 mg administrada cada 3 semanas como una infusión IV de 30 minutos durante ciclos de tratamiento posteriores. En la cohorte de la segunda dosis, los pacientes recibieron una infusión IV de pertuzumab como una dosis de 1050 mg durante un período de 90 minutos en el 1er ciclo, y como una dosis de 1050 mg como una infusión IV de 30 minutos cada 3 semanas durante los ciclos de tratamiento posteriores. En el estudio 3, las muestras de suero para la determinación de las concentraciones de pertuzumab se recolectaron antes de la dosis, 15 minutos después del final de la infusión, y en los días 8 y 15 durante el primer y segundo ciclos de tratamiento. Se recolectaron muestras de suero adicionales para la determinación de las concentraciones de pertuzumab antes de la dosis y 15 minutos después del final de la infusión durante los ciclos de tratamiento posteriores.

Ensayo de fármacos

Las concentraciones séricas de pertuzumab se determinaron mediante un ensayo de inmunoabsorción (ELISA), de unión a receptor, ligado a enzimas. El ensayo usó el dominio extracelular p185HER2 para capturar pertuzumab de muestras de suero. El pertuzumab unido se detectó con peroxidasa de rábano picante (HRP) de Fc anti-humana de ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), y se usó tetrametil benzidina (TMB) (KPL, Inc.) como sustrato para el desarrollo del color para cuantificar el pertuzumab sérico. El ensayo tiene una concentración mínima cuantificable de 0,25 mcg/ml para pertuzumab en suero humano.

Análisis farmacocinético poblacional

Se realizó un modelado poblacional de efectos mixtos no lineales usando NONMEM™ (Boeckmann y Beal NONMEM™ Guía del usuario. San Francisco: Grupo de Proyecto NONMEM™, Universidad de California, San Francisco (1994)) software (versión V, nivel 1.0) con NM-TRAN y PREDPP y el compilador Compaq Visual Fortran (versión 6.5). Dos modelos estructurales básicos diferentes, un modelo PK lineal de uno y dos compartimentos con infusión IV, se ajustaron a los datos de concentración-tiempo de pertuzumab en suero. El método de estimación condicional de primer orden (FOCE), con interacción η - ϵ se usó en todo el procedimiento de construcción de modelos.

Se usó un modelo de error exponencial para describir la variabilidad interindividual para los parámetros PK:

$$P_i = \hat{P}_i \exp(\eta_{ip}) \quad (1)$$

Se implementó un modelo de regresión covariable multiplicativa de la siguiente manera:

$$\hat{P}_i = \theta_1 \left(\frac{X_i}{\text{med}(X)} \right)^{\theta_X} (1 + \theta_D D) \quad (2)$$

en la que η_{ip} indica la diferencia proporcional entre los verdaderos parámetros (P_i) de i^o pacientes individuales y el valor típico (\hat{P}) en la población, se ajustó para los valores de las covariables iguales a los de este paciente individual. La η_{ip} son los efectos aleatorios con media cero y varianza ω^2 . El θ_x , y θ_D son los coeficientes de regresión que se estiman para covariables continuas (por ejemplo, PC) o dicotómicas (por ejemplo, sexo y raza), respectivamente. Las variables continuas se centraron en sus valores medianos ($\text{med}(X)$), lo que permitió que θ_1 represente la estimación de aclaramiento para el típico paciente con covariables medianas. Se codificaron covariables dicotómicas 0 o 1 (por ejemplo, sexo = 0 para la mujer, sexo = 1 para el hombre; raza = 0 para caucásica, y raza = 1 para las demás). La variabilidad residual se modela como modelo aditivo de error proporcional:

10 $C_{pij} = \hat{C}_{pij} (1 + \varepsilon_{ij,prop}) + \varepsilon_{ij,add}$, en la que C_{pij} y \hat{C}_{pij} son las j^o medidas y la concentración prevista por el modelo, respectivamente, para i^o individual, y $\varepsilon_{ij,prop}$ y $\varepsilon_{ij,add}$ indican los errores aleatorios intraindividuales residuales proporcionales y aditivos distribuidos con cero medias y varianzas σ_{prop}^2 y σ_{add}^2 .

Las relaciones entre las estimaciones bayesianas basadas en modelos estructurales de los parámetros de PK y las covariables individuales se exploraron gráficamente. Sobre la base de análisis exploratorios preliminares, se probó el efecto de cada covariable en los parámetros de PK. Inicialmente, se examinó la influencia de las covariables en los parámetros PK individuales (es decir, el aclaramiento y el volumen del compartimento central). A continuación, se construyó un modelo de covariables completos para los parámetros PK individuales incorporando las covariables significativas en el modelo. Se usó un proceso de eliminación hacia atrás para determinar el modelo de covariable final para cada parámetro de PK individual al conservar solo las covariables significativas en el modelo. Cuando las covariables altamente correlacionadas tenían un significado farmacológico similar (tal como peso y ASC), solo se conservó el factor más significativo en el modelo. Este modelo de covariable final obtenido para cada parámetro de PK se combinó luego para formar un nuevo modelo completo y el modelo de PK de población final se elaboró usando un proceso de eliminación hacia atrás.

La comparación de modelos estructurales alternativos y la construcción del modelo de covariable se basaron en las típicas gráficas de diagnóstico de bondad de ajuste y la prueba de relación de probabilidad. Cuando se comparan modelos jerárquicos alternativos, las diferencias en el valor de la función objetivo se distribuyen aproximadamente en chi-cuadrado con n grados de libertad (n es la diferencia en el número o los parámetros entre el modelo completo y el reducido). Esta aproximación ha demostrado ser confiable para el método de estimación FOCE-INTERACTION (Wahlby *et al. J Pharmacokinet Pharmacodyn* 28:231 -52 (2001)). Para discriminar dos modelos jerárquicos, se usó una diferencia en una función objetiva de más de 7,9 (1 grado de libertad), que corresponde a un nivel de significación de $p < 0,005$.

La fracción de varianza interindividual (% de la varianza) se explica por las covariables en el modelo de regresión, para un determinado parámetros PK por ejemplo, CL) se calcula como sigue:

$$\% \text{ varianza} = \left(\frac{\omega_{CL,BASADA}^2 - \omega_{CL,FINAL}^2}{\omega_{CL,BASE}^2} \right) \times 100 \quad (3)$$

En la que $\omega_{CL,BASADA}^2$ y $\omega_{CL,FINAL}^2$ representó la varianza de aclaramiento entre individuos en el modelo PK basado y final, respectivamente.

Evaluación del modelo farmacocinético poblacional

La evaluación del modelo en este estudio utilizó una técnica de remuestreo de arranque para evaluar la estabilidad del modelo final y estimar el intervalo de confianza de los parámetros. Esta técnica de evaluación de modelos consiste en crear primero conjuntos de datos usando la opción de arranque en el paquete de software Wings por NONMEM™ (N Holford, Versión 404, junio de 2003, Auckland, Nueva Zelanda) y luego obtener estimaciones de parámetros para cada uno de los conjuntos de datos replicados. Se obtuvieron los resultados de 1000 ejecuciones exitosas, y la media y los percentiles 2,5° y 97,5° (que indican el intervalo de confianza del 95 %) para los parámetros de la población se determinaron y compararon con las estimaciones de los datos originales.

Además, se usaron verificaciones de modelos predictivos posteriores para evaluar la capacidad del modelo final para describir los datos observados (Yano *et al. J Pharmacokinet Pharmacodyn* 28:171-92 (2001); Gelman y Meng, Model checking and model improvement. en: Gilks WR, Richardson S, Spiegelhalter DJ, eds. *Markov Chain Monte Carlo in Practice*. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 189-202 (1996); Gelman *et al. Bayesian Data Analysis*. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC (2004). En estos análisis, los percentiles 2,5°, 5°, 10°, 25°, 50° (mediana), 75°, 90°, y 95° de los datos observados se calcularon y seleccionaron como estadísticas de prueba para la verificación del modelo predictivo posterior. El modelo PK de la población final, incluidos los parámetros finales fijos y de efectos aleatorios, se usó para simular 1000 repeticiones del conjunto de datos observados y se calcularon las estadísticas de prueba de cada uno de esos conjuntos de datos simulados. La distribución predictiva posterior de las estadísticas de prueba del conjunto de datos simulado se comparó con las estadísticas de prueba observadas, y el valor de p (p^{PPC}) se puede estimar calculando la proporción de casos en que las estadísticas de prueba del conjunto de datos simulados superan el valor realizado de las estadísticas de prueba observadas de acuerdo con la siguiente ecuación (Gelman y Meng, (1996) *supra*).

$$p^{PPC} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{1000} I(T(y_i^{rep}, \theta) \geq T(y, \theta_i)) \quad (1)$$

en la que $I(\cdot)$ es la función indicadora que toma el valor 1 cuando su argumento es verdadero y 0 en caso contrario.

- 5 $T(y, \theta)$ es un 'valor realizado' de las estadísticas de prueba observadas porque se realizad mediante los datos observados y . $T(y_i^{rep}, \theta)$ son las estadísticas de prueba de un conjunto de datos simulados (intervalo de 1 a 1000) (Gelman and Meng, (1996) *supra*).

- 10 Además, los cuantiles 2,5°, 5°, 95°, y 97,5° de los datos simulados se calcularon para cada punto de tiempo para los pacientes individuales. Se determinaron los números de los datos observados que pertenecían a los límites de los cuantiles 2,5° y 95,5° (intervalo del 95 %) y los cuantiles 5° y 95° (intervalo del 90 %) de los datos simulados agrupados.

Exposición a pertuzumab después de la dosificación fija, basada en el peso y en BSA

- 15 El modelo PK poblacional final se usó para determinar las concentraciones valle en estado estacionario y la exposición después de la dosificación fija, basada en el peso y basada en ASC. Los perfiles de concentración y tiempo de suero y el aclaramiento de pertuzumab para 1000 sujetos se simularon para una pauta posológica fija, basada en ASC o basada en el peso, usando el modelo final con un conjunto de datos obtenido por arranque (con reemplazo) del conjunto de datos PK original. Todos los sujetos simulados recibieron una infusión iv de 840 mg, 12,2 mg/kg o 485 mg/m² durante 90 días el día 0, luego una infusión iv de 420 mg, 6,1 mg/kg o 242,5 mg/m² durante 30 minutos en los días 21, 42 y 63. Las concentraciones valle en estado estacionario obtenidas en día 84 $C_{ee, valle}$ después de diferentes pautas posológicas fueron evaluadas. Además, se calculó el porcentaje de sujetos con concentraciones valle en estado estacionario por debajo de una concentración objetivo (20 mcg/ml) después de una
- 25 dosis fija, basada en ASC o basada en peso. Se usaron valores de aclaramiento simulados para determinar la exposición media en estado estacionario ($ABC_{ee, 0-\tau}$) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$ABC_{ee, 0-\tau} = \frac{Dosis}{CL} \quad (4)$$

30 RESULTADOS

Datos demográficos. Las características demográficas de los pacientes incluidos en este análisis de PK se enumeran en la tabla 2.

35

Tabla 2. Características demográficas de los pacientes incluidos en el análisis

	Mediana	Intervalo
Edad (años)	56,0	32,0 - 78,0
ASC* (m ²)	1,73	1,40 - 2,53
Peso (kg)	69,0	45,0 - 150,6
Albúmina (g/l)	39,2	21,0 - 52,0
Fosfatasa alcalina (ALK) (IU/l)	107,0	39,0 - 367,0
	Número de pacientes	%
Género		
Hombre	8	5,2
Mujer	145	94,8
Raza		
Caucásica	141	92,2
Afroamericana	3	2,0
Hispana	4	2,6
Asiática	3	2,0
Indionativo	0	0
Otras	2	1,3

*ASC, área de la superficial corporal.

- 40 Un total de 1458 puntos de tiempo de concentración de pertuzumab en suero se recolectaron de 153 pacientes en los tres estudios. Del total, 18 pacientes fueron del ensayo de fase Ia, 60 del ensayo de cáncer de ovario de fase II y 75 del ensayo de cáncer de mama de fase II. Por lo tanto, la mayoría (94,8 %) de los pacientes en este análisis eran mujeres y representaron 1110 (76 %) de los datos de concentración de pertuzumab en suero. Todos los sujetos tenían un tumor de expresión de HER2 bajo confirmado por análisis FISH (hibridación de fluorescencia *in situ*) y

tenían un buen estado físico funcional como lo indica un estado de rendimiento de ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) de 0 o 1. El número de pacientes con covariables faltantes fue muy bajo (4,6 % para la altura y ASC) y el número faltante de las covariables fueron imputados con los valores medianos. En 384 (20,8 %) muestras de concentración sérica de pertuzumab con solo una fecha de muestreo documentada, el tiempo de muestreo se imputó a las 12 del mediodía. Un análisis de sensibilidad realizado para evaluar los efectos de estos tiempos imputados en las estimaciones de los parámetros de la población en el modelo no puso de manifiesto ninguna influencia significativa.

Análisis de la población PK. Un modelo de dos compartimentos describió los datos mejor que un modelo de un compartimento basado en el cambio de la función objetivo ($\delta = -736,2$) y las gráficas de diagnóstico. Un perfil representativo de la concentración sérica de pertuzumab en tiempo ajustado a un modelo de uno y dos compartimentos se ilustra en las figuras 9A-B. El término de variabilidad interindividual (η) de K12 se eliminó de los modelos de dos compartimentos ya que la eliminación de este término η no produjo un aumento estadísticamente significativo ($\delta < 7,88$) en la función objetivo. Por lo tanto, solo η_{CL} , η_{Vc} y η_{K21} se mantuvieron en el modelo base final.

El efecto de la presencia de un término de covarianza entre η_{CL} , η_{Vc} y η_{K21} se evaluó a continuación. La incorporación de términos de covarianza entre η_{CL} , η_{Vc} y η_{K21} mejoró el ajuste ($\delta = -23,2$, $df=3$). Sin embargo, se encontró que los términos de covarianza eran poco estimados (% CV > 100), tienen una pequeña correlación estimada ($r_{CL-Vc}=0,37$; $r_{CL-K21}=0,27$; $r_{Vc-K21}=0,42$), y tienen poca influencia en las estimaciones de parámetros (datos no mostrados). Por lo tanto, los términos de covarianza no se mantuvieron para la construcción del modelo de efecto covariable. En un análisis exploratorio que usa el modelo base final, no hay relaciones aparentes entre covariables potenciales y se identificaron η_{K21} . Por lo tanto, el efecto covariables sobre η_{K21} no se examinó durante el desarrollo del modelo final con covariables.

Para el modelo final con covariables, las gráficas de concentración de suero de pertuzumab previstas versus las observadas y las gráficas de concentración de suero previstas versus ponderadas residuales se muestran en las figs. 10A-B. En el modelo final, la albúmina sérica (ALB), el peso corporal (PC) y la fosfatasa alcalina sérica (ALKP) fueron las covariables más significativas que explican la variabilidad interindividual para el aclaramiento de pertuzumab (CL). ASC fue la covariable más importante que explica la variabilidad interindividual del volumen de distribución (Vc) del compartimento central de pertuzumab. La incorporación de los términos de covarianza entre η_{CL} , η_{Vc} y η_{K21} mejoró el ajuste ($\delta = -14,0$, $df=3$). Sin embargo, la correlación estimada no fue grande ($r_{CL-Vc}=0,45$; $r_{CL-K21}=0,28$; $r_{Vc-K21}=0,39$), y las estimaciones de los parámetros no se vieron influenciadas (datos no mostrados). Por lo tanto, los términos de covarianza no se incluyeron en el modelo final. El modelo final fue ilustrado de la siguiente manera:

$$CL = \theta_{CL} \times \left(\frac{PC}{69}\right)^{\theta_{PC_CL}} \times \left(\frac{ALB}{39,2}\right)^{\theta_{ALB_CL}} \times \left(\frac{ALKP}{107}\right)^{\theta_{ALKP_CL}} \quad (4)$$

$$Vc = \theta_{Vc} \times \left(\frac{ASC}{1,72}\right)^{\theta_{ASC_Vc}} \quad (5)$$

Las estimaciones de los parámetros del modelo final se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Estimaciones de los parámetros del modelo farmacocinético de la población final y la estabilidad de los parámetros mediante un procedimiento de validación de arranque

	Conjunto de datos originales	1000 réplicas de arranque
	Estimado (%EER) ^a	Media (95 % CI)
Modelo estructural		
CL (l/día)	0,214 (3,1)	0,214 (0,201, 0,228)
Vc (l)	2,740 (1,9)	2.739 (2.640, 2.840)
K12 (día ⁻¹)	0,203 (16,6)	0.220 (0.159, 0.416)
K21 (día ⁻¹)	0,258 (15,6)	0,275 (0,203, 0,480)
Variabilidad interindividual		
CL %CV	31,1 (11,0)	30.6 (27.0, 34.1)
Vc %CV	16,2 (20,3)	16,0 (12,7, 19,2)
K ₂₁ %CV	25,2 (37,6)	24,1 (11,4, 33,6)
Modelo covariable		
ALB en CL (θ_{ALB_CL})	-1,010 (18,4)	-1,019 (-1,420, -0,632)
PC en CL (θ_{WT_CL})	0,587 (19,3)	0.589 (0.372, 0.826)
ALKP en CL (θ_{ALKP_Vc})	0,169 (29,5)	0.170 (0.067, 0.258)
ASC en Vc (θ_{BSA_Vc})	1,160 (12,2)	1.151 (0.890, 1.451)
Variabilidad residual		

Error proporcional σ^2_{prop}	0,037 (19,4)	0.037 (0.030, 0.045)
Error aditivo, σ_{prop}, mg/ ml	2,265 (77,8)	2.24 (0.002, 4.160)
a. % EER: porcentaje de error estándar relativo de la estimación = EE/estimación del parámetro x 100		

El CL de pertuzumab sérico en la población de análisis se estimó en 0,214 l/día y el Vc fue de 2,74 l. La K_{12} y K_{21} fueron de 0,203 y 0,258 días⁻¹, respectivamente. La variabilidad interindividual para CL y Vc en el modelo final, calculados como la raíz cuadrada de la varianza interindividual (ω^2) y expresados como % CV, son 31,1 % y 16,2 %, respectivamente, en comparación con 38,0 % y 20,8 % para el modelo base sin covariables. El efecto covariable de ALB, PC y ALKP en el modelo final, por lo tanto, explicó aproximadamente el 33 % de la varianza interindividual para CL. Sin embargo, el peso solo explicó solo el 8,3 % de la variabilidad entre pacientes para la CL. El efecto covariable de ASC explicó aproximadamente el 39 % de la varianza interindividual para Vc en el modelo final. La dependencia de CL en PC y Vc en ASC con el modelo base se explica el modelo final como se muestra en las fig. 11 A-B. Los valores estimados de $t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$ fueron de 1,4 y 17,2 días, respectivamente.

Evaluación del modelo. A partir del conjunto de datos original, se obtuvieron 1000 ejecuciones de arranque exitosas y se compararon con los datos observados originales. Las estimaciones de PK de la población media obtenidas del procedimiento de arranque fueron similares a las estimaciones de parámetros del conjunto de datos original (Tabla 3), lo que indica que el modelo desarrollado fue estable. Los intervalos de confianza del 95 % para los parámetros de efectos fijos fueron estrechos, lo que indica una buena precisión.

Se usó una verificación del modelo predictivo posterior para evaluar la capacidad del modelo final para describir los datos observados. El modelo farmacocinético final de la población, incluidos los parámetros finales fijos y de efectos aleatorios, se usó para simular 1000 repeticiones. Las estadísticas de prueba se calcularon luego para cada uno de esos 1000 conjuntos de datos simulados. Las figuras 12A-F muestran los histogramas de los 1000 valores simulados de las estadísticas de prueba seleccionadas, con el "valor realizado" de las estadísticas de prueba observadas indicadas por una línea vertical. Las distribuciones predictivas posteriores fueron cercanas a los valores observados con los valores de p estimados mayores a 0,05 para cada estadística de prueba. Además, los porcentajes de concentraciones observadas de pertuzumab dentro del intervalo de cuantiles del 90 % y 95 % de los datos simulados agrupados fueron 89,3 y 94,7 %, respectivamente. Estos resultados sugirieron que el modelo fue capaz de describir y predecir los datos razonablemente bien.

Exposición a pertuzumab después de la dosificación fija, basada en el peso y en ASC.

Las concentraciones séricas valle de pertuzumab previstas en el día 84 ($C_{ee, valle}$) se estimaron para 1000 sujetos simulados retirados del conjunto de datos originales de PK y el modelo final usando una dosis fija, basada en peso o basada en ASC de acuerdo con los esquemas de dosis esbozados en la sección de métodos. Estos datos mostraron que con la dosis basada en el peso y basada en ASC, la variabilidad de la población de $C_{ee, valle}$ disminuyó en 6,17 y 5,76 %, respectivamente, cuando se comparó con la dosificación fija (Fig 13 y tabla 4).

Tabla 4.

Concentración valle en estado estacionario de pertuzumab previsto (día 84) después de una dosis fija, en peso o basada en ASC para 1000 sujetos simulados retirados del conjunto de datos originales de PK de acuerdo con el modelo final			
	C_{ee} valle (mcg/ml) dosis fija	C_{ee} valle (mcg/ml) dosis basada en el peso	C_{ee} valle (mcg/ml) dosis basada en ASC
Mínimo	2,68	2,39	2,54
5º percentil	16,56	16,32	16,86
Mediana	51,87	51,81	52,48
Media	56,37	56,08	56,44
95º percentil	115,38	110,46	112,14
Máximo	209,67	179,06	192,00
% CV	54,05	52,62	52,40
Varianza	928,21	870,93	874,71
% Cambio de varianza con respecto a la dosis fija ^a	-	-6,17	-5,76
Porcentaje de sujetos con $C_{ee, valle} \leq 20$ mcg/ml	8,3	8,7	8,3

^a Se calculó un cambio de varianza porcentual con respecto a la dosis fija usando la siguiente ecuación:

$$\text{Cambio de varianza porcentual} = \frac{\text{Varianza}_{\text{basada en PC o en ASC}} - \text{Varianza}_{\text{dosis fija}}}{\text{Varianza}_{\text{dosis fija}}} \times 100$$

El porcentaje de sujetos con $C_{ee\text{ valle}}$ por debajo de la concentración sérica objetivo de 20 mcg/ml fue similar, con valores de 8,3 %, 8,7 %, y 8,3 % para dosificación fija, basada en peso o basada en ASC, respectivamente (Tabla 4). Se obtuvieron resultados similares a partir del análisis de suero pertuzumab en estado estacionario ABC_{ee0-T} para 1000 sujetos simulados, y la dosificación basada en peso y basada en ASC solo redujeron la variabilidad de la población en 2,2 % y 4,2 %, respectivamente, en comparación con la dosificación fija. Se usó el mismo conjunto de datos simulados para determinar $C_{ee\text{ valle}}$, después de una dosis fija, una dosis basada en peso y una dosis basada en ASC para poblaciones con peso extremo (es decir, $PC \leq 10^o$ y $\geq 90^o$ percentil) (Figs. 14A-B). La mediana de la $C_{ee\text{ valle}}$ de pertuzumab para la población con, PC menor o igual a 10^o percentil fue de 72,3 (intervalo: 8,7 a 166,5), 52,8 (intervalo: 6,8 a 125,7) y 63,2 (intervalo: 7,8 a 150,1) mcg/ml para una dosis fija, una dosis basada en peso y una dosis basada en ASC, respectivamente. El porcentaje de sujetos en la población con $C_{ee\text{ valle}}$ por debajo de la concentración sérica objetivo de 20 mcg/ml fue 5,4 %, 12,6 %, y 9,0 % para dosificaciones fijas, basadas en peso y basadas en ASC, respectivamente. La mediana de la $C_{ee\text{ valle}}$ de pertuzumab para la población con PC mayor o igual que 90^o percentil fue de 42,1 (intervalo: 7,0a 119,8), 62,8 (intervalo: 14,4 a 167,3) y 52,9 (intervalo: 10,2 a 133,3) mcg/ml para una dosis fija, una dosis basada en peso y una dosis basada en ASC, respectivamente. Los porcentajes de sujetos en esta población con $C_{ee\text{ valle}}$ por debajo de la concentración sérica objetivo de 20 mcg/ml fueron similares, con valores de 7,4 %, 2,8 %, y 5,6 % para dosificación fija, basada en peso o basada en ASC, respectivamente. Se obtuvieron resultados similares a partir del análisis de suero pertuzumab en estado estacionario ABC_{ee0-T} de estos subgrupos de 1000 sujetos simulados.

ANÁLISIS

Normalmente, los anticuerpos monoclonales IgG humanizados y los fármacos citotóxicos de molécula pequeña en oncología se han administrado en bases de dosis basadas en peso (mg/kg) o basadas en ASC. Pertuzumab se ha sometido a pruebas en la clínica con un ensayo de fase I en pacientes con cánceres avanzados y en ensayos de fase II en pacientes con cáncer de ovario, mama, pulmón y próstata. Pertuzumab se administró en una base de peso (mg/kg) en un ensayo de fase I, y luego se inició con una dosis fija en ensayos de fase II. Mediante el uso de los datos demográficos y de concentración de pertuzumab en suero recolectados en estos tres ensayos, se construyó un modelo de PK poblacional con covariables predictivas para el pertuzumab PK. Este modelo se usó luego para examinar las concentraciones en estado estacionario después de los métodos de dosificación fija, dosificación basada en peso y dosificación basada en ASC.

El pertuzumab PK obtenido a partir de este análisis fue muy similar a los presentados para otros fármacos IgG1 monoclonales humanizados usados en oncología (Harris *et al. Proc Am Soc Clin Oncol* 21:488a (2002); Leyland-Jones *et al. J Clin Oncol* 21:3965-71 (2003); y Lu *et al. Clin Pharmacol Ther* 75:91 (2004)).

Un modelo PK lineal de 2 compartimentos lineales describe mejor los datos y, en el modelo final, pertuzumab CL fue de 0,214 l/día. El V_c típico de pertuzumab fue de 2,74 l o aproximadamente 40 ml/kg, que es igual al volumen de plasma humano y fue uniforme con los valores presentados para otros fármacos IgG1 monoclonales (Harris *et al.* (2002), *supra*; y Lu *et al.* (2004), *supra*). Pertuzumab CL se vio significativamente afectado por el peso corporal y las concentraciones séricas de albúmina y fosfatasa alcalina, mientras que V_c estuvo significativamente influenciado por ASC. El efecto del género en la pertuzumab PK no puede evaluarse debido a la pequeña cantidad de sujetos masculinos (5,2 %) incluidos en el análisis. Los resultados de un procedimiento de arranque y la verificación del modelo posterior sugirieron que el modelo final era estable y capaz de describir y predecir los datos razonablemente bien.

El efecto del peso en CL y ASC en V_c sugirió que pertuzumab podría administrarse según el peso corporal o ASC. Sin embargo, el efecto covariable del peso solo y ASC solo en el modelo solo explicó aproximadamente el 8,3 % y el 40 % del efecto interindividual de CL y V_c , respectivamente. Esto sugirió que si bien el peso es un predictor de CL y ASC es un predictor de V_c , el efecto del peso y ASC en las exposiciones a pertuzumab después de la dosificación puede ser medible pero no altamente contributivo.

Por lo tanto, la siguiente etapa evaluó el impacto de los diversos métodos de dosificación en las exposiciones a pertuzumab usando simulaciones. En 1000 sujetos a los que se les retiró del conjunto de datos original, se encontró que la dosificación basada en peso o basada en ASC disminuía la variabilidad poblacional de las concentraciones séricas valle en estado estacionario simuladas en el día 84 en solo 6,2 y 5,8 %, respectivamente, en comparación con la dosificación fija. Además, los porcentajes de sujetos con concentraciones séricas valle previstas por debajo de un objetivo seleccionado de 20 mcg/ml fueron similares con los tres métodos de dosificación. Se obtuvieron resultados similares a partir del análisis de subgrupos de la población con el peso corporal extremo (es decir, $PC \leq 10^o$ y $\geq 90^o$ percentil).

Por lo tanto, se concluye que pertuzumab PK está relacionado con PC y ASC. Sin embargo, PC y ASC explicaron solo un pequeño porcentaje de la variabilidad interindividual de CL y V_c , y la dosis basada en PC y ASC no parece mejorar la previsibilidad de las exposiciones en estado estacionario de pertuzumab. Se recomienda aplicar pautas de dosificación fijas para pertuzumab en pacientes con cáncer.

Se cree que la presente invención representa la primera divulgación de una evaluación crítica del impacto de la dosificación basada en peso o basada en ASC de un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado en las concentraciones de fármacos en estado estacionario en pacientes con cáncer. La implementación de la dosis fija tiene varias implicaciones económicas y de cuidado importantes para el paciente: i) costos más bajos debido a una mayor eficiencia en la fabricación, almacenamiento y envío de una dosis unitaria individual, ii) preparación eficiente de una dosis unitaria en farmacias y hospitales sin la necesidad de individualización del paciente, iii) mayor eficiencia en la prescripción médica de una dosis unitaria individual, y iv) menor probabilidad de que el paciente reciba una dosis incorrecta debido a errores de cálculo de la dosis. Aunque los anticuerpos humanizados se dosifican normalmente en peso o ASC, los análisis del presente documento demuestran la viabilidad de administrar el anticuerpo pertuzumab contra HER usando una dosis fija en pacientes con cáncer.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Pertuzumab para su uso en un método de tratamiento del cáncer de mama metastático en un paciente humano, comprendiendo el método administrar dosis fijas de pertuzumab al paciente, en donde se administra una dosis de carga de 840 mg seguida de dosis de mantenimiento de 420 mg, en donde las dosis de mantenimiento se administran cada 3 semanas.
- 10 2. Pertuzumab para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende además administrar trastuzumab al paciente.

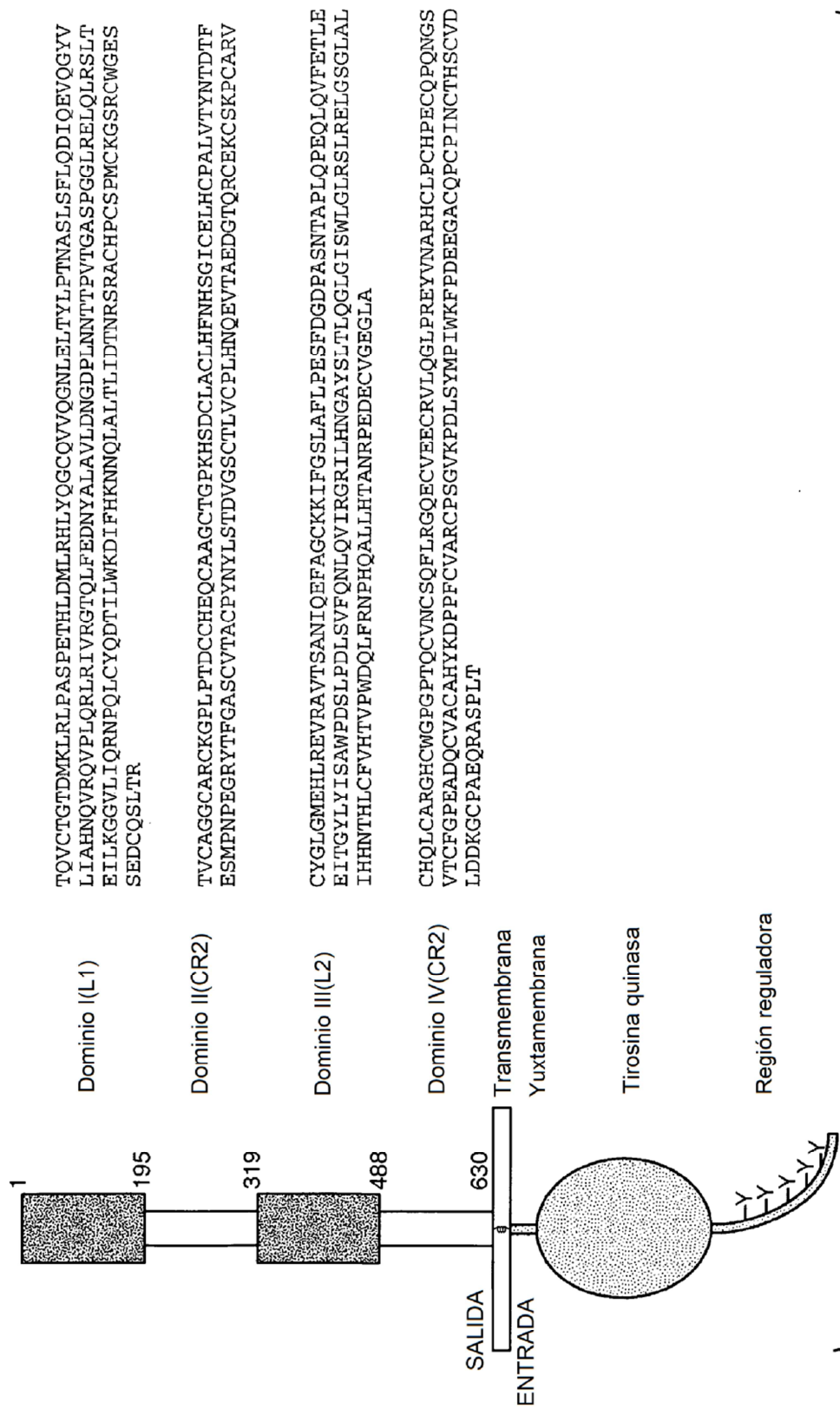


FIG._1

VARIABLE LIGERA

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQRP	
	** **** *	*		*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQKP	
		* ** ***		
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQKP	
	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA		
	** *	* *	*	**
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	* *****			
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	90	100		
2C4	EDLAVYYC [QQYIYPYT]	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:1)		
	* *	* *		
574	EDFATYYC [QQYIYPYT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:3)		
	*** *			
hum κI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:5)		

FIG._2A

VARIABLE PESADA

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	** ** * **** *		**	
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		** * *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM		
	* * **	*** *	***** *	
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	***** * **** *			
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL		
	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:2)	
	*** **		**	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:4)	

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:6)	

FIG._2B

Secuencia de aminoácidos para la cadena ligera de pertuzumab

1 10 20 30 40 50 60
 | | | | | | | |
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQDV**SIGVAWYQQKPGKAPKLLIYS**ASYRYT**GVPS
 | | | | | | | |
 70 80 90 100 110 120
 | | | | | | | |
 RFSGSGSGTDFTLTIS**SLQ**PEDFATYYC**QQY**YI**YPY**TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 | | | | | | | |
 130 140 150 160 170 180
 | | | | | | | |
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFY**P**REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLS**S**STLT
 | | | | | | | |
 190 200 210
 | | | |
 LSKADY**E**KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG._3A**Secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de pertuzumab**

1 10 20 30 40 50 60
 | | | | | | | |
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFTD**YTM**D**WVRQAPGKGLEWV**ADVN**PN**SGGSIY**
 | | | | | | | |
 70 80 90 100 110 120
 | | | | | | | |
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQ**MNS**LRAEDTAVYYCARN**LGPSFYFDY**WGQGLTVTVSSA
 | | | | | | | |
 130 140 150 160 170 180
 | | | | | | | |
 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 | | | | | | | |
 190 200 210 220 230 240
 | | | | | | | |
 LYSLS**SSV**TVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 | | | | | | | |
 250 260 270 280 290 300
 | | | | | | | |
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 | | | | | | | |
 310 320 330 340 350 360
 | | | | | | | |
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 | | | | | | | |
 370 380 390 400 410 420
 | | | | | | | |
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 | | | | | | | |
 430 440 448
 | | | |
 QGNVFSCSV**M**HEALHNHYTQKSLSLSPG

FIG._3B

EGFR activado por ligando se heterodimeriza con HER2. 2C4 se une al sitio de union heterodimérico

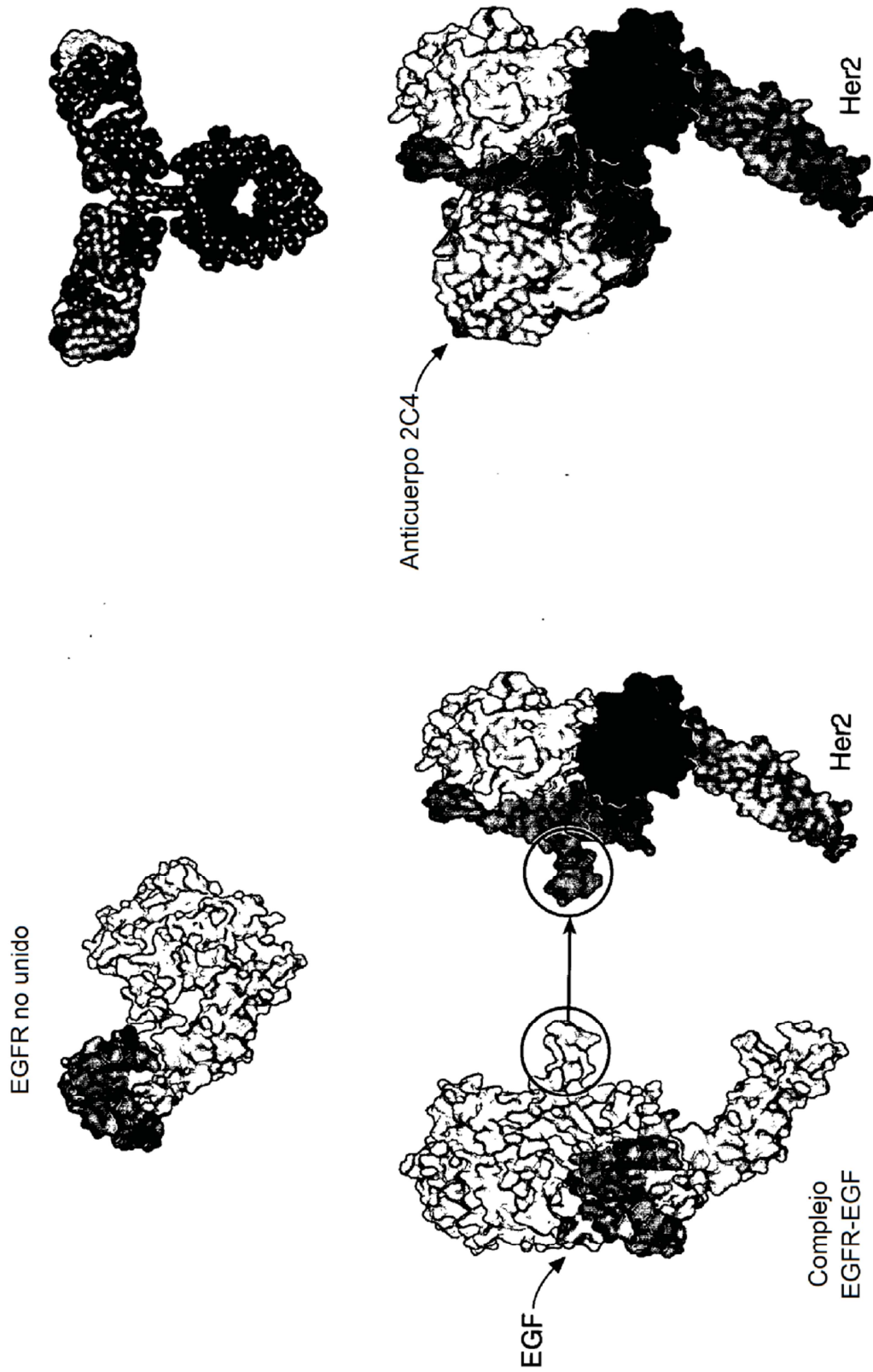


FIG._4

Acoplamiento de HER2/3 con las rutas de MAPK y Akt

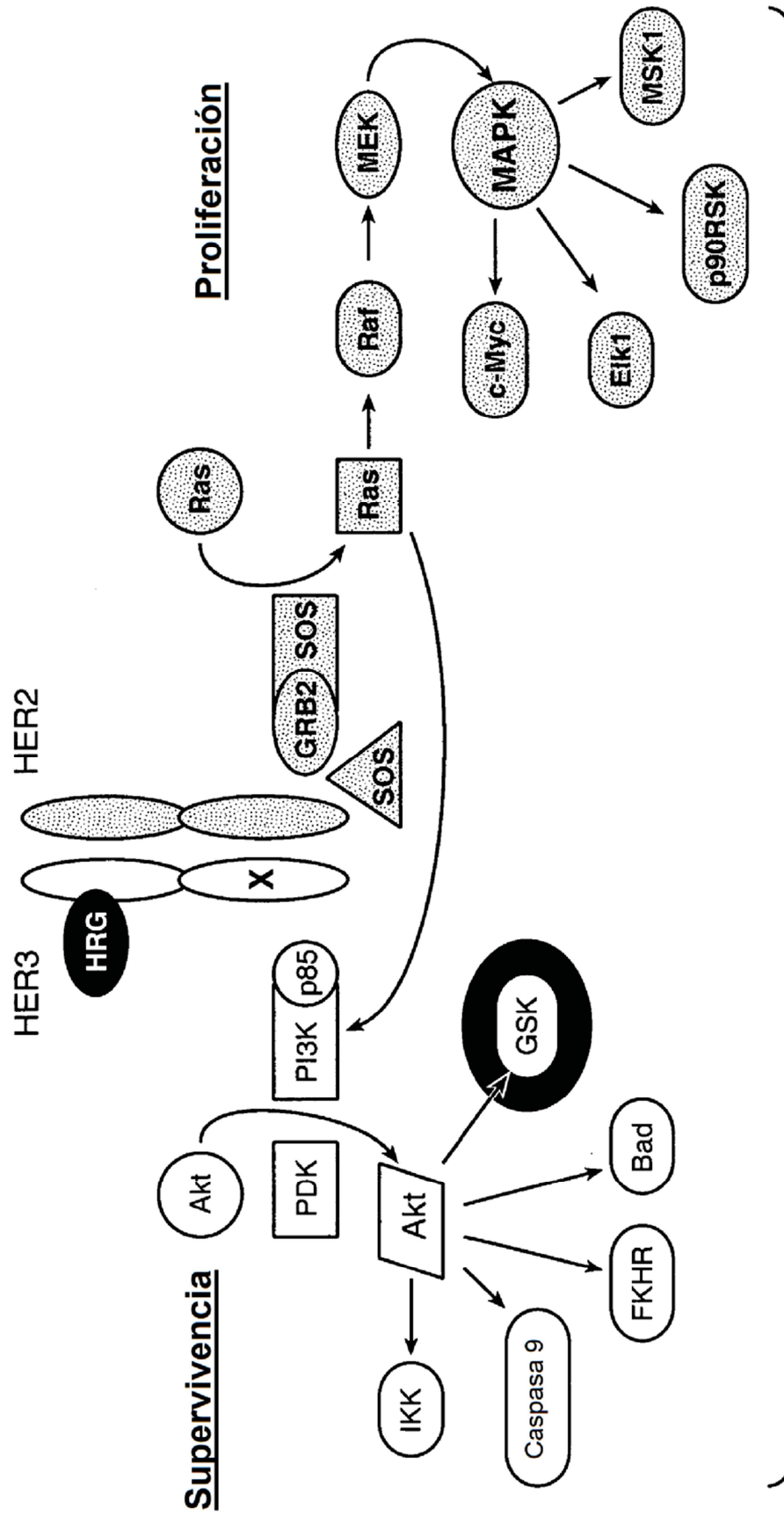


FIG._5

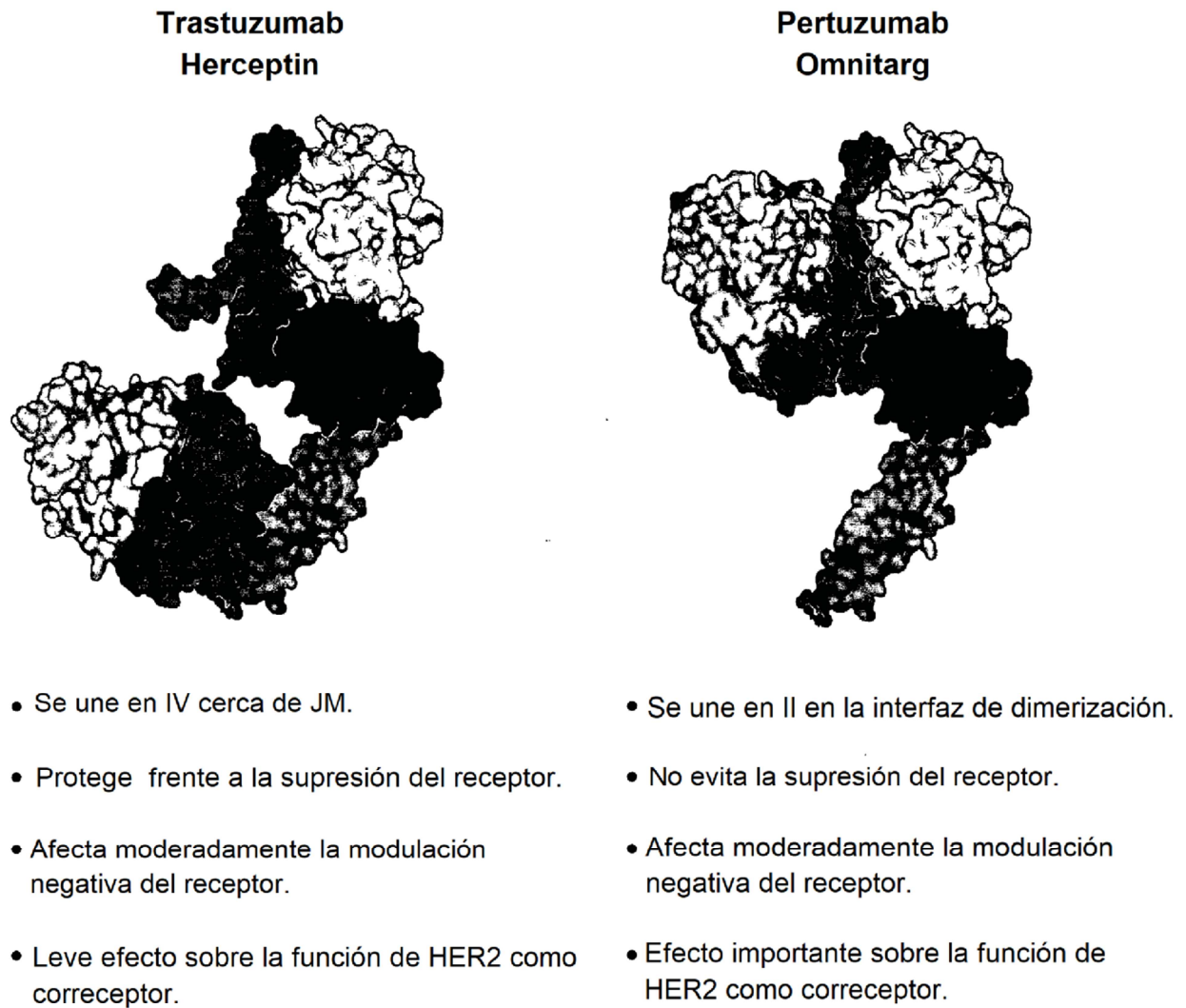


FIG._6

CADENA LIGERA

```

1  D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K      45
    15 30
46 L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q      90
    60 75
91 H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L      135
    105 120
136 L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T      180
    150 165
181 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C      210 214
    195

```

FIG._7A

CADENA PESADA

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNIKDTYIHWVRQAPGKGL 45
 46 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AED 90
 91 TAVYYCSRWG G DGFYAMDYWGQGT LVT VSSASTKGP SVFP LAPS S 135
 136 KSTSGGTAA L GCLV K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S 180
 181 GLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKV E P K S C D K 225
 226 THTCPPCPAPELLGGP SV F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S 270
 271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHN A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D 315
 316 W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E 360
 361 M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G 405
 406 S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G 449

FIG._7B

1 V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K 45
 46 A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y 90
 91 C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P S D E Q L K S G T A S V 135
 136 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S 180
 181 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C 217

FIG._8A

1 E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L 45
 46 E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D 90
 91 T A V Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K 135
 136 S T S G G T A A L G C L V K D Y F F E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G 180
 181 L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T 225
 226 H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S H 270
 271 E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W 315
 316 L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M 360
 361 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S 405
 406 F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K 449

FIG._8B

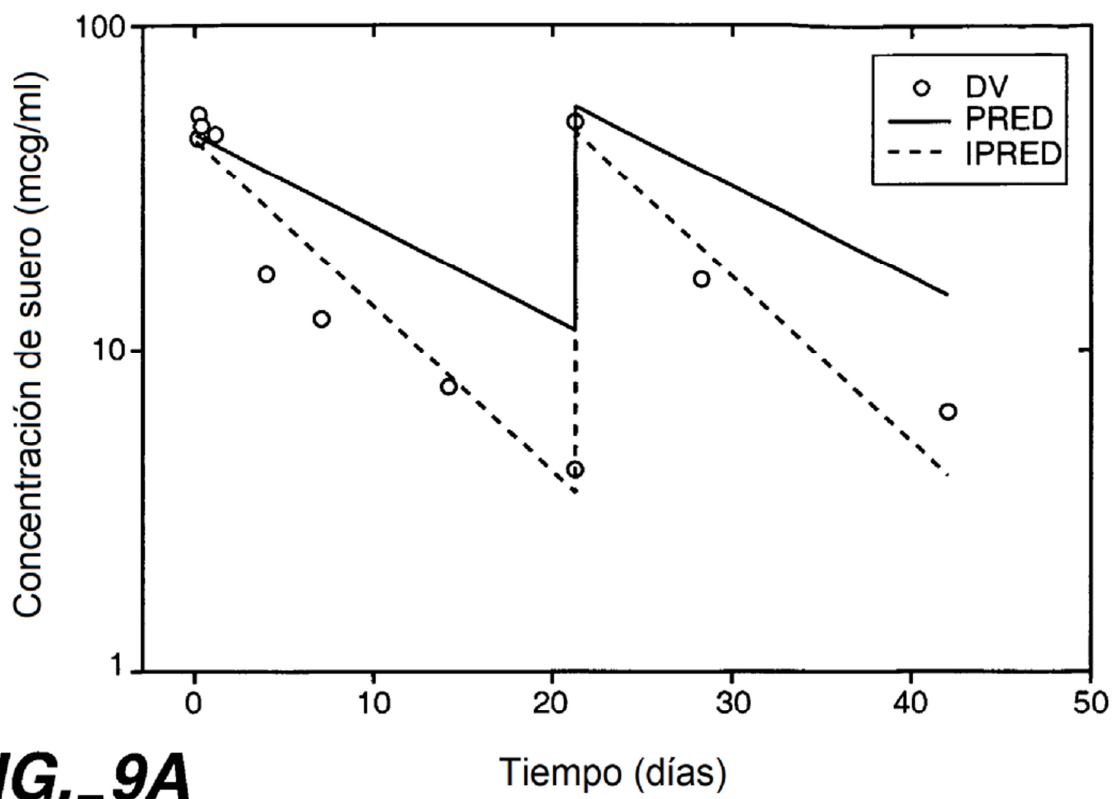


FIG._9A

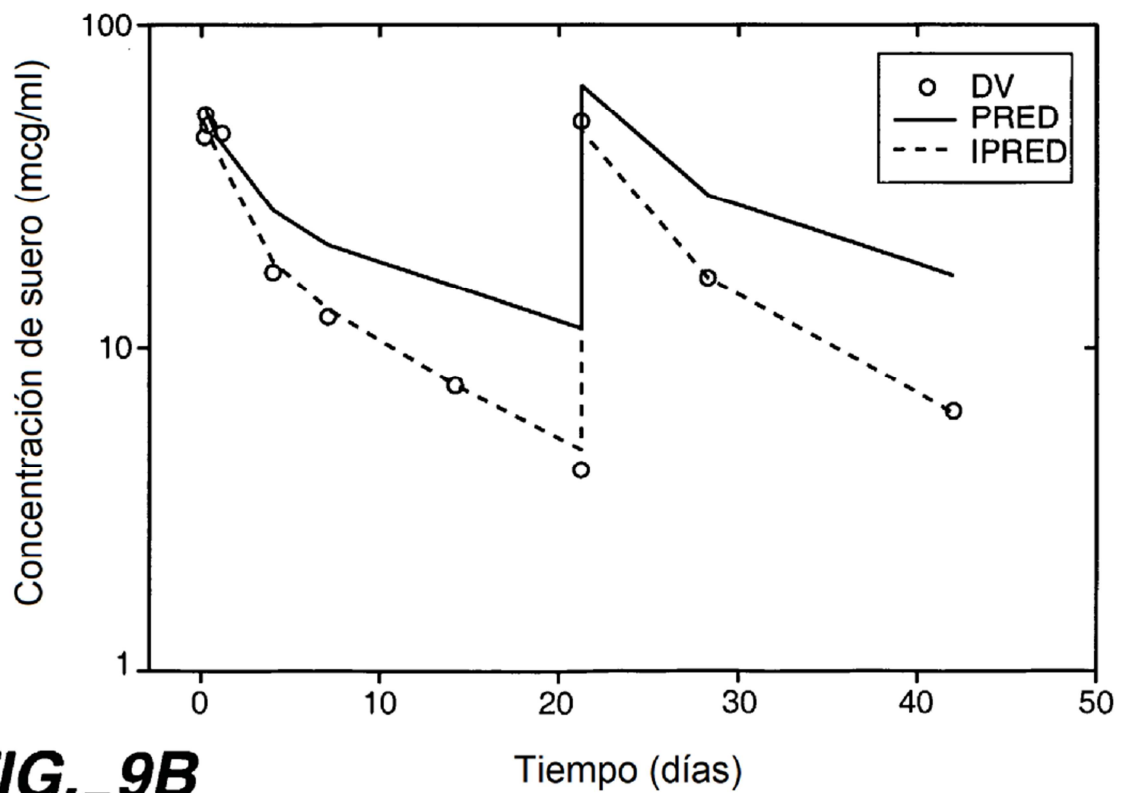
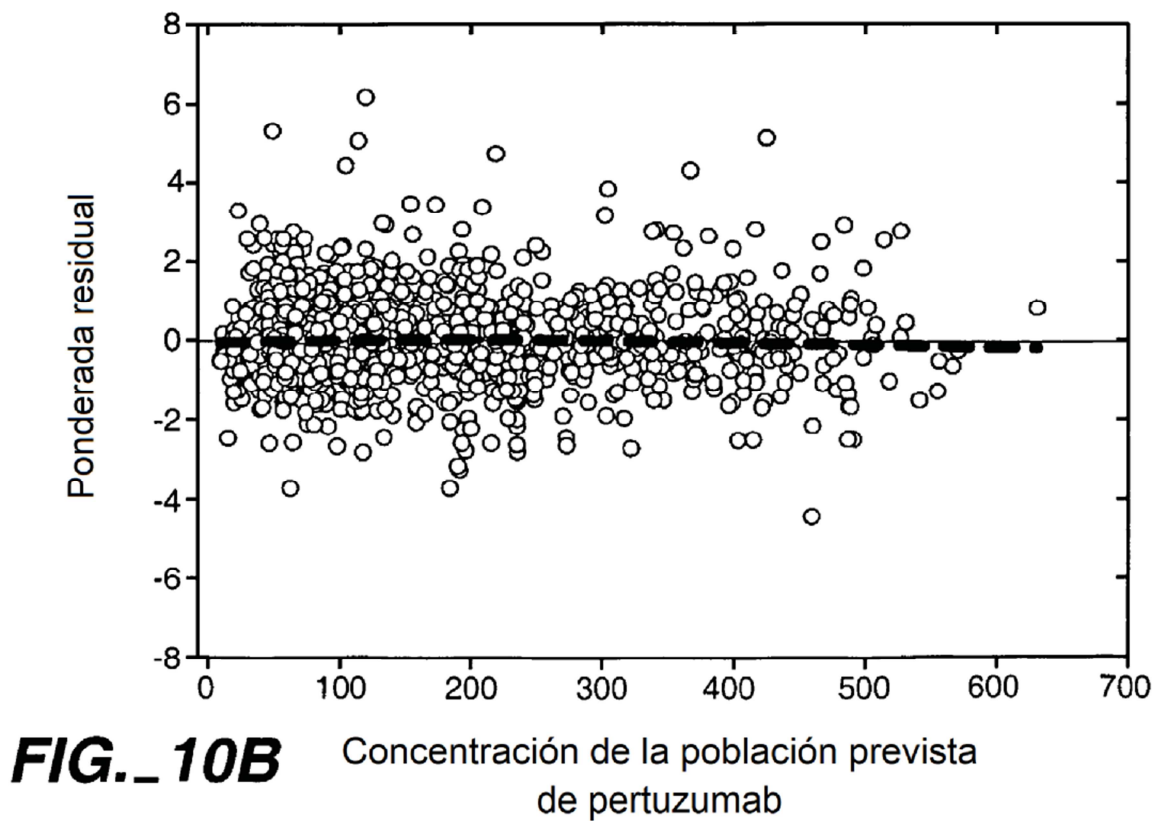
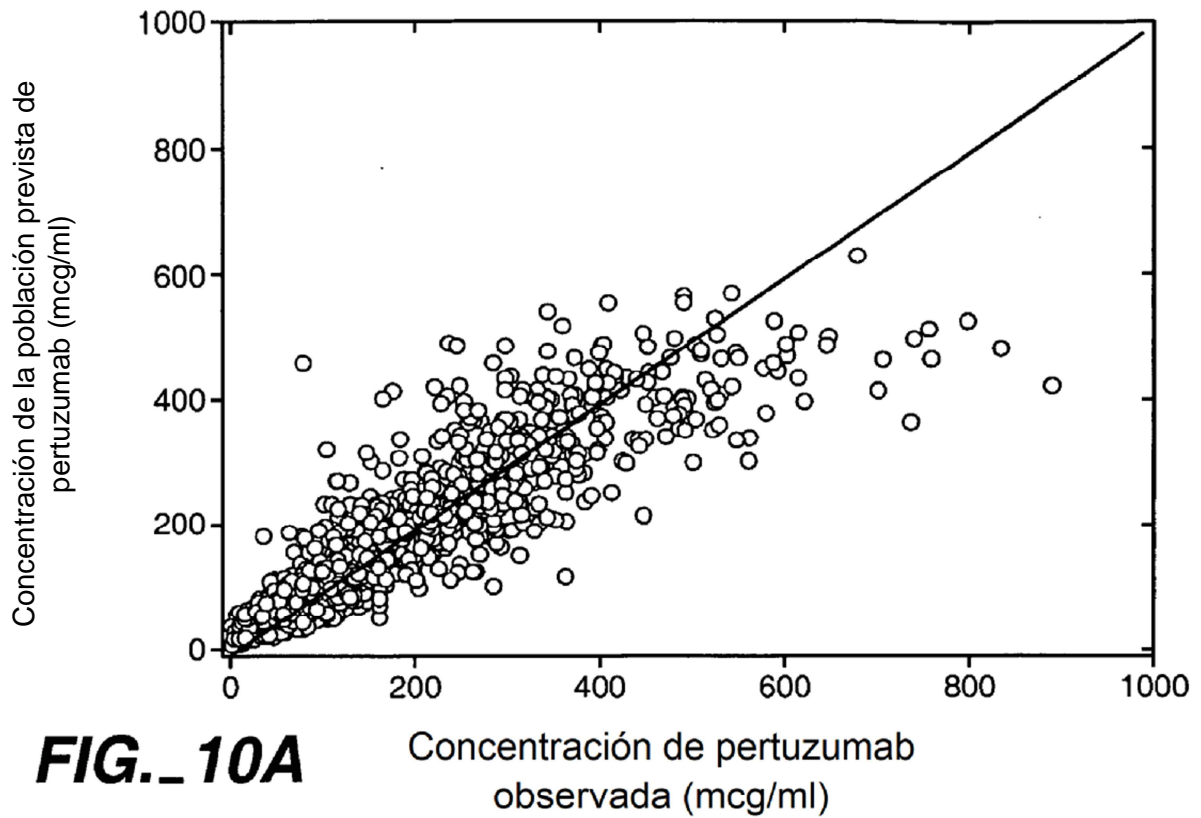


FIG._9B



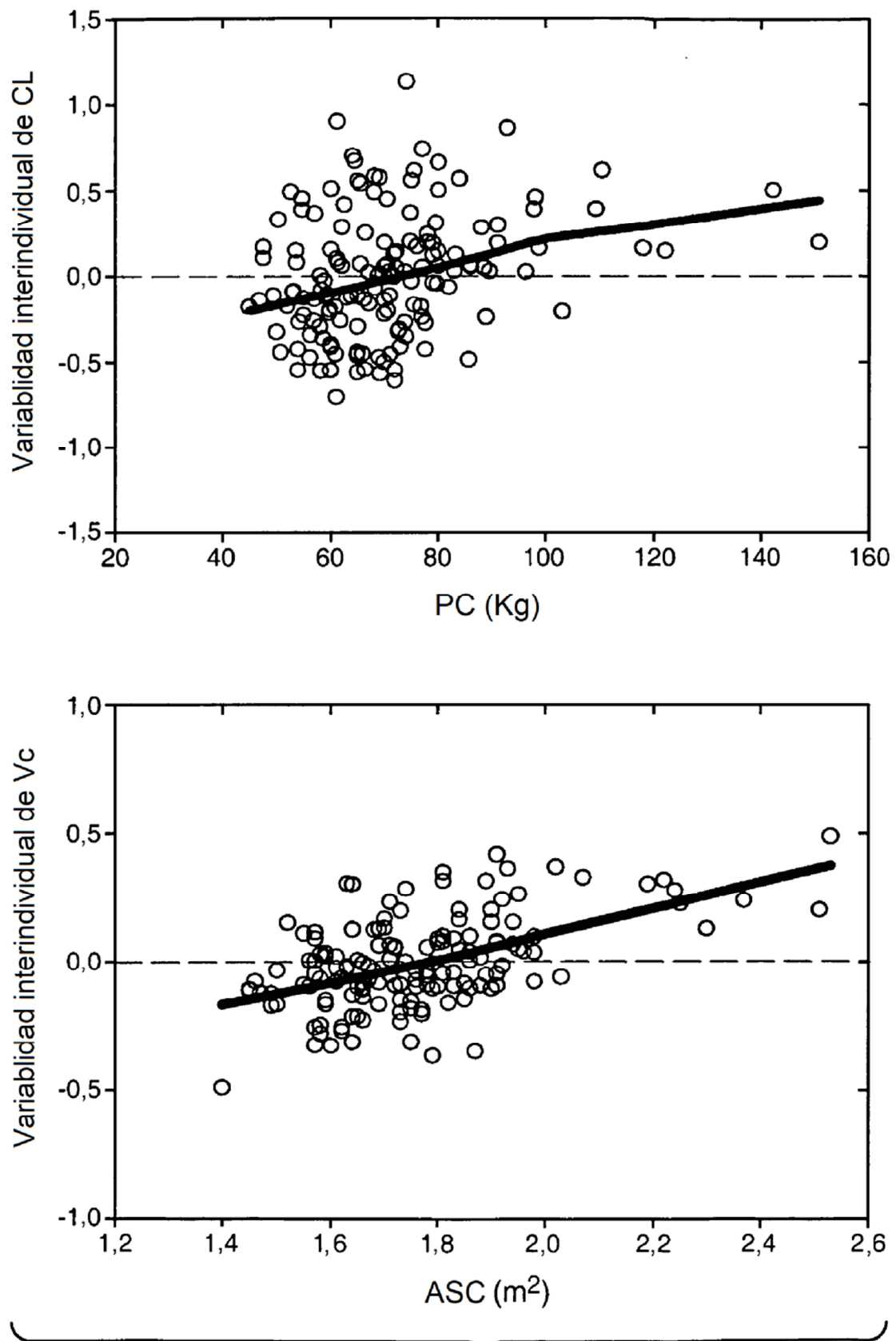


FIG._11A

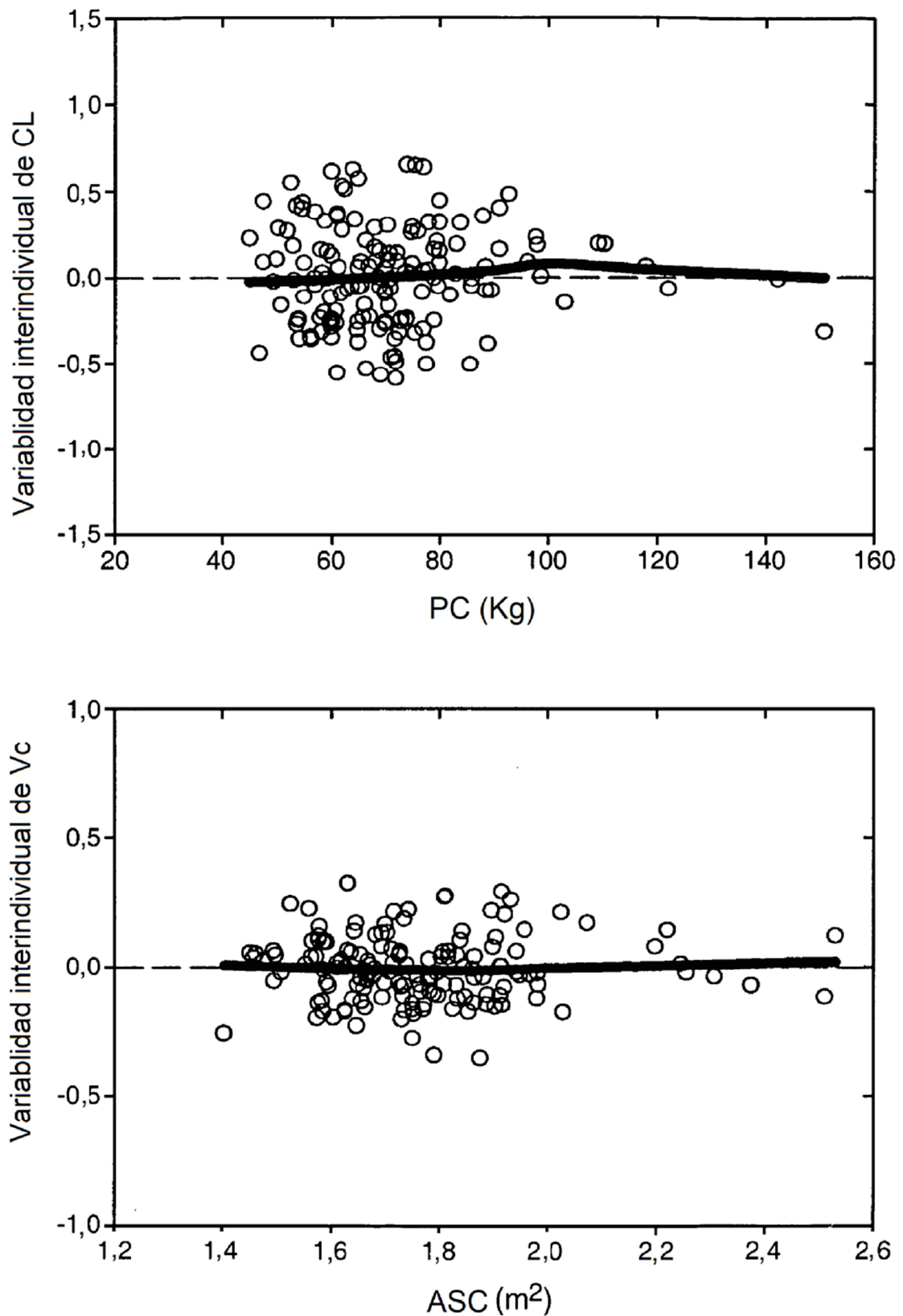


FIG._11B

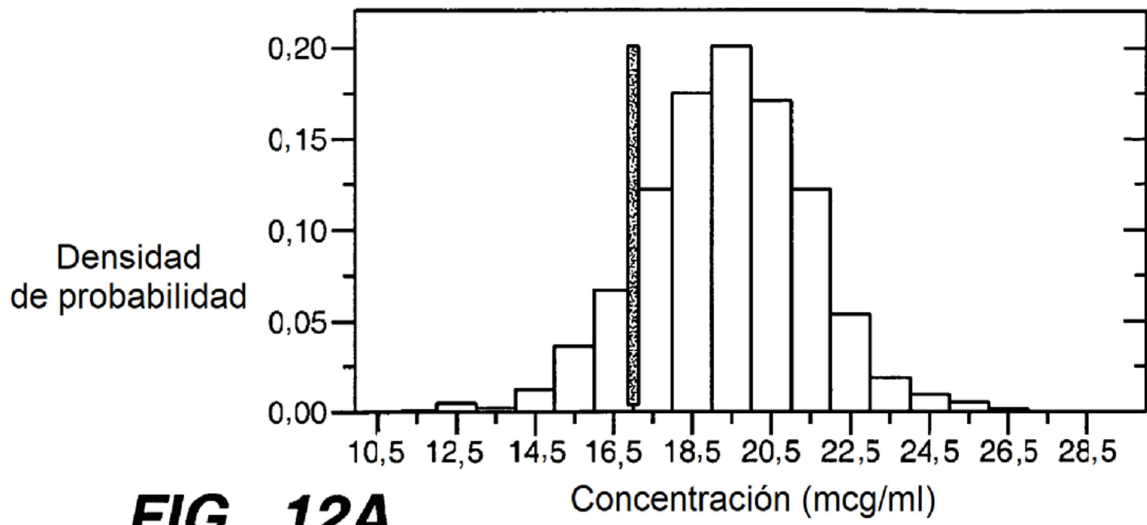


FIG. 12A

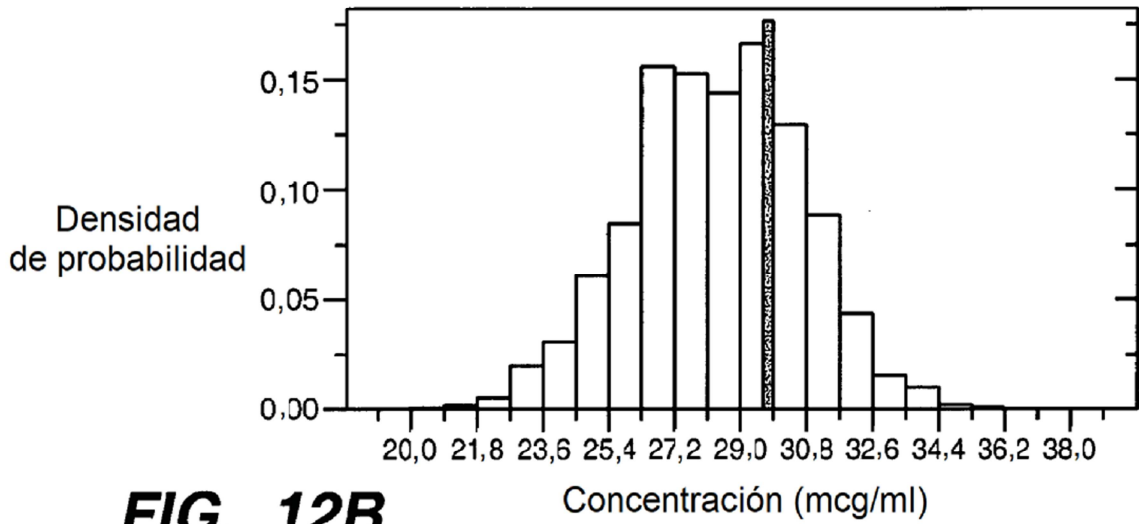


FIG. 12B

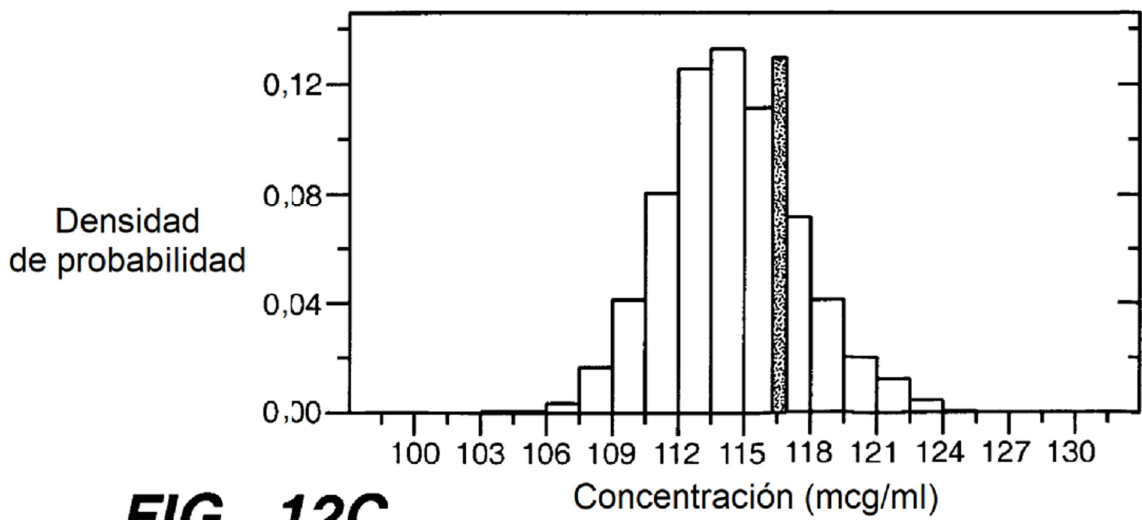


FIG. 12C

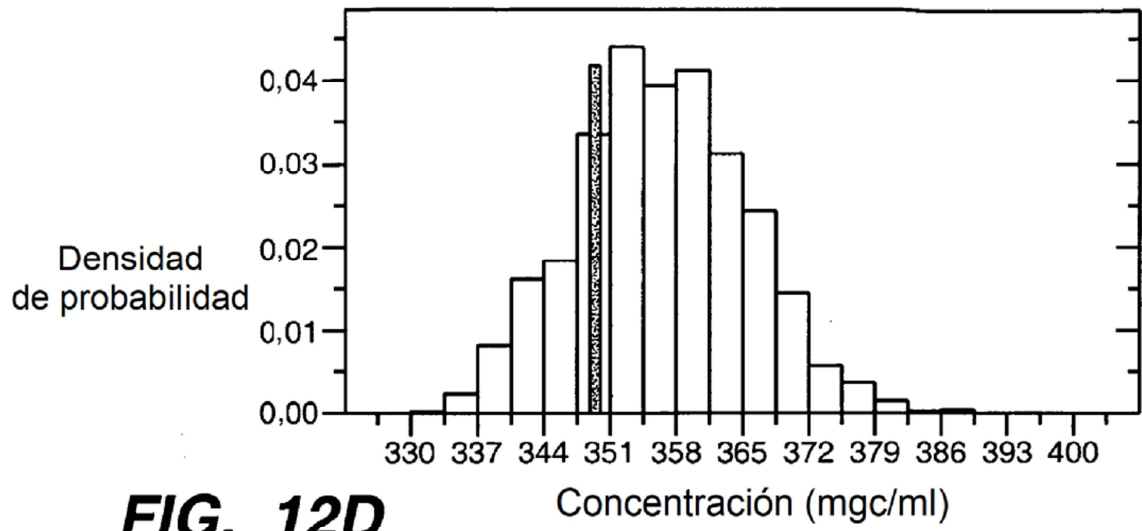


FIG._12D

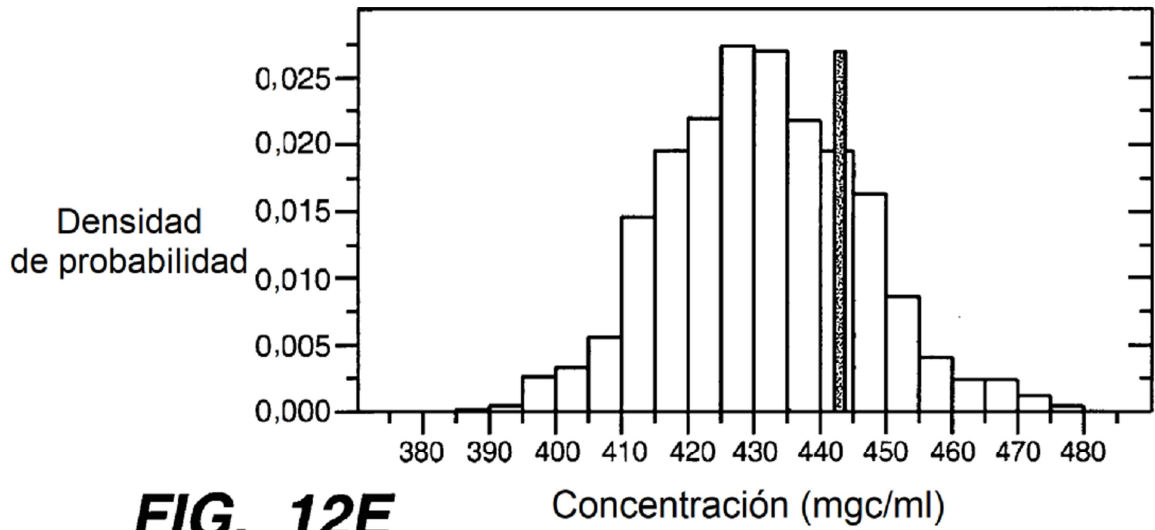


FIG._12E

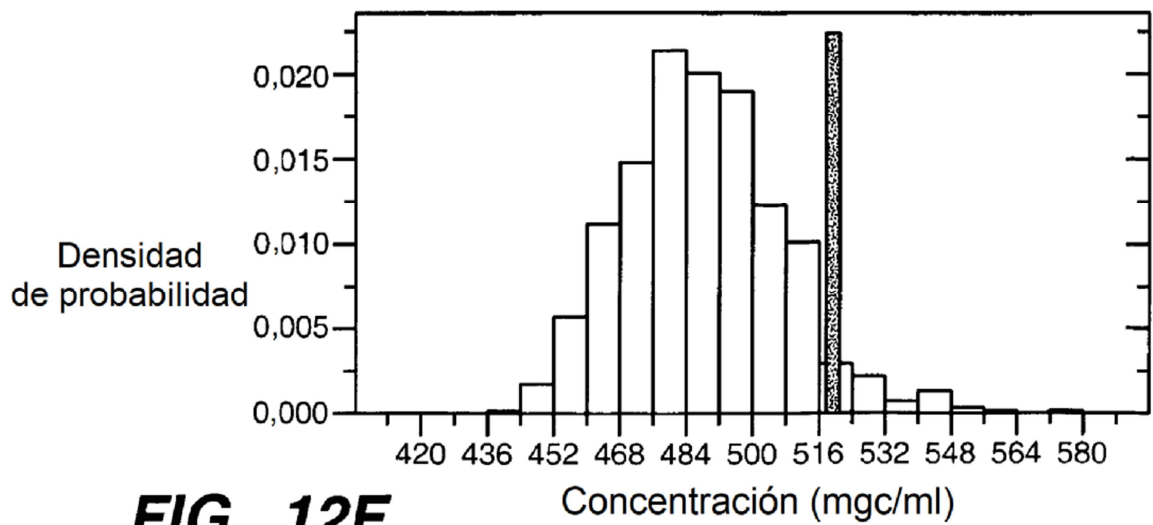


FIG._12F

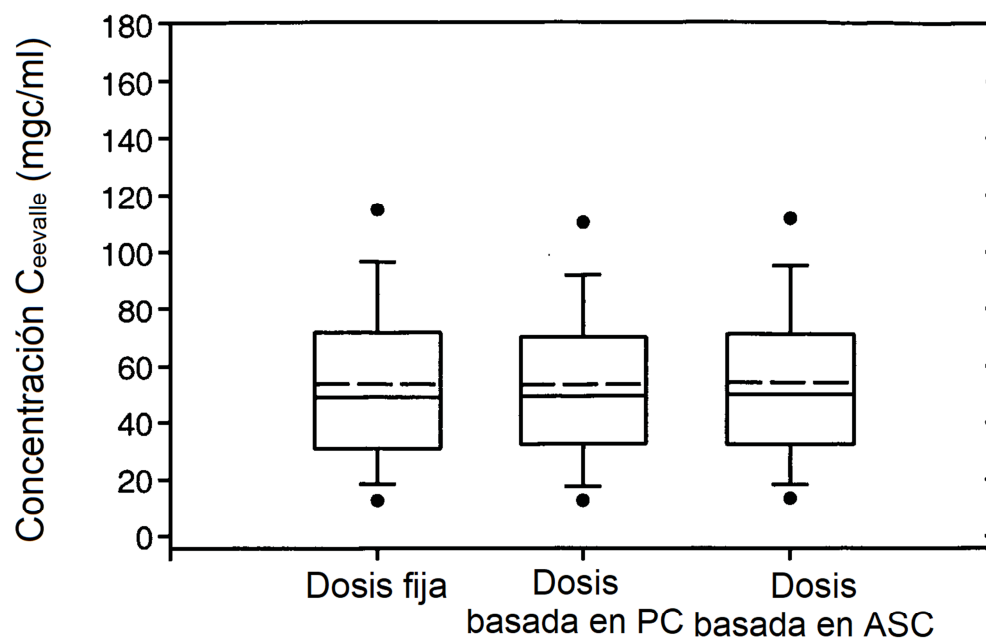


FIG._13

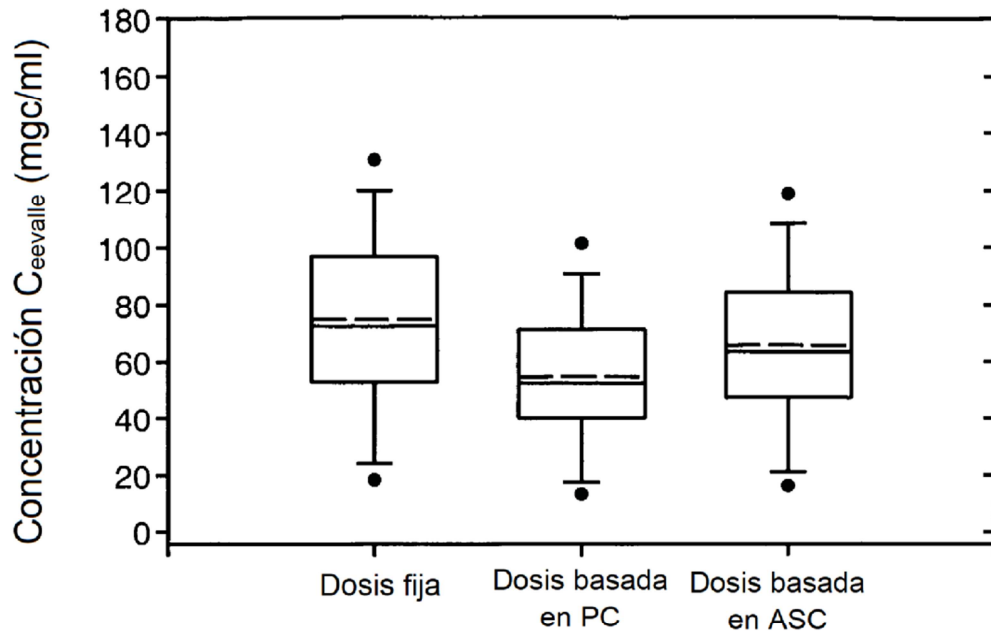


FIG._14A

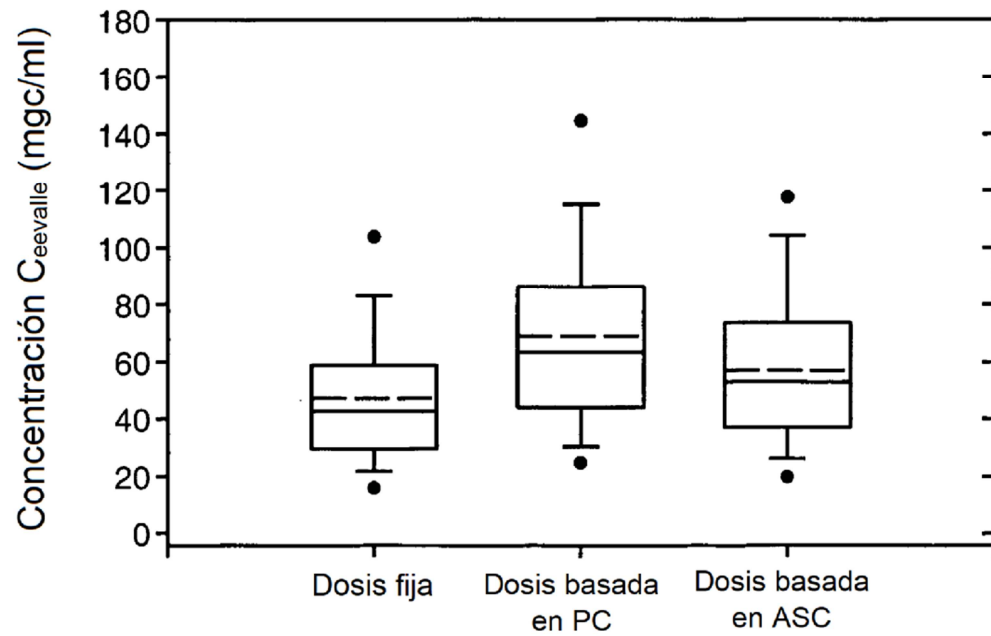


FIG._14B