



PCT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-123800-00000-0000

Fecha: 2010-10-06 12:00:18
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 259

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

INVENTARIO

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

10-123800

21. EXPEDIENTE No.

TERAPIA DE COMBINACIÓN CON ANTAGONISTAS DE C-MET Y EGFR

54. TITULO

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

GENENTECH, INC.

DOMICILIO

SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. BOGOTÁ, D.C.

AS: 114.734

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-123800- -00000-0000

Fecha: 2010-10-06 12:00:18

Tra: 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 259

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE

Nombre: GENENTECH, INC.

Dirección: 1 DNA Way South San Francisco,
CA 94080, US.Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de
América.Lugar de Constitución: Estados Unidos de
América.

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Calle 70A #4 – 41, Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número 80.410.337 TP 57492

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura
de Propiedad Industrial, sirvase indicar el numero de radicación (del poder). _____

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Ellen FILVAROFF, Mark MERCHANT, Robert L. YAUCH.

Dirección: 538 18th Avenue San Francisco, CA 94121, US; 2395 Lyall Way
Belmont, CA 94002, US; 1726 Connecticut Drive Redwood City, CA 94061, US
(respectivamente).

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/US2009/036314

Fecha

06.03.2009

Publicación Internacional No

WO 2009/111691 A3

Fecha

11.09.2009

6 Título (54): TERAPIA DE COMBINACIÓN CON ANTAGONISTAS DE C-MET Y EGFR

7 Clasificación Internacional (51): A61K 31/517, A61P 3/00, A61K 45/06

8 Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

US

06.03.2008

61/034,446

US

11.04.2008

61/044,438

9 Comprobante de pago No.

10-73.096 10-73.119 10-75.110

Fecha 05-10-2010

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

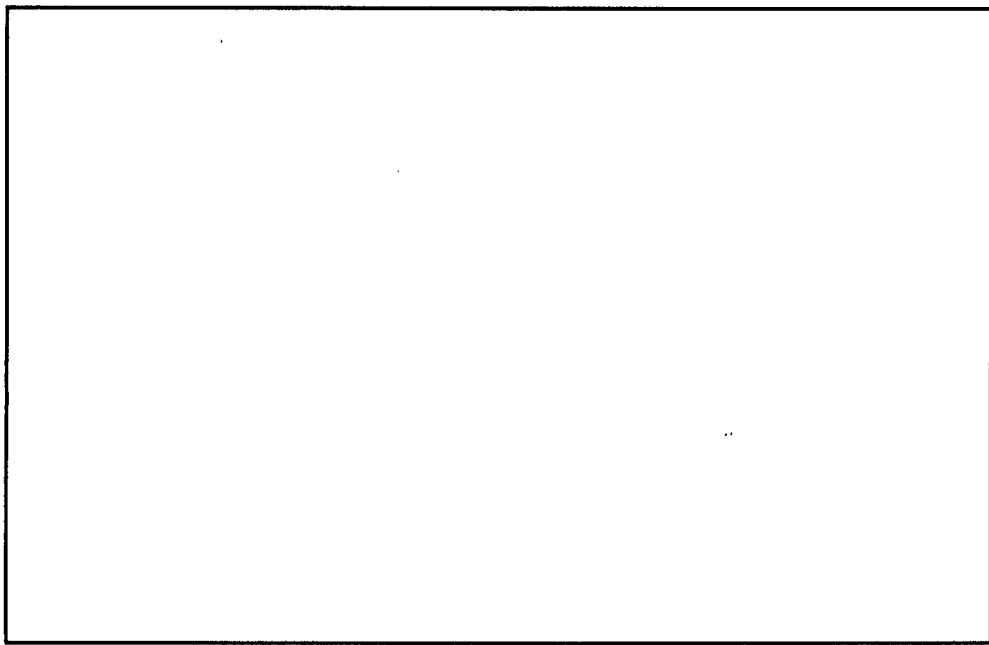
PI02-F06 (2009-12-04)

10

ANEXOS

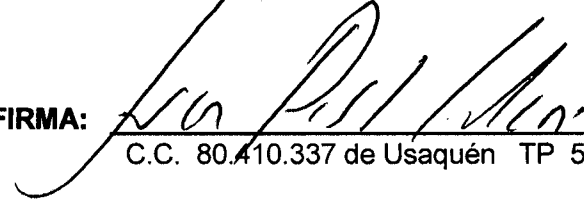
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 554.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no estén inscritas en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada.**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. **Fotocopia autenticada.**
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros: - Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales \$ 182.000 (7*\$26.000).
- Listado de Secuencias

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA: 
C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

114 734 M

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 73,096
FECHA : SEPTIEMBRE 1 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-123800- -00000-0000

Fecha: 2010-10-06 12:00:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	382752296	01/09/2010	48,674,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
	TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

114 734
J

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 73,119
FECHA : SEPTIEMBRE 1 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-123800- -00000-0000
Fecha: 2010-10-06 12:00:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259

***** CONSIGNACION *****

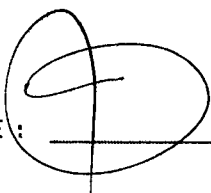
DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	382752296	01/09/2010	48,674,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	130,000.00
	TOTAL :	\$ 130,000.00

SON: CIENTO TREINTA MIL PESOS

RESPONSABLE :



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

114734
L

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 75,110

FECHA : SEPTIEMBRE 10 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-123800- -00000-0000

Fecha: 2010-10-06 12:00:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259

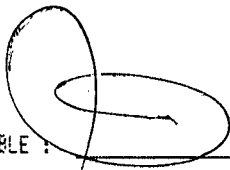
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	382752285	08/09/2010	30,363,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	52,000.00
		TOTAL :	\$ 52,000.00

SON: CINCUENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

WO 2009/111691 A3



- (51) International Patent Classification:
A61K 31/517 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2009/036314
- (22) International Filing Date:
6 March 2009 (06.03.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/034,446 6 March 2008 (06.03.2008) US
61/044,438 11 April 2008 (11.04.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US):
GENENTECH, INC. [US/US]; 1 Dna Way, South San Francisco, CA 94080 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): FILVAROFF, Ellen [US/US]; 538 18th Avenue, San Francisco, CA 94121 (US). MERCHANT, Mark [US/US]; 2395 Lyall Way, Belmont, CA 94002 (US). YAUCH, Robert, L. [US/US]; 1726 Connecticut Drive, Redwood City, CA 94061 (US).
- (74) Agents: COBURN, Cara, M. et al.; Genentech, Inc., 1 Dna Way, Ms-49, South San Francisco, CA 94080 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: COMBINATION THERAPY WITH C-MET AND EGFR ANTAGONISTS

(57) Abstract: The present invention relates generally to the fields of molecular biology and growth factor regulation. More specifically, the invention relates to combination therapies for the treatment of pathological conditions, such as cancer comprising a c-met antagonist and a EGFR antagonist.

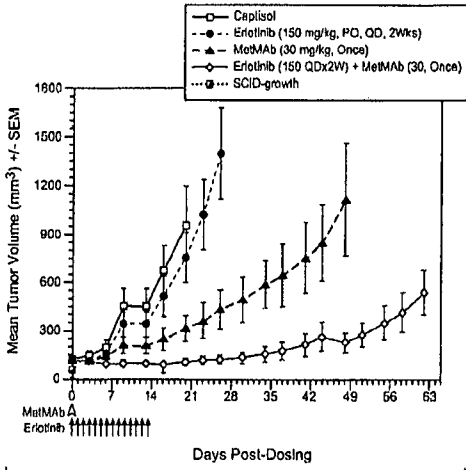


FIG. 5

+

WO 2009/111691 A3

- Published:
- with international search report (Art. 21(3))
 - before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
 - with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))
- (88) Date of publication of the International search report:
12 November 2009

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
11 de Septiembre de 2009 (11.09.2009)

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/111691 A3

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 31/517 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) No. Solicitud Internacional:
PCT/US2009/036314

(22) Fecha de Presentación Internacional:
06 de Marzo de 2009 (06.03.2009)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:
61/034,446 06 de Marzo de 2008 (06.03.2008) EU
61/044,438 11 de Abril de 2008 (11.04.2008) EU

(71) Solicitante (para todos los países destinatarios con excepción de EU): **GENENTECH, INC.** [EU/EU]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (EU).

(72)

(75) Inventores, e Inventores/Solicitantes (para US únicamente):
FILVAROFF, Ellen [EU/EU]; 538 18th Avenue San Francisco, CA 94121 (EU). **MERCHANT, Mark** [EU/EU]; 2395 Lyall Way Belmont, CA 94002 (EU). **YAUCH, Robert, L.** [EU/EU]; 1726 Connecticut Drive Redwood City, CA 94061 (EU).

(74) Agente: **COBURN, Cara, M.**; Genentech, Inc. 1 DNA Way MS 49 South San Francisco, CA 94080 (EU).

(81) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible):
AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- con el informe internacional de búsqueda (Art. 21(3))
- antes de la fecha límite de expiración para reivindicaciones modificadas y a ser republicado nuevamente en el evento de recibirlas (Regla 48.2(h))
- con el listado de secuencias como parte de la descripción (Regla 5.2(a))

Fecha de Publicación de el Reporte Internacional de Búsqueda:

12 de noviembre de 2009

(54) Título: TERAPIA DE COMBINACIÓN CON ANTAGONISTAS DE C-MET Y EGFR

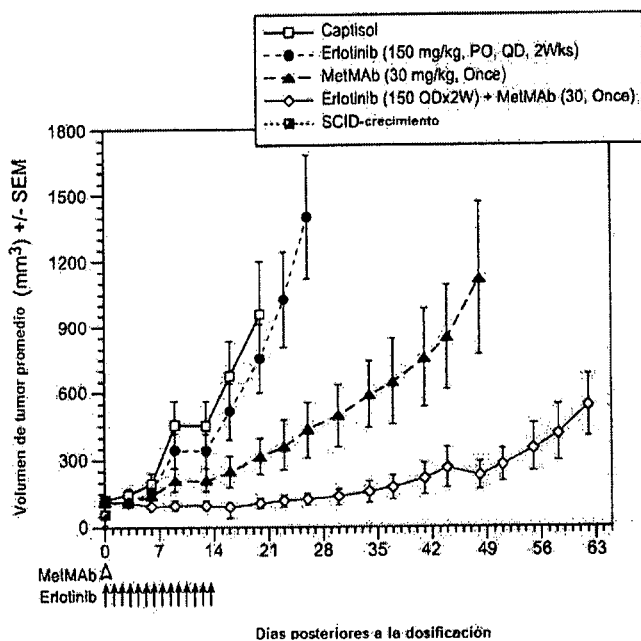


FIG. 5

(57) Extracto: La presente invención se refiere, en general, a los campos de la biología molecular y la regulación del factor de crecimiento. Más específicamente, la invención se refiere a una combinación de estas terapias para el tratamiento de afecciones patológicas, como el cáncer.

TERAPIA DE COMBINACIÓN CON ANTAGONISTAS DE C-MET Y EGFR

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

En virtud del título 35 del Código de los Estados Unidos, artículo 119, inciso e la presente solicitud reivindica prioridad respecto de la solicitud provisoria de los Estados Unidos número 61/034.446, presentada el 6 de marzo de 2008, y la solicitud provisoria de los Estados Unidos número 61/044.438, presentada el 11 de abril de 2008, el contenido de las cuales se incorpora a la presente por referencia.

CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se refiere, en general, a los campos la biología molecular y regulación del factor del crecimiento. Más específicamente, la invención se refiere a terapias de combinación para el tratamiento de afecciones patológicas, como el cáncer.

ANTECEDENTES

HGF es un factor pleiotrópico derivado de la mesenquima con actividades mitogénicas, motogénicas y morfogénicas en varios tipos de células diferentes. Los efectos del HGF se median a través de la tirosina quinasa específica, c-met, y C. S. M. se observan frecuentemente HGF aberrante y expresión de c-met en una variedad de tumores. Ver, por ejemplo, Maulik et al., Cytokine & Growth Factor Reviews (2002), 13:41–59; Danilkovitch–Miagkova & Zbar, J. Clin. Invest. (2002), 109(7):863–867. La regulación de vía de señalización HGF/c-Met ésta implicada en la progresión de tumor y metástasis. Ver, por ejemplo, Trusolino & Comoglio, Nature Rev. (2002), 2:289–300).

El HGF une el dominio extracelular del receptor de tirosina quinasa de c-met (RTK) y regula diversos procesos biológicos como diseminación celular, proliferación, y supervivencia. La señalización HGF–Met es esencial para el desarrollo embrionario normal especialmente en la migración de células

progenitoras de músculos y desarrollo del sistema nervioso e hígado (Bladt et al., Nature (1995), 376, 768–771.; Hamanoue et al., Faseb J (2000), 14, 399–406; Maina et al., Cell (1996), 87, 531–542; Schmidt et al., Nature (1995), 373, 699–702; Uehara et al., Nature (1995), 373, 702–705). Los fenotipos de desarrollo de Met y HGF en ratones knockout son muy similares lo que sugiere que HGF es el ligando cognado del receptor de Met (Schmidt et al., 1995, supra; Uehara et al., 1995, supra). HGF–Met también cumple un importante rol en la regeneración del hígado, angiogénesis, y sanación de heridas (Bussolino et al., J Cell Biol (1992), 119, 629–641; Matsumoto and Nakamura, Exs (1993), 65, 225–249; Nusrat et al., J Clin Invest (1994) 93, 2056–2065). El receptor Met precursor atraviesa una escisión proteolítica en una subunidad extracelular α y subunidad de extensión de membrana β unida a través de enlaces disulfuros (Tempest et al., Br J Cancer (1988), 58, 3–7). La subunidad β contiene el dominio de quinasa citoplasmática y refugia un sitio de enlace multi–sustrato en la C–terminal donde las proteínas de adaptación se unen e inician la señalización (Bardelli et al., Oncogene (1997), 15, 3103–3111; Nguyen et al., J Biol Chem (1997), 272, 20811–20819; Pelicci et al., Oncogene (1995), 10, 1631–1638; Ponzetto et al., Cell (1994), 77, 261–271; Weidner et al., Nature (1996), 384, 173–176). Tras la unión de HGF, la activación de Met conduce a la fosforilación de tirosina y la señalización descendente a través de Gab1 y Grb2/Sos PI3–quinasa mediada y activación Ras/MAPK respectivamente, lo que conduce la motilidad y proliferación celular (Furge et al., Oncogene (2000), 19, 5582–5589; Hartmann et al., J Biol Chem (1994), 269, 21936–21939; Ponzetto et al., J Biol Chem (1996), 271, 14119–14123; Royal and Park, J Biol Chem (1995), 270, 27780–27787).

El Met demostró ser transformante en una línea celular de osteosarcoma tratada de cáncer (Cooper et al., Nature (1984), 311, 29–33; Park et al., Cell (1986), 45, 895–904). La sobreexpresión de Met o la amplificación de gen han sido observadas en una variedad de cánceres humanos. Por ejemplo, la proteína Met está sobreexpresada al menos 5 veces en cánceres colorectal y se informó que está gen amplificada en la metástasis de hígado (Di Renzo et al., Clin Cancer

Res (1995), 1, 147–154; Liu et al., *Oncogene* (1992), 7, 181–185). La proteína de Met también se informó que está sobreexpresada en carcinoma celular escamoso oral, carcinoma hepatocelular, carcinoma celular renal, carcinoma de mamas, y carcinoma de pulmón (Jin et al., *Cancer* (1997), 79, 749–760; Morello et al., *J Cell Physiol* (2001), 189, 285–290; Natali et al., *Int J Cancer* (1996), 69, 212–217; Olivero et al., *Br J Cancer* (1996), 74, 1862–1868; Suzuki et al., *Br J Cancer* (1996), 74, 1862–1868). Además, la sobreexpresión de mRNA ha sido observada en carcinoma hepatocelular, carcinoma gástrico, y carcinoma colorectal (Boix et al., *Hepatology* (1994), 19, 88–91; Kuniyasu et al., *Int J Cancer* (1993), 55, 72–75; Liu et al., *Oncogene* (1992), 7, 181–185).

Se han encontrado una variedad de mutaciones en el dominio de quinasa de Met en el carcinoma papilar renal que lleva a la activación del receptor constitutiva (Olivero et al., *Int J Cancer* (1999), 82, 640–643; Schmidt et al., *Nat Genet* (1997), 16, 68–73; Schmidt et al., *Oncogene* (1999), 18, 2343–2350). Estas mutaciones de activación proporcionan fosforilación de tirosina de Met y resultan en la activación de MAPK, formación de foco, y tumorigénesis (Jeffers et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997), 94, 11445–11450). Asimismo, estas mutaciones aumentan la motilidad celular e invasión (Giordano et al., *Faseb J* (2000), 14, 399–406; Lorenzato et al., *Cancer Res* (2002), 62, 7025–7030). La activación de Met dependiente de HGF en mediadores de células transformadas aumento la motilidad, dispersión, y migración que finalmente conducen al crecimiento invasivo del tumor y la metástasis (Jeffers et al., *Mol Cell Biol* (1996), 16, 1115–1125; Meiners et al., *Oncogene* (1998), 16, 9–20).

Se ha mostrado que el Met interactúa con otras proteínas que conducen a la activación, transformación e invasión del receptor. En las células neoplásicas, se informa que Met interactúa con integrina $\alpha 6 \beta 4$, un receptor de componentes de matriz extracelular (ECM) como lamininas, para promover el crecimiento invasivo dependiente de HGF (Trusolino et al., *Cell* (2001), 107, 643–654). Además, se ha mostrado que el dominio extracelular de Met interactúa con un miembro de la familia de la semaforina, plexin B1, y que aumenta el crecimiento invasivo

(Giordano et al., *Nat Cell Biol* (2002), 4, 720–724). Asimismo, se informa que CD44v6, que ha estado implicado en la tumorigénesis y metástasis, forma un complejo con Met y HGF y resulta en la activación del receptor de Met (Orian-Rousseau et al., *Genes Dev* (2002), 16, 3074–3086).

Met es un miembro de la subfamilia del receptor tirosinas quinasas (RTKs) que incluyen Ron y Sea (Maulik et al., *Cytokine Growth Factor Rev* (2002), 13, 41–59). La predicción de la estructura del dominio celular de Met sugiere una homología compartida con las semaforinas y plexinas. La N-terminal de Met contiene un dominio Sema de aproximadamente 500 amino ácidos que se conserva en todas las semaforinas y plexinas. Las semaforinas y plexinas pertenecen a una gran familia de proteínas segregadas y unidas a la membrana que se describieron inicialmente por su rol en el desarrollo neural (Van Vactor and Lorenz, *Curr Bio* (1999), 9, R201–204). Sin embargo, en forma más reciente, la sobreexpresión de semaforina ha sido correlacionada con la invasión de tumor y la metástasis. Un dominio PSI rico en cisteína (al que también se hace referencia como dominio de Secuencia Relacionada a Met) que se encontró en plexinas, semaforinas e integrinas yace en forma adyacente al dominio Sema seguido por cuatro repeticiones IPT que son regiones como de inmunoglobulina que se encontró en plexinas y factores de transcripción. Un estudio reciente indica que el dominio Met Sema es suficiente para HGF y unión a la heparina (Gherardi et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003), 100(21):12039–44).

Como se describió anteriormente, la tirosina quinasa receptora de Met se activa por su ligando cognado HGF y la fosforilación del receptor activa vías de MAPK, PI-3 quinasa y PLC- γ corriente abajo (L. Trusolino and P. M. Comoglio, *Nat Rev Cancer* 2, 289 (2002); C. Birchmeier et al., *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 915 (2003)). La fosforilación de Y1234/Y1235 dentro del dominio quinasa es crítica para la activación de quinasa de Met mientras que Y1349 y Y1356 en el sitio de enlace multisustrato son importantes para la unión de src homología-2 (SH2), unión a fosfotirosina (PTB), y proteínas de dominio de unión a Met (MBD) (C. Ponzetto et al., *Cell* 77, 261 (1994); K. M. Weidner et al., *Nature* 384, 173 (1996);

G. Pelicci et al., *Oncogene* 10, 1631 (1995)) para mediar la activación de vías de señalización corriente abajo. Un sitio de fosforilación de yuxtamembrana adicional, Y1003, ha sido especialmente caracterizada por su unión al dominio de unión a tirosina quinasa (TKB) del Cbl E3–ligasa (P. Peschard et al., *Mol Cell* 8, 995 (2001); P. Peschard, N. Ishiyama, T. Lin, S. Lipkowitz, M. Park, *J Biol Chem* 279, 29565 (2004)). Se informa que la unión Cbl conduce a la endocitosis del receptor mediado por endofilina, ubiquitinación y posterior degradación de receptor (A. Petrelli et al., *Nature* 416, 187 (2002)). Este mecanismo de regulación por disminución ha sido descrito previamente en la familia de EGFR que también presenta un sitio de unión a Cbl similar (K. Shtiegman, Y. Yarden, *Semin Cancer Biol* 13, 29 (2003); M. D. Marmor, Y. Yarden, *Oncogene* 23, 2057 (2004); P. Peschard, M. Park, *Cancer Cell* 3, 519 (2003)). Se ha informado disregulación de Met y HGF en una variedad de tumores. Se ha observado la activación de Met conducida por ligando en una variedad de cánceres. Se observa suero elevado y HGF intra–tumoral en pulmón, cáncer de mama y múltiple mieloma (J. M. Siegfried et al., *Ann Thorac Surg* 66, 1915 (1998); P. C. Ma et al., *Anticancer Res* 23, 49 (2003); B. E. Elliott et al. *Can J Physiol Pharmacol* 80, 91 (2002); C. Seidel, et al, *Med Oncol* 15, 145 (1998)). Se ha informado a sobreexpresión de Met y/o HGF, amplificación o mutación de Met en varios cánceres como el colorectal, de pulmón, gástrico, y cáncer de riñón y se cree que conduce a la activación del receptor independiente de ligando (C. Birchmeier et al, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 915 (2003); G. Maulik et al., *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 41 (2002)). Asimismo, la sobreexpresión inducible de Met en un modelo de hígado de ratón da lugar a un carcinoma hepatocelular lo que demuestra que la sobreexpresión del receptor lleva a la tumorigénesis independiente de ligando (R. Wang, et al, *J Cell Biol* 153, 1023 (2001)). La prueba más convincente que implica al Met en cáncer se informa en pacientes con carcinoma papilar renal (RPC) familiar y esporádico. Las mutaciones en el dominio de quinasa de Met que conducen a la activación constitutiva del receptor se identificaron como mutaciones de línea germinal y somáticas en RPC (L. Schmidt et al., *Nat Genet* 16, 68 (1997)). La

introducción de estas mutaciones en modelos de ratón transgénicos lleva a tumorigénesis y metástasis. (M. Jeffers et al., Proc Natl Acad Sci U S A 94, 11445 (1997)).

Las publicaciones relativas a c-met y antagonistas de c-met incluyen Martens, T, et al (2006) Clin Cancer Res 12(20 Pt 1):6144; US 6,468,529; WO2006/015371; WO2007/063816; WO2006/104912; WO2006/104911; WO2006/113767; US2006-0270594; US2006- US patent No. 7,481,993; WO2009/007427; WO2005/016382; WO2009/002521; WO2007/143098; WO2007/115049; WO2007/126799.

La familia del receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGFR) comprende cuatro receptores íntimamente relacionados (HER1/EGFR, HER2, HER3 y HER4) que están involucrados en las reacciones celulares como diferenciación y proliferación. La sobre-expresión de la quinasa EGFR, o su ligando TGF-alfa, generalmente está asociada a muchos cánceres, entre los que se incluye, cáncer de mama, de pulmón, colorectal, de ovario, de célula renal, de vejiga, cánceres de cabeza y cuello, glioblastomas, y astrocitomas, y se cree que contribuye al crecimiento maligno de estos tumores. Asimismo, se ha descubierto que una supresión-mutación específica en el gen EGFR (EGFRvIII) aumenta la tumorigenicidad celular. La activación de vías de señalización estimuladas de EGFR promueve procesos múltiples que son promotores de cáncer potenciales, por ejemplo, proliferación, angiogénesis, invasión y motilidad celular, apoptosis disminuida e inducción de resistencia a droga. Con frecuencia, se une la expresión HER1/EGFR aumentada a la enfermedad avanzada, metástasis, y prognosis débil. Por ejemplo, en NSCLC y cáncer gástrico, se ha mostrado que la expresión HER1/EGFR aumentada está asociada a la alta velocidad metastásica, diferenciación de tumor débil y proliferación de tumor aumentada.

Se han observado las mutaciones que activan la actividad de la proteína intrínseca tirosina quinasa y/o aumentan la señalización corriente abajo en NSCLC y glioblastoma. Sin embargo, el rol de las mutaciones como mecanismo de inicio a los fines de proporcionar sensibilidad a los inhibidores del receptor

EGF, por ejemplo erlotinib (TARCEVA®) o gefitinib, ha sido controvertido. Se ha informado que las formas mutantes del receptor EGF de longitud completa predicen la reacción al gefitinib inhibidor de tirosina quinasa del receptor EGF (Paez, J. G. et al. (2004) *Science* 304:1497–1500; Lynch, T. J. et al. (2004) *N. Engl. J. Med.* 350:2129–2139). Los estudios de cultivos celulares han demostrado que las líneas celulares que expresan dichas formas mutantes del receptor EGF (es decir, H3255) eran más sensibles a la inhibición de crecimiento por el gefitinib inhibidor de tirosina quinasa del receptor EGF, y que se requerían concentraciones mucho más altas de gefitinib para inhibir las líneas celulares de tumor que expresan en receptor EGF de tipo salvaje. Estas observaciones sugieren que formas mutantes específicas del receptor EGF pueden reflejar una mayor sensibilidad a los inhibidores del receptor EGF, pero no identifican un fenotipo completamente sin reacción.

El desarrollo del uso como agentes antitumorales de compuestos que directamente inhiben la actividad quinasa del EGFR, así como anticuerpos que reducen la actividad quinasa de EGFR mediante el bloqueo de la activación de EGFR, son áreas de esfuerzos intensos de investigación (de Bono J.S. and Rowinsky, E.K. (2002) *Trends in Mol. Medicine* 8:S19–S26; Dancey, J. and Sausville, E.A. (2003) *Nature Rev. Drug Discovery* 2:92–313). Diversos estudios han demostrado, revelado o sugerido que algunos inhibidores de quinasa de EGFR podrían mejorar la célula de tumor o muerte por neoplasia cuando se utilizan en combinación con otros agentes o tratamientos anticancerígenos o quimioterapéuticos (por ejemplo, Herbst, R.S. et al. (2001) *Expert Opin. Biol. Ther.* 1:719–732; Solomon, B. et al (2003) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 55:713–723; Krishnan, S. et al. (2003) *Frontiers in Bioscience* 8, e1–13; Grunwald, V. and Hidalgo, M. (2003) *J. Nat. Cancer Inst.* 95:851–867; Seymour L. (2003) *Current Opin. Investig. Drugs* 4(6):658–666; Khalil, M.Y. et al. (2003) *Expert Rev. Anticancer Ther.* 3:367–380; Bulgaru, A.M. et al. (2003) *Expert Rev. Anticancer Ther.* 3:269–279; Dancey, J. and Sausville, E.A. (2003) *Nature Rev. Drug*

Discovery 2:92–313; Ciardiello, F. et al. (2000) Clin. Cancer Res. 6:2053–2063; y Publicación de patente de Estados Unidos: US 2003/0157104).

El erlotinib (por ejemplo, erlotinib HCl, también conocido como TARCEVA® o OSI–774) es un inhibidor de quinasa de EGFR disponible por vía oral. El erlotinib in vitro ha demostrado una actividad inhibidora sustancial contra la quinasa del EGFR en una variedad de líneas celulares de tumor en humanos, incluso en cáncer colorectal y cáncer de mama (Moyer J.D. et al. (1997) Cancer Res. 57:4838), y la evaluación preclínica ha demostrado actividad contra una variedad de xenotransplantes de tumor humano con expresión de EGFR (Pollack, V.A. et al (1999) J. Pharmacol. Exp. Ther. 291:739). El erlotinib ha demostrado actividad en los ensayos clínicos en un numero de indicaciones, incluso cáncer de cabeza y cuello (Soulieres, D., et al. (2004) J. Clin. Oncol. 22:77), NSCLC (Perez–Soler R, et al. (2001) Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 20:310a, resumen 1235), CRC (Oza, M., et al. (2003) Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 22:196a, resumen 785) y MBC (Winer, E., et al. (2002) Breast Cancer Res. Treat. 76:5115a, resumen 445; Jones, R.J., et al. (2003) Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 22:45a, resumen 180). En un ensayo de fase III, la monoterapia erlotinib prolongó en forma significativa la supervivencia, retraso la progresión de la enfermedad y retraso el empeoramiento de los síntomas relacionados con el cáncer de pulmón en pacientes con NSCLC avanzados y refractarios al tratamiento (Shepherd, F. et al. (2004) J. Clin. Oncology, 22:14S (Suplemento del 15 de Julio), Resumen 7022). En noviembre de 2004 la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA) aprobó el TARCEVA® para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) localmente avanzado o metastático luego del fracaso de al menos un régimen de quimioterapia anterior.

A pesar de los avances significativos en el tratamiento del cáncer, aún se buscan terapias mejoradas.

Todas las referencias citadas en la presente, incluidas las solicitudes de patentes y publicaciones, se incorporan a modo de referencia en su totalidad.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona terapias de combinación para el tratamiento de una afección patológica, como el cáncer, en donde un antagonista c-met se combina con un antagonista de EGFR y así proporcionar una actividad antitumoral significativa.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento del cáncer en un sujeto, que comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista c-met antagonista y un antagonista de EGFR.

Los ejemplos de los antagonistas de c-met incluyen, sin limitación, receptores de c-met solubles, variantes de HGF solubles, aptómeros o cuerpos peptídicos que son específicos para el c-met o HGF, las moléculas pequeñas de c-met, anticuerpos anti-c-met y anticuerpos anti-HGF. En alguna realización, el antagonista de c-met es un anticuerpo anti-c-met.

En una realización, el anticuerpo anti-c-met comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende un dominio que comprende uno o más de secuencia CDR1-HC, CDR2-HC y CDR3-HC que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 13-15). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende uno o más de secuencia CDR1-LC, CDR2-LC y CDR3-LC que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 5-7). En algunas realizaciones, el dominio variable de cadena pesada comprende FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC y FR4-HC secuencia que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 9-12). En algunas realizaciones, el dominio variable de cadena liviana comprende FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC y FR4-LC secuencia que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 1-4). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-cmet es monovalente y comprende una región Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la secuencia Fc que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 17).

En algunas realizaciones, el anticuerpo es monovalente y comprende una región Fc, en donde la región Fc comprende un primer y segundo cuerpo

polipeptídico, en donde el primer polipéptido comprende una secuencia Fc que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 17) y el segundo polipéptido comprende la secuencia Fc que se muestra en la Figura 8 (SEC ID N°: 18).

En una realización, el anticuerpo anti-c-met comprende (a) un primer polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia:

QVQLQQSGPELVPRGASVKMSCRASGYTFTSYWLHWVKQRPQGQGLEWIGMIDPS
NSDTRFNPNFKDKATLNVDRSSNTAYMLLSSLTSADSAVYYCATYGSYVSPLDYW
GQGTSVTVSS (SEC ID N°:19), secuencia CH1 que se muestra en la Figura 7
(SEC ID N°: 16), y la secuencia Fc que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 17);
y (b) un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de cadena
liviana que tiene la secuencia:

DIMMSQSPSSLTVSVGEKVTVSCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW
ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTITSVKADDLAVYYCQQYYAYPWTFGGGGTKLEI
K (SEC ID N°:20), y secuencia CL1 que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 8);
y (c) un tercer polipéptido que comprende la secuencia Fc que se muestra en la
Figura 8 (SEC ID N°: 18).

En un aspecto, el anticuerpo anti-c-met comprende al menos una característica que promueve la heterodimerización, mientras que minimiza la homodimerización, de las secuencias Fc dentro del fragmento del anticuerpo. Dicha característica o características mejoran el rendimiento y/o pureza y/o homogeneidad de las poblaciones de inmunoglobina. En una realización, el anticuerpo comprende mutaciones Fc que constituyen “perillas” y “agujeros” como se describe en WO2005/063816. Por ejemplo, una mutación de agujero puede ser una o más de T366A, L368A y/o Y407V en un polipéptido Fc, y una mutación de cavidad puede ser T366W.

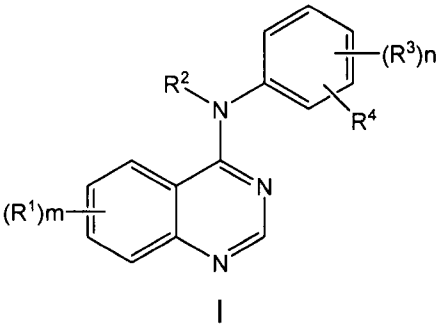
En algunas realizaciones, el antagonista de c-met es SGX-523, PF-02341066, JNJ-38877605, BMS-698769, PHA-665,752, SU5416, SU 1274, XL-880, MGCD265, ARQ 197, MP-470, AMG 102, anticuerpo 223C4 o anticuerpo humanizado 223C4 (WO2009/007427), L2G7, NK4, XL-184, MP-470, o Comp-1.

Los antagonistas de c-met pueden utilizarse para reducir o inhibir uno o más aspectos de efectos asociados a HGF/c-met, entre los que se incluye, sin limitación, activación de c-met, señalización molecular corriente abajo (por ejemplo, fosforilación de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), fosforilación de AKT, fosforilación de c-met, señalización mediada de quinasa PI3), proliferación celular, migración celular, supervivencia celular, morfogénesis y angiogénesis celular. Estos efectos pueden estar modulados por cualquier mecanismo relevante biológicamente, incluida la alteración del ligando (por ejemplo, HGF) de unión a c-met, fosforilación de c-met y/o multimerización de c-met.

Los ejemplos de antagonistas de EGFR incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que unen al EGFR. Los antagonistas de EGFR también incluyen moléculas pequeñas como compuestos descritos en US5616582, US5457105, US5475001, US5654307, US5679683, US6084095, US6265410, US6455534, US6521620, US6596726, US6713484, US5770599, US6140332, US5866572, US6399602, US6344459, US6602863, US6391874, WO9814451, WO9850038, WO9909016, WO9924037, WO9935146, WO0132651, US6344455, US5760041, US6002008, US5747498. Los antagonistas de EGFR de molécula pequeña particular incluyen OSI-774 (CP-358774, erlotinib, OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-, dihidrocloruro, Pfizer Inc.); Iressa® (ZD1839, gefitinib, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-N2-(1-metil-piperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidina-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletil)amino]-1H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletil)amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butinamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida); lapatinib (Tykerb, GlaxoSmithKline); ZD6474 (Zactima, AstraZeneca); CUDC-101 (Curis); canertinib (CI-1033); AEE788 (6-[4-[(4-etil-

1-piperazinil)metil]fenil]-N-[(1R)-1-feniletil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina, WO2003013541, Novartis) y PKI166 4-[4-[[[(1R)-1-feniletil]amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol, WO9702266 Novartis).

En una realización particular, el antagonista de EGFR tiene la fórmula general I:



de acuerdo con US 5.757.498, se incorpora a la presente a modo de referencia, en donde:

m es 1, 2, o 3;

cada R¹ se seleccionada de forma independiente de un grupo que consiste de hidrógeno, halo, hidroxil, hidroxiamino, carboxi, nitro, guanidino, ureido, ciano, trifluorometil, y -(alquileo C₁-C₄)-W-(fenil) en donde W es un enlace simple, O, S o NH;

o cada R¹ es independiente seleccionado de R⁹ y alquilo C₁-C₄ sustituido con ciano, en donde R⁹ es seleccionado de un grupo que consiste de R⁵, -OR⁶, -NR⁶, R⁶,

-C(O)R⁷, -NHOR⁵, -OC(O)R⁶, ciano, A y -YR⁵; R⁵ es alquilo C₁-C₄; R⁶ es independientemente hidrógeno o R⁵; R⁷ es R⁵, -OR⁶ o -NR⁶R⁶; A se selecciona de piperidino, morfolino, pirrolidino, 4-R⁶-piperazin-1-ilo, imidazol-1-ilo, 4-piridon-1-ilo, -(alquileo C₁-C₄)(CO₂H), fenoxi, fenilo, fenilsulfanilo, alqueno C₂-C₄, y

-(alquileo C₁-C₄)C(O)NR⁶R⁶; y Y es S, SO, o SO₂; en donde las porciones de alquilo en R⁵, -OR⁶ y -NR⁶R⁶ están opcionalmente sustituidas con uno a tres sustituyentes halo y las porciones alquilo en R⁵, -OR⁶ y -NR⁶R⁶ están opcionalmente sustituidas con 1 o 2 grupos R⁹, y en donde las porciones alquilo de dichos sustituyentes opcionales están opcionalmente sustituidas con halo o R⁹,

con la condición de que dos heteroátomos no estén unidos al mismo átomo de carbono;

o cada R^1 es independientemente seleccionado de $-\text{NHSO}_2R^5$, ftalimido-aquilsulfonilamino-(C_1-C_4), benzamido, bencensulfonilamino, 3-fenilureido, 2-oxopirrolidin-1-ilo, 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, y R^{10} -alcanoilamino-(C_2-C_4) en donde R^{10} es seleccionado de halo, $-\text{OR}^6$, alcanoiloxi C_2-C_4 , $-\text{C}(\text{O})R^7$, y $-\text{NR}^6R^6$; y en donde dicho $-\text{NHSO}_2R^5$, ftalimido-(alquilsulfonilamino- C_1-C_4 , benzamido, bencensulfonilamino, 3-fenilureido, 2-oxopirrolidin-1-ilo, 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, y grupos R^1R^{10} -alcanoilamino-(C_2-C_4) están opcionalmente sustituidos con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados de halo, alquilo C_1-C_4 , ciano, metansulfonilo y alcoxi C_1-C_4 ;

o dos grupos R^1 tomados juntos con los carbonos a los que están unidos para formar un anillo de 5 a 8 miembros que incluye 1 o 2 heteroátomos seleccionados de O, S y N;

R^2 es hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halo, alcoxi C_1-C_4 , $-\text{NR}^6R^6$, y $-\text{SO}_2R^5$;

n es 1 o 2 y cada R^3 es independientemente seleccionado de hidrógeno, halo, hidroxilo, alquilo C_1-C_6 , $-\text{NR}^6R^6$, y alcoxi C_1-C_4 , en donde las porciones de alquilo de dichos grupos R^3 están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halo, alcoxi C_1-C_4 , $-\text{NR}^6R^6$, y $-\text{SO}_2R$; y

R^4 es azido o $-(\text{etinilo})-R^{11}$ en donde R^{11} es hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con hidroxilo, $-\text{OR}^6$, o $-\text{NR}^6R^6$.

En una realización particular, el antagonista de EGFR es un compuesto de acuerdo con la fórmula I seleccionado de un grupo que consiste de:

(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-[3-(3'-hidroxipropin-1-il)fenil]-amina; [3-(2'-(aminometil)-etinil)fenil]-(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-amina; (3-etinilfenil)-(6-nitroquinazolin-4-il)-amina; (6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-(4-etinilfenil)-amina;

(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-(3-etinil-2-metilfenil)-amina; (6-aminoquinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (3-etinilfenil)-(6-metansulfonilaminoquinazolin-4-il)-amina; (3-etinilfenil)-(6,7-metilendioxiquinazolin-4-il)-amina; (6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-(3-etinil-6-metilfenil)-amina; (3-etinilfenil)-(7-nitroquinazolin-4-il)-amina; (3-etinilfenil)-[6-(4'-toluensulfonilamino)quinazolin-4-il]-amina; (3-etinilfenil)-[6-[2'-ftalimido-et-1'-il-sulfonilamino]quinazolin-4-il]-amina; (3-etinilfenil)-(6-guanidinoquinazolin-4-il)-amina; (7-aminoquinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (3-etinilfenil)-(7-metoxiquinazolin-4-il)-amina; (6-carbometoxiquinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (7-carbometoxiquinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; [6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-il]-(3-etinilfenil)-amina; (3-azidofenil)-(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-amina; (3-azido-5-clorofenil)-(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-amina; (4-azidofenil)-(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-amina; (3-etinilfenil)-(6-metansulfonil-quinazolin-4-il)-amina; (6-etansulfanil-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-dimetoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinil-4-fluoro-fenil)-amina; (6,7-dimetoxi-quinazolin-4-il)-[3-(propin-1'-il)-fenil]-amina; [6,7-bis-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(5-etinil-2-metil-fenil)-amina; [6,7-bis-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-4-fluor-fenil)-amina; [6,7-bis-(2-cloro-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; [6-(2-cloro-etoxi)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; [6,7-bis-(2-acetoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; 2-[4-(3-etinil-fenilamino)-7-(2-hidroxi-etoxi)-quinazolin-6-iloxi]-etanol; [6-(2-acetoxi-etoxi)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; [7-(2-cloro-etoxi)-6-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; [7-(2-acetoxi-etoxi)-6-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; 2-[4-(3-etinil-fenilamino)-6-(2-hidroxi-etoxi)-quinazolin-7-iloxi]-etanol; 2-[4-(3-etinil-fenilamino)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-6-iloxi]-etanol; 2-[4-(3-etinil-fenilamino)-6-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-7-iloxi]-etanol; [6-(2-acetoxi-etoxi)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; (3-etinil-fenil)-[6-(2-metoxi-etoxi)-7-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-etoxi]-quinazolin-4-il]-amina; (3-etinil-fenil)-[7-(2-metoxi-

etoxi)-6-(2-morfolin-4-il)-etoxi)-quinazolin-4-il]-amina; (6,7-dietoxiquinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-dibutoxiquinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-diisopropoxiquinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-dietoxiquinazolin-1-il)-(3-etinil-2-metil-fenil)-amina; [6,7-bis-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-1-il)-(3-etinil-2-metil-fenil)-amina; (3-etinilfenil)-[6-(2-hidroxi-etoxi)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-1-il]-amina; [6,7-bis-(2-hidroxi-etoxi)-quinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; 2-[4-(3-etinil-fenilamino)-6-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-7-iloil]-etanol; (6,7-dipropoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinil-fenil)-amina; (6,7-dietoxiquinazolin-4-il)-(3-etinil-5-flúor-fenil)-amina; (6,7-dietoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinil-4-fluoro-fenil)-amina; (6,7-dietoxi-quinazolin-4-il)-(5-etinil-2-metil-fenil)-amina; (6,7-dietoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinil-4-metil-fenil)-amina; (6-aminometil-7-metoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinil-fenil)-amina; (6-aminometil-7-metoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarbonilmetil-7-metoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarboniletil-7-metoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarboniletil-7-etoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarboniletil-7-etoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarbonilmetil-7-isopropoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarbonilmetil-7-propoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarbonilmetil-7-metoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarboniletil-7-isopropoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; y (6-aminocarboniletil-7-propoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-dietoxiquinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; (3-etinilfenil)-[6-(2-hidroxi-etoxi)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-1-il]-amina; [6,7-bis-(2-hidroxi-etoxi)-quinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; [6,7-bis-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-dimetoxiquinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; (3-etinilfenil)-(6-metansulfonilamino-quinazolin-1-il)-amina; y (6-amino-quinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina.

En una realización particular, el antagonista de EGFR de la fórmula I es N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina. En una realización particular, el antagonista de EGFR N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-

quinazolinamina está en forma de sal HCl. En otra realización particular, el antagonista de EGFR N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina está en una forma polimorfa cristalina sustancialmente homogénea (descrito como polimorfo B en WO 01/34.574) que muestra un patrón de difracción de rayos-X de polvo que tiene picos característicos en grados 2-theta a aproximadamente 6,26, 12,48, 13,39, 16,96, 20,20, 21,10, 22,98, 24,46, 25,14 y 26,91. Se hace referencia a dicha forma polimorfa de N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina como Tarceva[®] así como OSI-774, CP-358774 y erlotinib.

Los antagonistas EGFR se puede utilizar para reducir o inhibir uno o más aspectos de los efectos asociados con el ligando de EGFR-EGFR, entre los que se incluye, sin limitación, la activación EGFR, señalización molecular corriente abajo, la proliferación celular. Estos efectos pueden modularse por cualquier mecanismo relevante biológicamente, incluida la alteración del ligando de unión a EGFR, y alteración de la fosforilación de EGFR.

Los métodos de la invención se pueden utilizar para afectar cualquier estado patológico adecuado. Por ejemplo, se pueden utilizar métodos de la invención para tratar diferentes cánceres, tanto tumores sólidos como tumores de tejido blando de la misma manera. Ejemplos a título enunciativo de cánceres que pueden corregirse con el tratamiento de la invención son el cáncer de mama, cáncer colorectal, cáncer rectal, cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), linfoma no-Hodgkins (NHL), cáncer de célula renal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, sarcoma de tejido blando, sarcoma de kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma, melanoma, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, mesotelioma, y mieloma múltiple. En ciertos aspectos, los cánceres son metásticos. En otros aspectos, los cánceres no son metásticos.

En una realización, se utilizan el anticuerpo anti-c-met y erlotinib en terapias de combinación de cánceres como el carcinoma de pulmón de célula no pequeña.

En ciertas realizaciones, el cáncer no es un cáncer resistente al antagonista de EGFR (por ejemplo, erlotinib o gefitinib). En ciertas realizaciones, el cáncer no

es un cáncer resistente al erlotinib o gefitinib.

En ciertas realizaciones, el cáncer no es un cáncer resistente al inhibidor de tirosina quinasa. En ciertas realizaciones, el cáncer no es un cáncer resistente al inhibidor de tirosina quinasa de EGFR de molécula pequeña.

En ciertas realizaciones, el cáncer muestra la activación, amplificación o expresión de c-met y/o EGFR. En ciertas realizaciones, el cáncer no muestra la activación, amplificación o expresión de c-met y/o EGFR. En ciertas realizaciones, el cáncer muestra la amplificación de c-met. En ciertas realizaciones, el cáncer muestra la amplificación c-met y la amplificación EGFR.

En ciertas realizaciones, el cáncer muestra el gen de EGFR de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, el cáncer muestra el gen de EGFR de tipo salvaje y la amplificación de c-met y/o mutación de c-met.

En ciertas realizaciones, el cáncer muestra la mutación de EGFR. Las mutaciones pueden ubicarse en cualquier porción de un gen de EGFR o región regulatoria asociada con un gen de EGFR. Las mutaciones de EGFR ejemplares incluyen, por ejemplo, mutaciones en el exón 18, 19, 20 o 21, mutaciones en el dominio de quinasa, G719A, L858R, E746K, L747S, E749Q, A750P, A755V, V765M, S768I, L858P, E746-R748 del, R748-P753 del, M766-A767 AI ins, S768- V769 SVA ins, P772-H773 NS ins, 2402OC, 2482OA, 2486T>C, 2491 G>C, 2494OC, 251 0OT, 2539OA, 2549OT, 2563OT, 2819T>C, 2482-2490 del, 2486-2503 del, 2544-2545 ins GCCATA, 2554-2555 ins CCAGCGTGG, o 2562-2563 ins AACTCC. Otros ejemplos de mutaciones de activación de EGFR son conocidas en la técnica (ver por ejemplo, Publicación de Patente de los Estados Unidos N° 2005/0272083). En ciertas realizaciones, la célula o línea celular no comprende una mutación T790M en el gen de EGFR.

En ciertas realizaciones, el cáncer muestra una activación de c-met y/o EGFR. En ciertas realizaciones, el cáncer no muestra activación de c-met y/o EGFR.

En ciertas realizaciones, el cáncer muestra activación de c-met y/o EGFR constitutiva. En algunas realizaciones, el EGFR constitutivo comprende una

mutación en el dominio de tirosina quinasa. En ciertas realizaciones, el cáncer no muestra activación de c-met y/o EGFR constitutiva.

En ciertas realizaciones, el cáncer muestra activación de c-met y/o EGFR independiente de ligando. En ciertas realizaciones, el cáncer no muestra activación de c-met y/o EGFR independiente de ligando.

El antagonista de c-met puede administrarse en serie o en combinación con el antagonista de EGFR, ya sea en la misma composición o en composiciones separadas. La administración del antagonista de c-met y el antagonista de EGFR puede realizarse simultáneamente, por ejemplo, como una composición única o como dos o más composiciones distintas, utilizando la mismas o diferentes rutas de administración. En forma alternativa, o adicional, se puede realizar la administración secuencialmente, en cualquier orden. En forma alternativa, o adicional, se pueden llevar a cabo los pasos de cómo una combinación de la forma secuencial y simultánea, en cualquier orden. En ciertas realizaciones, los intervalos que varían de minutos a días, de semanas a meses, pueden estar presentes en las administraciones de dos o más composiciones. Por ejemplo, el antagonista de EGFR puede administrarse primero, seguido del antagonista de c-met. Sin embargo, la administración simultánea o administración de un antagonista de c-met primero también se contempla. En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona métodos que comprenden la administración de un antagonista de c-met (como un anticuerpo anti-c-met), seguida por la administración de un antagonista de EGFR (como erlotinib (TARCEVA®)). En ciertas realizaciones, los intervalos que varían de minutos a días, de semanas a meses, pueden estar presente entre las administraciones de dos o más composiciones.

En un aspecto, la invención proporciona una composición para el uso en el tratamiento de un cáncer que comprende una cantidad efectiva de antagonista de c-met y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde dicho uso comprende la administración simultánea o secuencial de una antagonista de EGFR. En algunas realizaciones, el antagonista de c-met es un anticuerpo anti-c-

met. En algunas realizaciones, el antagonista de EGFR es erlotinib (TARCEVA®).

En un aspecto, la invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende una cantidad efectiva de antagonista de c-met y un portador aceptable farmacéuticamente, en donde dicho uso comprende la administración simultánea o secuencial de un antagonista de EGFR. En algunas realizaciones, el antagonista de c-met es un anticuerpo anti-c-met. En algunas realizaciones, el antagonista de EGFR es erlotinib (TARCEVA®).

Según la indicación de cáncer específica a tratarse, la combinación de terapia de la invención puede combinarse con agentes terapéuticos adicionales, como agentes quimioterapéuticos, o terapias adicionales como radioterapia o cirugía. Se pueden utilizar muchos agentes quimioterapéuticos conocidos en la terapia de combinación de la invención. Preferentemente se utilizarán aquellos agentes quimioterapéuticos que son estándar para el tratamiento de las indicaciones específicas. La dosificación o frecuencia de cada agente terapéutico a utilizarse en la combinaciones preferentemente la misma, o menor, que la dosificación o frecuencia del agente correspondiente cuando se utiliza sin otro(s) agente(s).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS GRÁFICOS

FIGURAS 1A y 1B: Confirmación de EGFR y MET coexpresión mRNA en líneas de células NSCLC y tumores primarios mediante qRT-PCR. Se determinó la expresión de EGFR y MET mRNA por medio del RT-PCR cuantitativo en un panel de líneas de células de NSCLC (1A) o de lisatos de tumores de NSCLC primarios congelados (1B). Los niveles EGFR y MET mRNA se relacionan de manera positiva en líneas de células ($p=0,59$, $p<0,0001$) y especímenes de NSCLC primarios ($p=0,48$, $p=0,0003$).

FIGURA 2: Las células EBC1 shMet 4,12 (shMet 4,12) que contienen una tetraciclina shRNA inducible direccionada contra c-met o shRNA de control direccionada contra GFP (shGFP2) se cultivaron en un medio de control (Con) o en un medio con 0,1ug/ml tetraciclina Doxyciclina (Dox) análoga durante 48 horas. Luego de que las células hubieren sido privadas de suero por 2 horas, las células

no fueron tratadas (–) o fueron tratadas con TGF α (T, 20nM) o Heregulina b1 (Hrg, 2nM) durante 20 minutos. Se evaluaron todos los lisatos de células para la expresión total y fosfo–proteínas, tal como se ha indicado. Se detectó Beta–Actina (β –Actina) lo que muestra cargas equivalentes entre los canales.

FIGURA 3: Las células de NSCLC H441 que contienen una shRNA inducible direccionada contra c–met o shRNA de control direccionada contra GFP se cultivaron en un medio de control (Con) o en un medio que contiene 0,1ug/ml Dox (Dox) durante 48 horas. Luego de que las células hubieren sido privadas de suero por 2 horas, las células fueron no tratadas (–) o tratadas con TGF α (T) o Heregulina b1 (H) durante 20 minutos. Se detectó Beta–Actina (β –Actina) (4to panel) lo que muestra cargas equivalentes entre los canales.

FIGURA 4: La eficacia de la combinación de erlotinib con shRNA knockdown de c–met en el modelo de trasplante de NSCLC EBC–1. Los tumores EBC–1–shMet–4,5 se establecieron en animales desnudos (CRL nu/nu) y luego se trataron ya sea con un vehículo de tween metilcelulosa (MCT) más agua potable que contenga 5% de sacarosa (Sac) (PO, QD donde indican las flechas), MCT más 1 mg/mL de doxiciclina (Dox) en el agua potable formulada en 5% de sacarosa (100 mg/kg; PO, QD, donde indican las flechas), erlotinib más agua potable que contenga 5% de sacarosa (PO, QD donde indican las flechas), o con erlotinib más 1 mg/mL de doxiciclina en el agua potable formulada en 5% de sacarosa (PO, QD donde indican las flechas). La dosificación oral se efectuó en los días indicados por las flechas. Se mantuvo la sacarosa o el agua Dox a través del estudio con botellas que se intercambiaron cada 2 o 3 días. Los volúmenes de los tumores y SEM se calcularon de la manera descripta en los Ejemplos.

FIGURA 5: Eficacia de la combinación de MetMAb con erlotinib en el modelo de trasplante NCI–H596 hu–HGF–Tg–C3H–SCID. Los tumores NCI–H596 se cultivaron en animales de control de una misma camada hu–HGF–Tg–C3H–SCID o C3H–SCID y se trataron ya sea con el vehículo Captisol (PO, QD, x2 semanas), erlotinib (círculos cerrados, línea corta de guiones; 150 mg/kg, PO, QD, x2 semanas), MetMAb (30 mg/kg, IP, una vez) o la combinación de MetMAb más

erlotinib en las mismas dosificaciones y en los mismos programas. La dosificación se efectuó de la manera indicada al final del cuadro para MetMAb (cabeza abierta de la flecha) y erlotinib o vehículo (cabezas cerradas de las flechas). Se tomaron las medidas del tumor por medio de caliper dos o tres veces por semana durante alrededor de 9 semanas o hasta que los grupos hubieren sido removidos del estudio debido a la existencia de tamaños grandes de tumores dentro del grupo. Se calcularon los volúmenes de los tumores y SEM tal como se describe en los Ejemplos.

FIGURA 6: Las medidas del tiempo de duplicación del tumor (TTD), definido como el tiempo que tomó para que los tumores duplicaran su tamaño, fueron calculadas para cada grupo y fueron utilizadas para generar curvas de supervivencia Kaplan–Meier. La combinación de MetMAb más erlotinib mostró un dramático avance en la progresión del tumor con una TTD media de 49,5 ($\pm$ 2,6) días contra 17,8 ($\pm$ 2,2) días para el grupo tratado con MetMAb, 9,5 ($\pm$ 1,2) días para el grupo tratado con erlotinib y 9,5 ($\pm$ 1,2) días para el grupo de control de vehículo. Las curvas del vehículo y el grupo erlotinib se superponen perfectamente.

FIGURA 7: muestra secuencias de amino ácido de las regiones de marco (FR), regiones hipervariables (HVR), primer dominio constante (CL o CH1) y región Fc (Fc) de una realización de un anticuerpo anti-c-met. La secuencia Fc presentada comprende mutaciones T366S, L368A y Y407V, tal como se describen en WO 2005/063816.

FIGURA 8: muestra secuencia de un polipéptido Fc que comprende una mutación T366W, tal como se describe en WO 2005/063816. En una realización, un polipéptido Fc comprende estas formas de secuencia una compleja con polipéptidos Fc que comprenden la secuencia Fc de la Fig. 7 para generar una región Fc.

FIGURAS 9A–E: La actividad C–met regula la expresión de los ligandos de EGFR. A) El tratamiento con HGF indujo una regulación en alza de ligandos de EGFR en líneas de células de NSCLC que reaccionan a HGF. Se privó de suero a las células Hop92 o NCI–H596 durante toda una noche y luego no se las trató (No

HGF) o se las trató con HGF (50 ng/ml) durante 6 horas (HGF). El tratamiento de RNA de las células +/- HGF pasó por análisis de micromatriz tal como se describe en los Ejemplos. RMA= micromatriz relativa. B) El knockdown de C-met redujo la expresión de ligandos EGFR en la línea de célula de NSCLC independiente de ligando EBC-1. Los clones que expresan de manera estable shRNA direccionado contra c-met (clones 3-15 y 4-12) no se trataron (no Dox) o se trataron con Doxyciclina (Dox) durante 24 o 48 horas. El RNA de las células se sometió a un análisis de micromatriz tal como se describió en los Ejemplos. C) La célula EBC1shMet4-12 que expresa de manera estable shRNA se direccionó contra c-met no se trataron (No Dox) o se trataron con Dox (Dox) durante 24 horas sin HGF (No HGF) o con HGF (100ng/ml) durante 2 horas. El RNA de las células se sometió a análisis de micromatriz tal como se describió en los Ejemplos. D) Las células EBCshMet4-12 que expresen de manera estable shRNA direccionado contra células c-met y de control que expresen de manera estable shGFP2 no fueron tratadas (No Dox) o fueron tratadas con Dox (Dox) durante 24 horas. El RNA de las células se sometió a un análisis de micromatriz tal como se lo describió en los Ejemplos. E) Los tumores de las células EBC1shMet-4,12 o EBCshMet-3,15 se establecieron en animales desnudos (CRL nu-nu) y se les dio a los ratones agua potable con 1mg/ml Dox (Dox) en 5% de sacarosa o 5% de sacarosa solamente. Luego de 3 días, los niveles TGF α en los lisatos del tumor fueron evaluados mediante ELISA.

FIGURAS 10A-C: (A) Las células EBCshMet 4,12 o EBCshGFP2 no fueron tratadas (-) o fueron tratadas con Dox (+) durante 24, 48 o 72 horas. Los lisatos de proteína se evaluaron para c-met, pEGFR o Her3 mediante western blot. (B) Las células EBCshMet 4,12 se trataron con Dox (100ng/ml) durante 48 horas y se analizaron por medio de FACS por la superficie de la célula Her3. (C) Se les dio a los ratones con tumores EBCshMet 4,12 agua potable con 1mg/ml Dox en 5% de sacarosa (Dox) o 5% de sacarosa solamente (Sacarosa) durante 3 días. Se evaluaron los lisatos de los tumores por la proteína Her3 por medio de western blot.

FIGURA 11: Las células EBC-1 shMet (3,15 o 4,5 o 4,12) no se trataron (–) o se trataron con 100ng/ml de Dox (+) durante 96 horas solo o con HGF (5 o 100ng/ml) o TGF α (1 o 50nM) sumadas a las 48 horas posteriores a la iniciación del tratamiento de Dox. Se evaluó la cantidad de células mediante el uso de Cell Titer Glo.

FIGURA 12: Se llevó a cabo un experimento de de curso temporal con células NCI-H596 en presencia (paneles derechos) o ausencia (paneles izquierdos) de HGF. Los lisatos celulares se prepararon a 10 minutos (10'), 24 horas, 48 horas o 72 horas (hr) luego de la estimulación y se efectuaron western blots a los efectos de detectar la c-met total (panel superior), el fosfo-EGFR (2do panel) y el EGFR total (3er panel). Se detectó la Beta-Actina (β -Actina) (4to panel) para mostrar cargas equivalentes entre los canales.

FIGURA 13: Se recubrieron las células NCI-H596 en ausencia de ligandos, en presencia de solo TGF- α , TGF- α + HGF o solo HGF. Se prepararon los lisatos de células a 10 minutos (10 min) y a 24 horas (hr) luego de la estimulación y se efectuaron las inmunoprecipitaciones (IP) para c-met seguido de western blot para fosfo-tirosina (4G10; panel superior), c-met (2do panel) y EGFR (3er panel). Los blots de fosfo-tirosina muestran una activación de EGFR (banda superior) y c-met (banda inferior) en una forma ligando-dependiente, que se atenúa luego de las 24 horas. La inmunoprecipitación de C-met disminuyó EGFR en todas sus condiciones independientemente del estado de activación de EGFR o de c-met.

FIGURA 14: Los ensayos de viabilidad se llevaron a cabo con células NCI-H596 para evaluar la reacción de las células a erlotinib en presencia de TGF α y en concentraciones variadas de HGF tal como se indica. La reducción en respuesta relativa a erlotinib se detectó dado que los niveles HGF aumentaron de 0,5 ng/ml a 50 ng/ml.

FIGURA 15: Se efectuaron los ensayos de viabilidad con células NCI-H596 en la presencia de TGF α y HGF (50 ng/ml), con o sin MetMAb (1 μ M), y concentraciones variadas de erlotinib. Los datos se representan como porcentajes de controles no tratados. Los valores de control no tratados se muestran como

puntos individuales en la parte superior izquierda de la figura.

FIGURA 16: El tratamiento de combinación con MetMAB y Erlotinib resultó en una inhibición m efectiva de fosfo-Akt y fosfo-ERK1/2. Los tumores NCI-H596 humanos HGF-transgénicos-SCID (hu-HGF-Tg-SCID) que tienen los ratones fueron tratados con vehículos (MetMAB buffer (100 μ L, IP) y metilcelulosa tween (MCT, 100 μ L, PO), MetMAB ((30 mg/kg, IP, una vez) y MCT), erlotinib ((100 mg/kg en MCT, 100 μ L, PO) y MetMAB buffer (100 μ L, IP)) o MetMAB y erlotinib (la misma dosificación descrita para cada uno). La dosis de MetMAB (o buffer) se impartió a las cero horas (t 0 hr), la dosis de erlotinib (o MCT) se impartió a las dieciocho horas (t 18 hrs), los ratones se sacrificaron y los tumores fueron recolectados a la hora veinticuatro (t 24 hr). Se analizaron los lisatos de los tumores por las proteínas totales y las fosfoproteínas por medio de Western blot directo y la inmunoprecipitación seguido de Western blot. Las abreviaciones: pTyr = fosfo-tirosina, EGFR = receptor de factor de crecimiento epidérmico, ERK (quinasa regulada por señal extracelular 1 y 2. Se detectó Beta-Actina (β -Actina) para mostrar cargas equivalentes entre los canales.

LAS FIGURAS 17A y 17B: muestra diagramáticamente algunos de los resultados descritos en la presente aplicación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Definiciones:

El término "factor de crecimiento de hepatocito" o "HGF", tal como se utiliza en la presente, hace referencia, a menos que se indique lo contrario, a todo polipéptido HGF nativo o variante (ya sea nativo o sintético) que sea capaz de activar la vía de señalización HGF/c-met bajo condiciones que permitan que ocurra dicho proceso. El término "HGF del tipo salvaje" generalmente hace referencia a un polipéptido que comprende la secuencia de amino ácido de una proteína HGF que ocurre naturalmente. El término "Secuencia HGF del tipo salvaje" generalmente hace referencia a una secuencia de amino ácido que se encuentra en un HGF que ocurre naturalmente. C-met constituye un receptor conocido de HGF a través del cual la señalización intracelular HGF se efectúa biológicamente.

El término "variante HGF" tal como se utiliza en la presente hace referencia a un polipéptido HGF que incluye una o más mutaciones de amino ácidos en la secuencia HGF nativa. Opcionalmente, una o más mutaciones de amino ácido incluyen sustituciones de amino ácido.

Un polipéptido de "secuencia nativa" comprende un polipéptido que tenga la misma secuencia de amino ácido que un polipéptido natural. Por ende, una secuencia nativa de polipéptidos puede tener la secuencia de amino ácido de polipéptidos naturales de todo mamífero. Dicho polipéptido de secuencia nativa se puede aislar de la naturaleza o se puede producir por medios recombinantes o sintéticos. El término polipéptido de "secuencia nativa" específicamente abarca formas del polipéptido naturalmente truncadas o segregadas (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas de variantes naturales (por ejemplo, formas empalmadas de manera alternativa) y variantes alélicas de polipéptidos naturales.

Una "variante" de polipéptido hace referencia a un polipéptido activo biológicamente que tenga, al menos, alrededor de 80% de identidad de secuencia amino ácido con el polipéptido de secuencia nativa. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se agreguen o se borren uno o más residuos amino ácidos, en la N- o C-terminal del polipéptido. Normalmente, una variante tendrá, al menos alrededor de un 80% de identidad de la secuencia del amino ácido, más preferentemente, al menos alrededor de 90% de identidad de la secuencia de amino ácido e incluso más preferentemente, al menos alrededor de 95% de identidad de la secuencia del amino ácido con el polipéptido de secuencia nativa.

Por "EGFR" (intercambiable por los términos "ErbB1", "HER1" y "receptor de factor de crecimiento epidérmico") se hace referencia al polipéptido tirosina quinasa de receptor o Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico que se describe en Ullrich et al, *Naturaleza* (1984) 309:418425, alternativamente, conocido como Her-1 y el producto de gen c-erbB, así como también variantes de los mismos, tales como EGFRvIII. También se incluyen entre las variantes de EGFR variantes de remoción, sustitución e inserción, por ejemplo, aquellos descritos en Lynch et al

7
M

(New England Journal of Medicine 2004, 350:2129), Paez et al (Science 2004, 304:1497), Pao et al (PNAS 2004, 101:13306).

Una "muestra biológica " (intercambiable por los términos "muestra" o "muestra de tejido o célula") abarca una variedad de tipos de muestras obtenidos de una persona y que pueden utilizarse en el diagnóstico o ensayo de monitoreo. La definición abarca muestras de sangre y otros líquidos de origen biológico, muestras de tejido sólido tales como un espécimen de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas del mismo, y la progenie del mismo. La definición también incluye muestras que han sido manipuladas de alguna forma luego de su obtención, tal como por el tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento de algunos componentes, tales como proteínas o polinucleótidos o incrustación en una matriz sólida o semi-sólida a los efectos de la división. El término "muestra biológica " abarca una muestra clínica y también incluye células en cultivos, células supernatantes, lisatos de células, suero, plasma, fluido biológico y muestras de tejido. La fuente de muestra biológica puede ser tejido sólido tal como de una muestra de órgano o tejido fresco, congelado y/o preservado o una biopsia o un aspirado; sangre o constituyentes de la sangre; fluidos corporales tales como fluido espinal cerebral, fluido amniótico, fluido peritoneal, o fluido intersticial; las células en cualquier momento de la gestación o el desarrollo del sujeto. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de un tumor primario o metastático. La muestra biológica puede contener compuestos que no se mezclan naturalmente con el tejido en la naturaleza tales como conservantes, anticoagulantes, buffers, fijadores, nutrientes, antibióticos, o similares.

Un "antagonista de c-met" (intercambiable por término "inhibidor de c-met") constituye un agente que interfiere con la activación o la función de c-met. Algunos ejemplos de inhibidores de c-met incluyen anticuerpos c-met; anticuerpos HGF; antagonistas de c-met de molécula pequeña; inhibidores tirosina quinasa de c-met; antisentido e inhibidor moléculas de RNA (por ejemplo, shRNA) (ver, por ejemplo, WO2004/87207). Preferentemente, el inhibidor de c-met es un anticuerpo o una molécula pequeña que se une a c-met. En una realización particular, un

Contestación de la adición de la demanda de Acción Popular instaurada por los señores Darío Martínez Santa Cruz y Viviana Rodríguez Estrada contra las Compañías Aéreas de Transporte Público de Pasajeros y contra la

inhibidor de c-met tiene una afinidad de unión (constante de disociación) a c-met de alrededor de 1.000 nM o menos. En otra realización, un inhibidor c-met tiene una afinidad de unión a c-met de alrededor de 100 nM o menos. En otra realización, un inhibidor de c-met tiene una afinidad de unión a c-met de alrededor de 50 nM o menos. En una realización particular, un inhibidor de c-met se une covalentemente a c-met. En una realización particular, un inhibidor de c-met inhibe la señalización de c-met con un IC₅₀ de 1,000 nM o menos. En otra realización, un inhibidor de c-met inhibe señalización de c-met con un IC₅₀ de 500 nM o menos. En otra realización, un inhibidor de c-met inhibe señalización de c-met con un IC₅₀ de 50 nM o menos.

Como se utiliza en el presente, el término “droga con objetivo c-met” hace referencia a un agente terapéutico que se une a c-met e inhibe la activación de c-met. Un ejemplo de una droga con objetivo c-met es MetMAb (OA5D5.v2).

La “activación de C-met” hace referencia a la activación o fosforilación del receptor de c-met. Generalmente, la activación c-met resulta en una transducción de señal (por ejemplo, que, causado por un dominio de quinasa intracelular de una tirosina fosforilante de receptor c-met culmina en c-met o un sustrato de polipéptido). La activación de c-met puede mediar por ligandos de c-met (HGF) que se unen a un receptor de interés de c-met. HGF que se une a c-met puede activar un dominio de quinasa de c-met y, por lo tanto, resultar en la fosforilación de residuos de tirosina en el c-met y/o fosforilación de residuos de tirosina en polipéptido(s) de sustrato adicional(es).

Un “antagonista de EGFR” (intercambiable por el término “inhibidor de EGFR”) es un agente que interfiere con la activación o la función EGFR. Se incluyen entre los ejemplos de inhibidores de EGFR anticuerpos EGFR; anticuerpos ligandos EGFR; antagonistas de EGFR de moléculas pequeñas; inhibidores tirosina quinasa de EGFR; antisentido e inhibidor de moléculas de RNA (por ejemplo, shRNA) (ver, por ejemplo, WO2004/87207). Preferentemente, el inhibidor de EGFR constituye un anticuerpo o una molécula pequeña que se une a EGFR. En algunas realizaciones, el inhibidor de EGFR constituye una droga con

objetivo a EGFR. En una realización particular, un inhibidor de EGFR tiene una afinidad de unión (constante de disociación) a EGFR de alrededor de 1.000 nM o menos. En otra realización, un inhibidor de EGFR tiene una afinidad de enlace con EGFR de alrededor de 100 nM o menos. En otra realización, un inhibidor de EGFR tiene una afinidad de unión a EGFR de alrededor de 50 nM o menos. En una realización particular, un inhibidor de EGFR se encuentra unido covalentemente a EGFR. En una realización particular, un inhibidor de EGFR inhibe la señalización de EGFR con un IC₅₀ de 1.000 nM o menos. En otra realización, un inhibidor de EGFR inhibe la señalización de EGFR con un IC₅₀ de 500 nM o menos. En otra realización, un inhibidor de EGFR inhibe la señalización de EGFR con un IC₅₀ de 50 nM o menos.

Las expresiones "ErbB2" y "HER2" se utilizan de manera intercambiable en la presente y hacen referencia a la proteína HER2 humana descrita, por ejemplo, en Semba et al., PNAS (USA) 82:6497–6501 (1985) y Yamamoto et al. Nature 319:230–234 (1986) (Número de acceso al banco de genes X03363). El término "erbB2" hace referencia al gen que codifica ErbB2 humano y "neu" hace referencia al gen que codifica p185^{neu} de rata. HER2 preferido consiste de HER2 humano de secuencia nativa.

"ErbB3" y "HER3" hace referencia al polipéptido de receptor tal como se reveló, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos número 5.183.884 y 5.480.968 así como también Kraus et al. PNAS (USA) 86:9193–9197 (1989).

Los términos "ErbB4" y "HER4" que aparecen en la presente hacen referencia al polipéptido receptor tal como se reveló, por ejemplo, en EP Pat Appln No 599.274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746–1750 (1993); y Plowman et al., Nature, 366:473–475 (1993), incluyendo las isoformas de las mismas, por ejemplo, según se revelan en WO99/19488, publicadas el 22 de abril de 1999.

Tal como se utilizan en la presente, "ErbB" hace referencia a los polipéptidos receptores EGFR, HER2, HER3, y HER4.

"Activación EGFR" hace referencia a la activación o fosforilación de EGFR.

Generalmente, la activación EGFR resulta en la transducción de señal (por ejemplo, que, causado por un dominio de quinasa intracelular de una tirosina fosforilante de receptor de EGFR culmina en EGFR o un sustrato de polipéptido). La activación de EGFR puede mediar por ligando de EGFR de unión a un dímero de EGFR que comprende EGFR. El ligando de EGFR que se une a un dímero EGFR puede activar un dominio de quinasa de uno o más de los EGFR en el dímero y, de ese modo, resulta en fosforilación de residuos de tirosina en uno o más EGFR y/o fosforilación de residuos de tirosina en polipéptido(s) de sustrato adicional(es).

Según su utilización en el presente, el término “droga con objetivo EGFR” hace referencia a un agente terapéutico que se une a EGFR e inhibe la activación EGFR. Se incluyen entre dichos agentes anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Se incluyen entre los ejemplos de los anticuerpos que se unen a EGFR MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (ver, patente de los Estados Unidos número 4.943. 533, Mendelsohn et al.) y las variantes del mismo, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano reformado (H225) (ver, WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo totalmente humano, con objetivo EGFR (Imclone); anticuerpos que unen al EGFR mutante tipo II (Patente de Estados Unidos número 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que unen EGFR tal como se describe en la patente de Estados Unidos número 5.891.996; y anticuerpos humanos que unen EGFR, tales como ABX-EGF (ver WO98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo EGFR humanizado direccionado contra EGFR que compite tanto con EGF como TGF-alfa por la unión EGFR; y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR se puede conjugar con un agente citotóxico, de ese modo generando una inmunoconjugación (ver, por ejemplo, EP659,439A2, Merck Patent GmbH). Se incluyen entre los ejemplos de moléculas que se unen a EGFR ZD1839 o Gefitinib (IRESSA; Astra Zeneca); CP-

358774 o Erlotinib (TARCEVA™; Genentech/OSI); y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen); EMD-7200.

Cáncer "Resistente a EGFR" hace referencia a que el paciente de cáncer ha progresado al recibir una terapia antagonista de EGFR (es decir, el paciente es "refractario a EGFR"), o el paciente ha progresado dentro de los 12 meses (por ejemplo, dentro del primer, segundo, tercer o sexto mes) luego de completar un régimen de terapia basado en antagonista de EGFR. Por ejemplo, los cánceres que incorporan EGFR mutante T790M son resistentes a las terapias erlotinib y gefitinib.

Cáncer "resistente a erlotinib o gefitinib" se hace referencia a que el paciente de cáncer ha progresado mientras recibía una terapia basada en erlotinib o gefitinib (es decir, el paciente es "refractario a erlotinib o gefitinib"), o el paciente ha progresado dentro de los 12 meses (por ejemplo, dentro del primer, segundo, tercer o sexto mes) luego de completar un régimen de terapia basado en erlotinib o gefitinib.

El término "independiente de ligando" tal como se utiliza en la presente, por ejemplo aplicado a la actividad de señalización del receptor, hace referencia a la actividad de señalización que no depende de la presencia de un ligando. Por ejemplo, la señalización EGFR puede resultar de la dimerización con otros miembros de la familia HER tal como HER2. Un receptor que tenga actividad quinasa independiente de ligando no necesariamente imposibilitará la unión del ligando con aquél receptor para producir la activación adicional de la actividad quinasa.

El término "constitutivo" tal como se utiliza en la presente, por ejemplo aplicado a una actividad quinasa del receptor, hace referencia a la actividad de señalización continua de un receptor que no sea dependiente en la presencia de un ligando u otras moléculas de activación. Por ejemplo, el III variante EGFR (EGFRvIII) que normalmente se encuentra en un glioblastoma multiforme ha borrado mucho de su dominio extracelular. A pesar de que los ligandos no pueden unir a EGFRvIII, se encuentra continuamente activo y se asocia con la proliferación

y la supervivencia anormal. Dependiendo de la naturaleza del receptor, toda la actividad puede ser constitutiva o la actividad del receptor puede ser activada por la unión de otras moléculas (por ejemplo, ligandos). Los eventos celulares que llevan a la activación de receptores son conocidos entre aquellos normalmente versados en la técnica. Por ejemplo, la activación puede incluir la oligomerización, por ejemplo, dimerización, trimerización, etc., en complejos receptores de mayor orden. Los complejos pueden incluir una sola especie de proteína, es decir, un complejo homomérico. De manera alternativa, los complejos pueden comprender al menos dos especies diferentes de proteína, es decir, un complejo heteromérico. La formación de complejos puede ser causada por, por ejemplo, la sobre expresión de formas normales o mutantes de receptores en la superficie de una célula. La formación de un complejo también puede ser causado por una mutación específica o por mutaciones en un receptor.

La frase "amplificación de gen " hace referencia a un proceso mediante el cual múltiples copias de un gen o de un fragmento de un gen se forman en una célula en particular o en una línea celular. Se hace referencia a la región duplicada (una extensión de ADN amplificado) generalmente con el nombre de "amplicón". Generalmente, la cantidad del RNA (mRNA) mensajero producido, es decir, el nivel de expresión del gen, también aumenta en la proporción de la cantidad de copias realizadas de un gen particular expresado.

Un "inhibidor tirosina quinasa " es una molécula que inhibe hasta cierto punto la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa tal como un receptor c-met.

Una muestra cancerígena o biológica que "exhibe expresión, amplificación o activación c-met y/o EGFR" es aquella que, en una prueba de diagnóstico, expresa (incluyendo sobreexpresa) c-met y/o EGFR, ha amplificado el gen c-met y/o EGFR, y/o demuestra de otro modo la activación o fosforilación de una c-met y/o EGFR.

Una muestra cancerígena o biológica que "no exhibe expresión, amplificación o activación c-met y/o EGFR" es aquella que, en una prueba de

diagnóstico, no expresa (incluyendo sobreexpresa) c-met y/o EGFR, no ha amplificado el gen c-met y/o EGFR, y/o no demuestra de otro modo la activación o fosforilación de una c-met y/o EGFR.

Una muestra cancerígena o biológica que “exhibe la activación c-met y/o EGFR” es aquella que, en una prueba de diagnóstico, demuestra activación o fosforilación de c-met y/o EGFR. Dicha activación puede determinarse directamente (por ejemplo, mediante la medición de la fosforilación c-met y/o EGFR por medio de ELISA) o indirectamente.

Una muestra cancerígena o biológica que “no exhibe la activación c-met y/o EGFR” es aquella que, en una prueba de diagnóstico, no demuestra activación o fosforilación de una c-met y/o EGFR. Dicha activación puede determinarse directamente (por ejemplo, mediante la medición de la fosforilación de c-met y/o EGFR por medio de ELISA) o indirectamente.

Una muestra cancerígena o biológica que “exhibe la activación constitutiva de c-met y/o EGFR” es aquella que, en una prueba de diagnóstico, demuestra activación constitutiva o fosforilación de una c-met y/o EGFR. Dicha activación puede determinarse directamente (por ejemplo, mediante la medición de la fosforilación de c-met y/o EGFR por medio de ELISA) o indirectamente.

Una muestra cancerígena o biológica que “no exhibe amplificación c-met y/o EGFR” es aquella que, en una prueba de diagnóstico, no tiene gen de c-met y/o EGFR amplificado.

Una muestra cancerígena o biológica que “exhibe amplificación de c-met y/o EGFR” es aquella que, en una prueba de diagnóstico, ha amplificado el gen de c-met y/o EGFR.

Una muestra cancerígena o biológica que “no exhibe activación de c-met y/o EGFR constitutiva” es aquella que, en una prueba de diagnóstico, no demuestra activación o fosforilación constitutiva de una c-met y/o EGFR. Dicha activación puede ser determinada directamente (por ejemplo, mediante la medición de la fosforilación de c-met y/o EGFR por medio de ELISA) o indirectamente.

Una muestra cancerígena o biológica que “exhibe activación de c-met y/o

EGFR independiente de ligando" es aquella que, en una prueba de diagnóstico, demuestra activación independiente de ligando o fosforilación de un c-met y/o EGFR. Dicha activación puede ser determinada directamente (por ejemplo, mediante la medición de la fosforilación de c-met y/o EGFR por medio de ELISA) o indirectamente.

Una muestra cancerígena o biológica que "no exhibe activación de c-met y/o EGFR independiente de ligando" es aquella que, en una prueba de diagnóstico, demuestra activación independiente de ligando o fosforilación de un c-met y/o EGFR. Dicha activación puede ser determinada directamente (por ejemplo, mediante la medición de la fosforilación c-met y/o EGFR fosforilación por medio de ELISA) o indirectamente.

Un "ensayo fosfo-ELISA" en la presente constituye un ensayo en el que la fosforilación de uno o más c-met y/o EGFR se evalúa en un ensayo inmunsorbente enzima-ligado (ELISA) mediante el uso de un reactivo, generalmente un anticuerpo, para detectar c-met y/o EGFR fosforilado, sustrato o molécula de señalización corriente abajo. Preferentemente, se utiliza un anticuerpo que detecta c-met y/o EGFR fosforilado. El ensayo puede llevarse a cabo en lisatos de células, preferentemente de muestras biológicas frescas o congeladas.

Una célula cancerígena con "amplificación o sobreexpresión de c-met y/o EGFR" es aquella que posee niveles significativamente superiores a una proteína o gen de c-met y/o EGFR, en comparación con una célula no cancerígena del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede ser causada por la amplificación del gen o por una mayor transcripción o traducción. La amplificación o sobreexpresión de c-met y/o EGFR puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico mediante la evaluación de los niveles aumentados de la proteína de c-met y/o EGFR que se encuentra presenta en la superficie de la célula (por ejemplo, vía un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). De manera alternativa o adicional, se pueden medir los niveles del ácido nucleico codificado de c-met y/o EGFR —, por ejemplo, vía hibridación in situ fluorescente (FISH; ver WO98/45479 publicado en octubre, 1998), southern blot o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR),

tales como tiempo real cuantitativo PCR (qRT-PCR). Además de los ensayos antes mencionados, se encuentran disponibles varios ensayos en vivo para practicantes habilitados. Por ejemplo, se pueden exponer las células dentro del cuerpo de un paciente a un anticuerpo que se etiquete opcionalmente con una etiqueta detectable, por ejemplo un isótopo radioactivo, se puede evaluar la unión del anticuerpo a las células en el paciente, por ejemplo mediante escaneo externo de radioactividad o mediante análisis de una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

Una célula cancerígena que “no sobreexpresa o amplifica c-met y/o EGFR” es aquella que no tiene niveles mayores a los usuales de proteína o gen de c-met y/o EGFR en comparación con una célula no cancerígena del mismo tipo de tejido.

El término “mutación”, tal como se utiliza en la presente, hace referencia a una diferencia en la secuencia del ácido amino o ácido nucleico de una proteína o ácido nucleico particular (gen, RNA) relativo a la proteína del tipo salvaje o al ácido nucleico, respectivamente. Una proteína mutante o ácido nucleico puede expresarse desde o puede encontrarse en un alelo (heterocigoto) o ambos alelos (homocigotos) de un gen y pueden ser somáticos o línea de gérmenes. En la invención instantánea, las mutaciones generalmente son somáticas. Se incluyen entre las mutaciones, reordenamientos de secuencia tales como las inserciones, las eliminaciones y las mutaciones de puntos (incluyendo polimorfismos de amino ácido/ nucleótidos simples).

“Inhibir” implica disminuir o reducir una actividad, función y/o cantidad, según se compara con una referencia.

“Expresión” de proteína hace referencia a una conversión de la información codificada en un gen en el RNA mensajero (mRNA) y luego a la proteína.

En la presente, una muestra o célula que “expresa” una proteína de interés (tal como un receptor HER o un ligando HER) es aquél en que se determina que se encuentra presente en la muestra o en la célula el mRNA que codifica a la proteína o la proteína, incluyendo fragmentos de la misma.

Un “inmunoconjugado” (intercambiable por “conjugado anticuerpo-droga” o

“ADC”) hace referencia a un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como un agente quimioterapéutico, una droga, un agente inhibitorio de crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina de proteína, una toxina activa enzimáticamente de bacteria, hongos, plantas, de origen animal o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugador).

El término “región Fc”, tal como se utiliza en la presente, generalmente hace referencia a un complejo dímero que comprende las secuencias de polipéptidos de C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, en donde una secuencia de polipéptidos de C-terminal es aquella que se obtiene por la digestión papaica de un anticuerpo intacto. La región Fc puede comprender secuencias Fc nativas o variantes. A pesar de que los límites de la secuencia Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la secuencia Fc de cadena pesada IgG humana generalmente se define de modo tal de extender desde un residuo de amino ácido de la posición Cys226 aproximadamente, o desde la posición Pro230 aproximadamente, a la terminal carboxil de la secuencia Fc. La secuencia Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4. La lisina C-terminal (447 residuo de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede removerse, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o mediante la ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica al anticuerpo. Consecuentemente, una composición que comprende un anticuerpo que tiene una región Fc de acuerdo con esta invención puede comprender un anticuerpo con K447, con la totalidad de K447 removido o una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo de K447.

“Polipéptido Fc” en el presente hace referencia a uno de los polipéptidos que forman una región Fc. Se puede obtener un polipéptido Fc de toda inmunoglobulina adecuada, tal como IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄ subtipos, IgA, IgE, IgD o IgM. En algunas realizaciones, un polipéptido Fc comprende parte o la totalidad de una secuencia de bisagra del tipo salvaje (generalmente en su terminal N). En algunas realizaciones, un polipéptido Fc no comprende una secuencia de bisagra del tipo

salvaje o funcional.

La "región de bisagra," "secuencia de bisagra", y las variaciones de los mismos, según su utilización en la presente, incluye el significado conocido en la técnica, que se encuentra ilustrado en, por ejemplo, Janeway et al., *Immunology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (4ta ed., 1999); Bloom et al., *Protein Science* (1997), 6:407–415; Humphreys et al., *J. Immunol. Methods* (1997), 209:193–202.

A través de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, la numeración de los residuos en una cadena pesada de inmunoglobulina consiste de aquella del índice EU tal como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), incorporado de manera expresa en la presente a modo de referencia. El "índice EU como en Kabat" hace referencia a la numeración de residuo del anticuerpo EU IgG1 humano.

El término "anticuerpo" se utiliza en su sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes y fragmentos de anticuerpos siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

"Fragmentos de anticuerpos" comprende solo una porción de un anticuerpo intacto, en donde la porción retiene preferentemente al menos una, preferentemente la mayoría o la totalidad, de las funciones normalmente asociadas con esa porción cuando se encuentran presentes en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de un anticuerpo comprende un lugar de unión al antígeno del anticuerpo intacto y por ende retiene la habilidad de unión al antígeno. En otra realización, un fragmento del anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando se encuentran presentes en un anticuerpo intacto, tal como unión FcRn, modulación de vida media del anticuerpo,

función ADCC y unión de complemento. En una realización, un fragmento del anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una vida media in vivo sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento del anticuerpo puede comprender un brazo de unión al antígeno unido a la secuencia Fc capaz de conferir estabilidad in vivo al fragmento. En una realización, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de un brazo, tal como se describe en WO2005/063816. En una realización, el anticuerpo de un brazo comprende mutaciones Fc que constituyen “perillas” y “agujeros” tal como se describe en WO2005/063816. Por ejemplo, una mutación de agujero puede ser uno o más T366A, L368A y/o Y407V en un Polipéptido Fc, y una mutación de cavidad puede ser T366W.

Un anticuerpo “de bloqueo” o un anticuerpo “antagonista” es aquél que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno que une. Los anticuerpos de bloqueo preferidos o los anticuerpos antagonistas inhiben completamente la actividad biológica del antígeno.

A menos que se indique lo contrario, la expresión “anticuerpo multivalente” se utiliza a través de esta memoria descriptiva para denotar un anticuerpo que comprende tres o más sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente se diseña preferentemente para tener tres o más lugares de unión al antígeno y generalmente no es una secuencia nativa de anticuerpo IgM o IgA.

Un fragmento “Fv” es un fragmento de anticuerpo que contiene un reconocimiento al antígeno y un lugar de unión completo. Esta región consiste de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y de cadena liviana en fuerte asociación, que puede ser covalente en naturaleza, por ejemplo en scFv. En esta configuración, los tres CDRs de cada dominio variable interactúan para definir un lugar de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L . De manera colectiva, los seis CDRs o un subconjunto del mismo confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aún un dominio variable único (o la mitad de una Fv que comprende solo tres CDRs específicos para un antígeno) tiene la habilidad de reconocer y unir al antígeno, a pesar de que sea generalmente con

una afinidad menor que el lugar de unión entero.

Según su utilización en la presente, "dominio variable del anticuerpo" hace referencia a las porciones de las cadenas pesadas y livianas de moléculas de anticuerpo que incluyen secuencias de amino ácido de Regiones de Determinación de Complementariedad (CDRs; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3), y Regiones de Marcos (FRs). V_H hace referencia al dominio variable de la cadena pesada. V_L hace referencia al dominio variable de la cadena liviana. De acuerdo con los métodos utilizados en la presente invención, las posiciones de amino ácido asignadas a CDRs y FRs pueden definirse de acuerdo con Kabat (*Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Public Health Service, National Institutes of Health, Md., 1987 y 1991)). La numeración de amino ácido de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno también es conforme a aquella de Kabat.

Según su utilización en la presente, el término "Regiones de Determinación de Complementariedad" (CDRs; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) hacen referencia a los residuos de amino ácido de un dominio variable de anticuerpo, la presencia del cual es necesaria para la unión al antígeno. Cada dominio variable tiene típicamente tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región de determinación de complementariedad puede comprender residuos de amino ácidos de una "región de determinación de complementariedad" según la definición de Kabat (es decir alrededor de residuos de 24–34 (L1), 50–56 (L2) y 89–97 (L3) en un dominio variable de cadena liviana 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*, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, alrededor de residuos 26–32 (L1), 50–52 (L2) y 91–96 (L3) en el dominio variable de cadena liviana y 26–32 (H1), 53–55 (H2) y 96–101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901–917 (1987)). En algunas instancias, una región de determinación de complementariedad puede incluir amino ácidos tanto de una región CDR definida de acuerdo con Kabat y un bucle hipervariable. Por ejemplo, la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo

4D5 incluye 26 a 35 amino ácidos.

“Regiones de marco” (en adelante, FR) son aquellos residuos de dominio variable que no son los residuos CDR. Cada dominio variable tiene típicamente 4 FRs identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si las CDRs se definen de acuerdo con Kabat, los residuos FR de cadena liviana se posicionan a alrededor de residuos 1–23 (LCFR1), 35–49 (LCFR2), 57–88 (LCFR3), y 98–107 (LCFR4) y los residuos FR de cadena pesada se posicionan a alrededor de residuos 1–30 (HCFR1), 36–49 (HCFR2), 66–94 (HCFR3) y 103–113 (HCFR4) en los residuos de cadena pesada. En caso de que las CDRs comprendan residuos amino ácidos de bucles hipervariables, los residuos FR de la cadena liviana se posicionan a alrededor de residuos 1–25 (LCFR1), 33–49 (LCFR2), 53–90 (LCFR3), y 97–107 (LCFR4) en la cadena liviana y los residuos FR de la cadena pesada se posicionan a alrededor de residuos 1–25 (HCFR1), 33–52 (HCFR2), 56–95 (HCFR3) y 102–113 (HCFR4) en los residuos de cadena pesada. En algunas instancias, cuando la CDR comprende amino ácidos tanto de CDR según la definición de Kabat como aquellos de un bucle hipervariable, los residuos FR se ajustarán adecuadamente. Por ejemplo, cuando CDRH1 incluye amino ácidos H26–H35, los residuos FR1 de la cadena pesada se encuentran en las posiciones 1–25 y los residuos FR2 se encuentran en las posiciones 36–49.

El fragmento “Fab” contiene un dominio variable y constante de la cadena liviana y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de los anticuerpos $F(ab')_2$ comprenden un par de fragmentos Fab que generalmente se unen covalentemente cerca de la terminal carboxi mediante cisteínas bisagras entre ellos. Otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpos son conocidos en la técnica.

Los fragmentos de anticuerpo “Cadena–única Fv” o “scFv” comprenden dominios V_H y V_L de anticuerpo, donde estos dominios se encuentran presentes en una cadena de polipéptidos única. Generalmente, el polipéptido Fv además comprende un conector polipéptido entre los dominios V_H y V_L , que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para la revisión del scFv,

ver Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269–315 (1994).

El término “diacuerpos” hace referencia a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos lugares de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena liviana (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H y V_L). Por medio del uso de un conector que es demasiado corto para permitir la conexión entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan para complementarse con los dominios de complementariedad de otra cadena y crear dos lugares de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444–6448 (1993).

La expresión “anticuerpos lineales” hace referencia a los anticuerpos descritos en Zapata et al., *Protein Eng.*, 8(10):1057–1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd tandem (V_H – C_H1 – V_H – C_H1) que, juntos con polipéptidos de cadena liviana complementarios, forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden biespecíficos o monoespecíficos.

El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo tal como se lo obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no se interpretará que se requerirá una producción de anticuerpos por cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizarán de conformidad con la presente invención pueden ser utilizados por medio de una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Naturaleza*, 256:495–97 (1975); Hongo et al., *Hibridoma*, 14 (3): 253–260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hibridomas* 563–681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos número 4.816.567), tecnologías de exposición en fago (ver, por ejemplo,

Clackson et al., *Nature*, 352: 624–628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581–597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299–310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073–1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467–12472 (2004); and Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1–2): 119–132(2004), y tecnologías para la producción de anticuerpos humanos o parecidos a los humanos en animales que tengan una parte o la totalidad de loci inmunoglobulina humana o secuencias de inmunoglobulina humana de codificación de genes (ver, por ejemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255–258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); Patentes de Estados Unidos N° 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 Biotechnol.* 14: 845–851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65–93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales de la presente incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga con las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o una subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo con las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a una clase o una subclase particular de anticuerpo, así como también fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4,816,567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851–6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATIZED® donde la región de unión al antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido mediante, por ejemplo, monos macacos inmunizados con el antígeno de interés.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no-humanos (por ejemplo,

murino) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el que los residuos de una región hipervariable del receptor son reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, una rata, un conejo, o un primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunas instancias, los residuos (FR) de la región de marco Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo del donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todas o al menos una y típicamente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables correspondan con aquéllos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región (Fc) constante de inmunoglobulina, típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, ver 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).

Un “anticuerpo humano” es aquél que posee una secuencia de amino ácido que corresponde con aquella de un anticuerpo producido por un humano y/o ha sido realizado mediante el uso de toda técnica para realizar anticuerpos humanos de la manera revelada en la presente. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a todo anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de varias técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una librería de fago, donde dicha librería de fago expresa anticuerpos humanos (Vaughan et al. *Nature Biotechnology* 14:309–

314 (1996); Sheets et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:6157–6162 (1998)); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Los anticuerpos humanos también pueden realizarse mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en los animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivos. Al desafiarse, se observa la producción de anticuerpos humanos que se parece mucho a la vista en humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Se describe este enfoque, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779–783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856–859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812–13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14: 845–51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65–93 (1995). Alternativamente, el anticuerpo humano puede estar preparado vía immortalización de los linfocitos B humanos para la producción de anticuerpo direccionado contra el antígeno deseado (dichos linfocitos B pueden recuperarse de una persona o pueden inmunizarse in vitro). Ver, por ejemplo, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1):86–95 (1991); y patente de los Estados Unidos N° 5.750.373.

Un “anticuerpo desnudo” es un anticuerpo que no está conjugado con una molécula heteróloga, tal como una porción citotóxica o una radioetiquetada.

Un anticuerpo “de afinidad madura” es aquel que tiene una o más alteraciones en una o más de las CDRs del mismo que resultan en una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo progenitor que no posee aquellas alteraciones. Los anticuerpos de afinidad madura preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno deseado. Los anticuerpos de afinidad madura se producen por procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779–783

(1992) describe la maduración de la afinidad por medio del movimiento de dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los residuos del marco y/o de la CDR se describe en: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809–3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147–155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994–2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310–9 (1995); y Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889–896 (1992).

Un anticuerpo que tiene una “característica biológica” de un anticuerpo designado es aquél que posee uno o más características biológicas de aquél anticuerpo que se distinguen de otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno.

A los efectos de clasificar los anticuerpos que se unan a un epítipo en un antígeno unido por medio de un anticuerpo de interés, se puede llevar a cabo una rutina de ensayo de bloqueo cruzado tal como la descrita en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988).

Para incrementar la vida media de los anticuerpos o polipéptido que contienen las secuencias de amino ácido de esta invención, uno puede adjuntar un epítipo de unión al receptor salvaje (especialmente un fragmento del anticuerpo), según se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5.739.277. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica al epítipo de unión al receptor salvaje puede unirse en el marco con un ácido nucleico que codifique una secuencia de polipéptido de esta invención para que la proteína de fusión expresada por la molécula de ácido nucleico diseñada comprenda al epítipo de unión al receptor salvaje y una secuencia de polipéptido de la presente invención. Según su utilización en la presente, el término “epítipo de unión al receptor salvaje” hace referencia a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que sea responsable por el aumento de la vida media del suero in vivo de la molécula IgG (por ejemplo, Ghetie et al., *Ann. Rev. Immunol.* 18:739–766 (2000), Tabla 1). También se describen anticuerpos con sustituciones en una región Fc de la misma y las medias vidas aumentadas del suero en WO00/42072, WO 02/060919; Shields et al., *J. Biol. Chem.*



276:6591–6604 (2001); Hinton, J. Biol. Chem. 279:6213–6216 (2004)). En otra realización, la vida media del suero también puede aumentarse, por ejemplo, al adjuntar otras secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, anticuerpos u otros polipéptidos útiles en los métodos de la invención se pueden adjuntar al albúmina en suero o a una porción de albúmina en suero que une con el receptor FcRn o a un péptido de unión al albúmina en suero de modo tal que albúmina en suero se una al anticuerpo o al polipéptido, por ejemplo, dichas secuencias de polipéptidos se revelan en WO01/45746. En una realización preferida, el péptido de albúmina en suero a adjuntar comprende una secuencia de amino ácido DICLPRWGCLW (SEC ID N°:21). En otra realización, la vida media de Fab se aumenta por medio de estos métodos. Ver también, Dennis et al. J. Biol. Chem. 277:35035–35043 (2002) de las secuencias de péptidos de unión albúmina en suero.

Un polipéptido “aislado” o un anticuerpo “aislado” es aquél que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos del polipéptido o anticuerpo y podría incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceas o no proteináceas. En las realizaciones preferidas, el polipéptido o el anticuerpo se purificarán (1) a más de 95% en peso de polipéptido o anticuerpo según se determinó por medio del método Lowry y, más preferentemente más de 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de N-terminal o secuencia de amino ácido interna por medio del uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) a la homogeneidad por medio de SDS-PAGE bajo condiciones reducidas o no reducidas mediante el uso de azul de Coomassie o, preferentemente, tinte de plata. Un polipéptido aislado o un anticuerpo incluye al polipéptido o al anticuerpo in situ dentro de las células recombinantes dado que, al menos, un componente del ambiente natural del polipéptido no estará presente. Comúnmente, sin embargo, se preparará un polipéptido aislado o un anticuerpo por, al menos, un paso de purificación.

Se entenderá por “fragmento” una porción de un polipéptido o molécula de

ácido nucleico que contiene, preferentemente, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o más de la longitud entera de la molécula de ácido nucleico de referencia o polipéptido. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100, 200, 300, 400, 500, 600, o más nucleótidos o 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200 amino ácidos o más.

“Tratamiento” hará referencia tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquéllos que necesiten un tratamiento incluyen a aquellos que ya cuentan con un tumor benigno, precancerígeno o no metastático así como también aquellos en los que la aparición o recurrencia del cáncer se prevendrá.

El término “cantidad efectiva terapéuticamente” hace referencia a una cantidad de un agente terapéutico para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o desorden en un mamífero. En el caso de los cánceres, la cantidad efectiva terapéuticamente del agente terapéutico podría reducir la cantidad de células cancerígenas; reducir el tamaño del tumor primario; inhibir (es decir, disminuir la velocidad hasta cierto punto y preferentemente parar) la infiltración de la célula cancerígena en órganos periféricos; inhibir (es decir, disminuir hasta cierto punto y preferentemente parar) la metástasis del tumor; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento del tumor; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Hasta el punto en que la droga podría prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerígenas existentes, podría ser citoestático y/o citotóxico. Respecto de la terapia del cáncer, la eficacia in vivo puede, por ejemplo, medirse por medio de la evaluación de la duración de supervivencia, del tiempo de progresión de la enfermedad (TTP), de la velocidad de la respuesta (RR), duración de la respuesta y/o calidad de vida.

Los términos “cáncer” y “cancerígeno” hacen referencia o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por el crecimiento celular irregular. Se incluyen en la definición los cánceres benignos y malignos. “Cáncer en una etapa temprana” o “tumor en una etapa temprana” hace

L
5

referencia a un cáncer que no sea invasivo o metastático o que se clasifique como cáncer en Estadio 0, I, o II. Algunos ejemplos de cáncer incluyen, sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma (incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma y cáncer de células de los islotes), mesotelioma, schwannoma (incluyendo neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o afecciones malignas linfoides. Se incluyen entre los ejemplos más particulares de dichos cánceres cáncer de célula escamosa (por ejemplo cáncer de célula escamosa epitelial), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de célula pequeña (SCLC), cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama metastático), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peneano, cáncer testicular, cáncer de esófago, tumores de tracto biliar, así como también cáncer de cabeza y cuello.

El término “pre-cancerígeno” hace referencia a una afección o a un crecimiento que típicamente precede o se vuelve un cáncer. Un crecimiento “pre-cancerígeno” contará con células que se caracterizan por la regulación, proliferación o diferenciación anormal del ciclo celular, que se puede determinar por medio de marcadores de regulación del ciclo celular, la proliferación celular o la diferenciación.

Se entenderá por “displasia” todo crecimiento anormal o desarrollo del tejido, órgano, o células. Preferentemente, la displasia es un grado alto o precancerígena.

Se entenderá por “metástasis” la propagación del cáncer desde su lugar

primario hacia otros lugares del cuerpo. Las células cancerígenas pueden separarse del tumor primario, penetrar en los vasos sanguíneos y linfáticos, circular a través del flujo sanguíneo y crecer en un foco distante (extenderse en una metástasis) en tejidos normales en otras partes del cuerpo. La metástasis puede ser local o distante. La metástasis es un proceso secuencial, contingente en células del tumor que se separan del tumor primario, viajan a través del flujo sanguíneo y paran en un lugar distante. En el lugar nuevo, las células establecen un suministro sanguíneo y puede crecer hasta formar una masa con peligro para la vida.

Tanto la vía estimuladora molecular como la vía inhibidora molecular en la célula del tumor regulan este comportamiento y las interacciones entre la célula del tumor y la célula huésped en el lugar distante también son significativas.

Se entenderá por “no metastático” un cáncer que sea benigno o que permanezca en el lugar primario y no haya penetrado en el sistema de vasos sanguíneos o linfáticos o en otros tejidos diferentes a los del lugar primario. Generalmente, un cáncer no metastático es todo cáncer de Estadio 0, I, o II y, ocasionalmente un cáncer de Estadio III.

Se entenderá por “tumor primario” o “cáncer primario” el cáncer original y no una lesión metastática ubicada en otro tejido, órgano o parte del cuerpo del sujeto.

Se entenderá por “tumor benigno” o “cáncer benigno” un tumor que permanezca ubicado en el lugar de origen y que no tenga la capacidad de infiltrarse, invadir o hacer metástasis en un lugar distante.

Se entenderá por “peso del tumor” la cantidad de células cancerígenas, el tamaño de un cáncer o la cantidad de cáncer en el cuerpo. También se hace referencia al peso del tumor como la carga del tumor.

Se entenderá por “número de tumor” la cantidad de tumores.

Se entenderá por “sujeto” un mamífero, incluyendo, por ejemplo, un mamífero humano o no humano, tal como un bovino, equino, canino, ovino o felino. Preferentemente, el sujeto será humano.

El término “terapia anti-cáncer” hará referencia a una terapia útil para el

tratamiento del cáncer. Se incluyen entre los ejemplos de agentes terapéuticos anti cáncer, limitados a por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes utilizados en la terapia de rayos, agentes anti-angiogénesis, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulinos y otros agentes para el tratamiento del cáncer, anticuerpos anti-CD20, plateletos derivados inhibidores del factor de crecimiento (por ejemplo, Gleevec™ (Imatinib Mesylate)), un inhibidor COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferonas, citoquinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen con uno o más de los siguientes objetivos receptor(es) ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o VEGF, TRAIL/Apo2 y otros agentes químicos orgánicos y bioactivos, etc. También se incluyen combinaciones de los mismos en la invención.

El término “agente citotóxico”, según su utilización en la presente, hace referencia a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o causa la destrucción de células. El término intenta incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas activas enzimáticamente de origen bacterial, de hongos, plantas o animal o fragmentos de los mismos.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Se incluyen entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos compuestos químicos útiles en el tratamiento del cáncer. Se incluyen entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos agentes alquilantes tales como la tiotepa y CITOXAN® ciclosfosfamida; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyen altretamina, trietilenemelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacin y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo la topotecán análoga sintética); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo su adozelesina, carzelesina y bizelesina análogas sintéticas); criptoficinas (particularmente criptoficina I y criptoficina 8); dolastatina;

duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido mecloretamina, melfalán, novembichin, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracil; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como antibióticos de enedina (por ejemplo, calicheamicin, especialmente calicheamicin gama11 y calicheamicin omega11 (ver, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como también cromoforo neocarzinostatin y cromoforos de antibióticos de enedina de cromoproteína relacionados), aclacinomisinas, actinomicin, authramycin, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracil (5-FU); ácido fólico análogos tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; purina análoga tal como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tal como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-glandula suprarrenal tal como aminoglutenetimida, mitotana, trilostana; relleno con ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracil; amsacrina; bestabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona;

elfornitina; acetato de eliptinium; una epotilona; etoglucida; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinan; lonidainina; maytansinoides tales como maytansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2- etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, O); razoxana; rizoxina; sizofiran; espirogermanium; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenas (especialmente toxina T-2, verracurin A, roridin A y anguidina); uretan; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol- Myers Squibb Oncología, Princeton, N.J.), libre de Cremofor ABRAXANE™, formulación de nanopartículas de albúmina de ingeniería de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône- Poulenc Rorer, Antony, France); cloranbucil; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatina y carboplatina; vinblastina; platino; etoposida (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; teniposida; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecan (Camptosar, CPT-11) (incluyendo el régimen de tratamiento de irinotecan con 5-FU y leucovorina); inhibidor topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como el ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; leucovorina (LV); oxaliplatino, incluyendo el régimen de tratamiento oxaliplatino (FOLFOX); inhibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™)) y VEGF-A que reduce la proliferación celular y las sales, los ácidos o los derivados de todo lo que antecede que sean farmacéuticamente aceptables.

También se incluyen en la presente definición son agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción de la hormona en tumores tales como los anti-estrógenos y los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifen NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxtamoxifen, trioxifeno, keoxifeno,

LY117018, onapristona, toremifeno FARESTON, inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, megestrol acetato MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestanio, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®; y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelin; así como también troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolano nucleósido citosina); olinucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de los genes en los vías de señalización implicados en la proliferación de células aberrante, tales como , por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de expresión VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de expresión HER2; vacunas tales como las vacunas de terapia de genes, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor 1 topoisomerasa LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; Vinorelbina y Esperamicinas (ver patente de Estados Unidos N° 4.675.187) y las sales, los ácidos o los derivados de todos los mencionados más arriba aceptados farmacéuticamente.

El término "prodroga", según su utilización en la presente solicitud, hace referencia a una forma precursora o derivada de una sustancia activa farmacéuticamente que resulta menos citotóxica a las células del tumor en comparación con la droga progenitora y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en una forma progenitora más activa. Ver, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) and Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Las prodrogas de la invención incluyen, sin limitación, prodrogas que contengan fosfato, prodrogas que contengan tiofosfato, prodrogas que contengan sulfato, prodrogas que contengan péptidos, prodrogas modificadas por ácido D-amino, prodrogas glicosiladas, prodrogas que contengan β lactam, prodrogas que contengan fenoxiacetamida

opcionalmente sustituida o prodrogas que contengan fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otras prodrogas 5-fluorouridina que puedan convertirse en las drogas citotóxicas libres más activas. Se incluyen entre algunos ejemplos de drogas citotóxicas que se pueden derivar en una forma de prodroga para el uso en esta invención, sin limitación, aquellos agentes quimioterapéuticos descriptos más arriba.

Se entenderá por "terapia de rayos" el uso de rayos gama o beta direccionados a la inducción de suficiente daño a la célula a los efectos de limitar su habilidad de funcionar normalmente o de destruir totalmente la célula. Se apreciará la existencia de varias formas conocidas en la técnica para determinar la dosificación y la duración del tratamiento. Se dan tratamientos típicos como una administración de una sola vez y las dosis varían entre 10 y 200 unidades (Grays) por día.

Agentes terapéuticos

Las presente invención caracteriza el uso de antagonistas de c-met y antagonistas de EGFR en la terapia de combinación para tratar una afección patológica, tal como un tumor, en un sujeto.

Antagonistas de C-met

Se incluyen entre los antagonistas de c-met que resultan útiles en los métodos de la invención los polipéptidos que unen específicamente a c-met, anticuerpos anti- c-met, moléculas pequeñas c-met, moléculas receptoras y derivados que unen específicamente al c-met y proteínas de fusiones. Se incluyen entre los antagonistas de c-met variantes antagonísticas de polipéptidos c-met, RNA aptámeros y cuerpos peptídicos contra c-met y HGF. También se incluyen entre los antagonistas de c-met que son útiles en el método de la invención anticuerpos anti-HGF, polipéptidos anti-HGF, moléculas receptoras c-met y derivativas que unen específicamente a HGF. Se describen más abajo ejemplos de cada uno de éstos.

Los anticuerpos anti-c-met que son útiles en los métodos de la invención incluyen a todo anticuerpo que se une con suficiente afinidad y especificidad al c-

met y pueden reducir o inhibir la actividad de c-met. El anticuerpo seleccionado normalmente contará con una afinidad de unión suficientemente fuerte para c-met, por ejemplo, el anticuerpo puede unir al c-met humano con un valor K_d de entre 100 nM–1 pM. Las afinidades del anticuerpo pueden ser determinadas por un ensayo basado en una resonancia de plasmón superficial (tales como un ensayo BIAcore tal como se describe en la Publicación de la Solicitud PCT N° WO2005/012359); ensayo inmunoabsorbente de ligado a enzima (ELISA); y ensayos de competencia (por ejemplo RIA's). Preferentemente, un anticuerpo anti-c-met de la invención puede ser utilizado como un agente terapéutico en la búsqueda e interferencia con enfermedades o afecciones en donde se involucre la actividad c-met/HGF. Asimismo, el anticuerpo puede someterse a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, a los efectos de evaluar su efectividad terapéutica. Tales ensayos son conocidos en la técnica y dependen del antígeno objetivo y el uso deseado para el anticuerpo.

Los anticuerpos anti-c-met son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Martens, T, et al (2006) Clin Cancer Res 12(20 Pt 1):6144; US 6.468.529; WO2006/015371; WO2007/063816; US7,408,043; WO2009/007427; WO2005/016382; WO2007/126799. En una realización, el anticuerpo anti-c-met comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende uno o más de la secuencia de CDR1-HC, CDR2-HC y CDR3-HC que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 13–15). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena liviana que comprende una o más secuencias de CDR1-LC, CDR2-LC y CDR3-LC que se muestran en la Figura 7 (SEC ID N°: 5–7). En algunas realizaciones, el dominio variable de cadena pesada comprende las secuencias de FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC y FR4-HC que se muestran en la Figura 7 (SEC ID N°: 9–12). En algunas realizaciones, el dominio variable de cadena liviana comprende una secuencia de FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC y FR4-LC que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 1–4). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-c-met es monovalente y comprende una región Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia Fc que se muestra en la



Figura 7 (SEC ID N°: 17).

En algunas realizaciones, el anticuerpo es monovalente y comprende una región Fc, donde la región Fc comprende un primer y un segundo polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende la secuencia Fc que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 17) y el segundo polipéptido comprende la secuencia Fc que se muestra en la Figura 8 (SEC ID N°: 18).

En una realización, el anticuerpo anti-c-met comprende (a) un primer polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada tiene la siguiente secuencia:

QVQLQQSGPELVRPGASVKMSCRASGYTFTSYWLHWVKQRPGQGLEWIGMIDPSNSDTRF
NPNFKDKATLNVDRSSNTAYMLLSSLTSADSAVYYCATYGSYVSPLDYWGQGTSTVTVSS

(SEC ID N°:19), la secuencia CH1 que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 16), y la secuencia Fc que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 17); y (b) un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de cadena liviana que tiene la siguiente secuencia:

DIMMSQSPSSLTVSVGEKVTVSCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRE
SGVPDRFTGSGSGTDFLTITSVKADDLAVYYCQYYAYPWTFGGGGTKLEIK (SEC ID

N°:20), y una secuencia CL1 que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 8); y (c) un tercer polipéptido que comprende la secuencia Fc que se muestra en la Figura 8 (SEC ID N°: 18).

En otras realizaciones, el anticuerpo anti-c-met es un anticuerpo monoclonal producido por la línea de células hibridoma depositada bajo el Número de Acceso a la Colección de Cultivos Tipo Americana ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6). En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una o más secuencias de CDR del anticuerpo monoclonal producido por la línea de células hibridoma depositadas bajo Número de Acceso a la Colección de Cultivos Tipo Americana ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6).

En otras realizaciones, un anticuerpo c-met de la invención específicamente une al menos una porción del dominio c-met Sema de una

variante del mismo. En un ejemplo, un anticuerpo antagonista de la invención específicamente une al menos una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste de LDAQT (SEC ID N°:22) (por ejemplo, residuos 269–273 de c–met), LTEKRKKRS (SEC ID N°:23) (por ejemplo, residuos 300–308 de c–met), KPDSAEPM (SEC ID N°:24) (por ejemplo, residuos 350–357 de c–met) y NVRCLQHF (SEC ID N°:25) (por ejemplo, residuos 381–388 de c–met). En una realización, un anticuerpo antagonista de la invención une específicamente a un epítopo conformacional formado por una parte o la totalidad de al menos las secuencias seleccionadas del grupo que consiste de LDAQT (SEC ID N°: 22) (por ejemplo, residuos 269–273 de c–met), LTEKRKKRS (SEC ID N°: 23) (por ejemplo, residuos 300–308 de c–met), KPDSAEPM (SEC ID N°: 24) (por ejemplo, residuos 350–357 de c–met) y NVRCLQHF (SEC ID N°: 25) (por ejemplo, residuos 381–388 de c–met). En una realización, un anticuerpo antagonista de la invención une específicamente a una secuencia de amino ácido que cuenta con al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% de identidad o similaridad de secuencia con la secuencia LDAQT (SEC ID N°: 22), LTEKRKKRS (SEC ID N°: 23), KPDSAEPM (SEC ID N°: 24), y/o NVRCLQHF (SEC ID N°: 25).

Los anticuerpos anti–HGF son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Kim KJ, et al. Clin Cancer Res. (2006) 12(4):1292–8; WO2007/115049; WO2009/002521; WO2007/143098; WO2007/017107; WO2005/017107; L2G7; AMG–102.

Las moléculas receptoras de c–met o los fragmentos de las mismas que específicamente se unen a HGF pueden utilizarse en los métodos de la invención, por ejemplo, para unir y secuestrar la proteína HGF, y de ese modo prevenir su señalización. Preferentemente, la molécula receptora de c–met o el fragmento de unión a HGF de la misma es una forma soluble. En algunas realizaciones, una forma soluble del receptor ejerce un efecto inhibitor sobre la actividad biológica de la proteína de c–met mediante la unión al HGF, y de ese modo previene que se una a sus receptores naturales que se encuentran presente en la superficie de las células objetivo. También se incluyen proteínas de fusión de receptor c–met; se

describen a continuación ejemplos de los mismos.

Una proteína receptora soluble c-met o las proteínas receptoras quiméricas c-met de la presente invención incluyen proteínas receptoras c-met que no se encuentran fijas en la superficie de las células por medio de un dominio de transmembrana. Como tal, las formas solubles del receptor de c-met, incluyendo las proteínas receptoras quiméricas, mientras sean capaces de unirse a y desactivar HGF, no comprenden un dominio de transmembrana y de ese modo, generalmente no se asociarán con la membrana celular en la que se expresa la membrana. Ver, por ejemplo, Kong-Beltran, M et al Cancer Cell (2004) 6(1): 75-84.

Las moléculas HGF o los fragmentos de los mismos que se unen específicamente a c-met y bloquean o reducen la activación de c-met, y de ese modo previenen su señalización, pueden utilizarse en los métodos de la invención.

Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que forma estructuras terciarias que se unen específicamente a una molécula objetivo, tal como un polipéptido HGF. La generación y la utilización terapéutica de los aptámeros se encuentran bien establecidas en la técnica. Ver, por ejemplo, patente de los Estados Unidos N° 5.475.096. Un aptámero HGF es un oligonucleótido modificado pegilado, que adopta una conformación tridimensional que permite que se una a HGF extracelular. Se puede encontrar información adicional sobre aptámeros en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20060148748.

Un cuerpo peptídico es una secuencia péptida ligada a una secuencia de amino ácido que codifica un fragmento o porción de una molécula de inmunoglobulina. Los polipéptidos pueden derivar de secuencias aleatorias seleccionadas por medio de todo método para unión específica, incluyendo por ejemplo, tecnología de exposición en fago. En una realización preferida, el polipéptido seleccionado puede ligarse a una secuencia de amino ácido que codifica la porción Fc de una inmunoglobulina. Los cuerpos peptídicos que se unan específicamente a y antagonicen HGF o c-met son también útiles en los métodos de la invención.

Antagonistas de c-met incluyen moléculas pequeñas tales como compuestos descritos en US 5.792.783; US 5.834.504; US 5.880.141; US 6.297.238; US 6.599.902; US 6.790.852; US 2003/0125370; US 2004/0242603; US 2004/0198750; US 2004/0110758; US 2005/0009845; US 2005/0009840; US 2005/0245547; US 2005/0148574; US 2005/0101650; US 2005/0075340; US 2006/0009453; US 2006/0009493; WO 98/007695; WO 2003/000660; WO 2003/087026; WO 2003/097641; WO 2004/076412; WO 2005/004808; WO 2005/121 125; WO 2005/030140; WO 2005/070891; WO 2005/080393; WO 2006/014325; WO 2006/021886; WO 2006/021881, WO 2007/103308). PHA-665752 es una molécula pequeña, ATP-competitiva, inhibidora activa de lugar de la actividad catalítica de c-Met, así como también de crecimiento celular, motilidad celular, invasión y morfología de una variedad de células del tumor (Ma et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:2312-2319; Christensen et al (2003) Cancer Res. 63:7345-7355).

Antagonistas EGFR

Antagonistas EGFR incluyen anticuerpos tales como el anticuerpo monoclonal humanizado conocido como nimotuzumab (YM Biosciences), totalmente humano ABX-EGF (panitumumab, Abgenix Inc.) así como también anticuerpos totalmente humanos conocidos como E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6. 3 y E7.6. 3 y descritos en US 6.235.883; MDX-447 (Medarex Inc). Pertuzumab (2C4) es un anticuerpo humanizado que se une directamente con HER2 pero que interfiere con la dimerización HER2-EGFR y de ese modo inhiben la señalización de EGFR. Otros ejemplos de anticuerpos que se unen con EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (ver, Patente de Estados Unidos número 4.943.533, Mendelsohn et al.) y sus variantes, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano reformado (H225) (ver, WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo cuyo objetivo es EGFR totalmente humano (Imclone); anticuerpos que unen a EGFR mutante del tipo II (Patente de Estados Unidos número 5.212.290); los anticuerpos

humanizados y quiméricos que unen a EGFR según lo describe la patente de Estados Unidos número 5.891.996; y anticuerpos humanos que unen a EGFR, tales como ABX-EGF (ver WO98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636–640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo EGFR humanizado direccionado contra que compite tanto con EGF como con TGF- α por la unión a EGFR; y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375–30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR podría conjugarse con un agente citotóxico, generando de ese modo un inmunoconjugado (ver, por ejemplo, EP659,439A2, Merck Patent GmbH).

Los anticuerpos anti-EGFR que son útiles en los métodos de la invención incluyen a todo anticuerpo que se une con afinidad y especificidad suficiente a EGFR y puede reducir o inhibir la actividad EGFR. El anticuerpo seleccionado normalmente tendrá una afinidad de unión suficientemente fuerte para EGFR, por ejemplo, el anticuerpo puede unir al c-met humano con un valor K_d de entre 100 nM–1 pM. Las afinidades del anticuerpo pueden determinarse por medio de un ensayo basado en la resonancia plasmón de superficie (tal como el ensayo BIAcore tal como se describe en la Publicación de Solicitud PCT N°. WO2005/012359); ensayo inmunoabsorbente ligado a la enzima (ELISA); y ensayos de competición (por ejemplo RIA's). Preferentemente, el anticuerpo anti-c-met de la invención puede utilizarse como un agente terapéutico en la búsqueda e interferencia con enfermedades o afecciones en donde la actividad de ligando EGFR/EGFR se encuentra involucrado. Asimismo, el anticuerpo puede someterse a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, a los efectos de evaluar su efectividad terapéutica. Tales ensayos son conocidos en la técnica y dependen del antígeno objetivo y del uso que se quiera dar al anticuerpo.

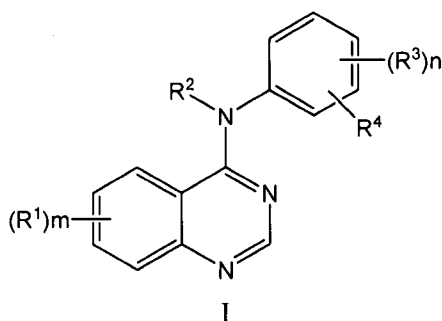
Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para, al menos, dos epítopes diferentes. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos pueden unirse a EGFR y a c-met. En otro ejemplo, un ejemplo de anticuerpo biespecífico puede unirse a dos epítopes diferentes de la misma proteína, por ejemplo, proteína c-met. Alternativamente, un brazo c-met o EGFR

puede combinarse con un brazo que se una a una molécula que accione a un leucocito tal como una molécula receptora de célula T (por ejemplo CD2 o CD3), o receptores Fc de IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para focalizar los mecanismos de defensa celulares a las células de expresión c-met o EGFR. Los anticuerpos biespecíficos también pueden utilizarse para localizar agentes citotóxicos en células que expresan EGFR o c-met. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión EGFR o c-met y un brazo que une al agente citotóxico (por ejemplo saporina, anti-interferon-α, vinca alcaloide, ricina cadena A, metotrexato o hapteno isótopo radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud total o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo F(ab')₂ anticuerpos biespecíficos).

Antagonistas de EGFR también incluyen moléculas pequeñas tales como los compuestos descritos en US5616582, US5457105, US5475001, US5654307, US5679683, US6084095, US6265410, US6455534, US6521620, US6596726, US6713484, US5770599, US6140332, US5866572, US6399602, US6344459, US6602863, US6391874, WO9814451, WO9850038, WO9909016, WO9924037, WO9935146, WO0132651, US6344455, US5760041, US6002008, US5747498. Se incluyen entre los antagonistas de EGFR particulares de moléculas pequeñas OSI-774 (CP-358774, erlotinib, OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-, dihidrocloruro, Pfizer Inc.); Iressa® (ZD1839, gefitinib, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-N2-(1-metil-piperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidina-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletil)amino]-1H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hydroxifenil)-4-[(1-feniletil)amino]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butanamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida); lapatinib (Tykerb, GlaxoSmithKline); ZD6474 (Zactima, AstraZeneca); CUDC-101 (Curis); canertinib (CI-1033); AEE788 (6-[4-[(4-etil-1-piperazinil)metil]fenil]-N-

[(1R)-1-feniletil]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-amina, WO2003013541, Novartis) y PKI166 4-[4-[(1R)-1-feniletil]amino]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol, WO9702266 Novartis).

En una realización particular, el antagonista de EGFR tiene la fórmula general I:



de conformidad con US 5.757.498, incorporado a la presente por referencia, donde:

m es 1, 2, o 3;

cada R¹ es seleccionado independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, halo, hidroxilo, hidroxiamino, carboxi, nitro, guanidino, ureido, ciano, trifluorometil, y -(alquileo C₁ -C₄)-W-(fenilo) en donde W es un enlace simple, O, S o NH;

o cada R¹ es seleccionado independientemente de R⁹ y alquilo C₁-C₄ sustituido con ciano, en donde R⁹ es seleccionado del grupo que consiste de R⁵, -OR⁶, -NR⁶R⁶, -C(O)R⁷, -NHR⁵, -OC(O)R⁶, ciano, A y -YR⁵; R⁵ es alquilo C₁-C₄; R⁶ es independientemente hidrógeno o R⁵; R⁷ es R⁵, -OR⁶ o -NR⁶R⁶; A se selecciona de piperidino, morfolino, pirrolidino, 4-R⁶-piperazin-1-ilo, imidazol-1-ilo, 4-piridon-1-ilo, -(alquileo C₁ -C₄)(CO₂H), fenoxi, fenilo, fenilsulfanilo, alqueno C₂-C₄, y -(alquileo C₁-C₄)C(O)NR⁶R⁶; y Y es S, SO, o SO₂; en donde las porciones de alquilo en R⁵, -OR⁶ y -NR⁶R⁶ se sustituyen opcionalmente con uno a tres sustituyentes halo y las porciones de alquilo en R⁵, -OR⁶ y -NR⁶R⁶ se sustituyen opcionalmente con 1 o 2 grupos R⁹, y en donde las porciones de alquilo de dichos sustituyentes opcionales se sustituyen opcionalmente con halo o R⁹, con la condición que dos heteroátomos no estén unidos al mismo átomo de carbono;

o cada R^1 es independientemente seleccionado de $-\text{NHSO}_2R^5$, ftalimido–alquilsulfonilamino–(C_1-C_4), benzamido, bencensulfonilamino, 3–fenilureido, 2–oxopirrolidin–1–ilo, 2,5–dioxopirrolidin–1–ilo y R^{10} –alcanoilamino–(C_2-C_4) en donde R^{10} se selecciona de halo, $-\text{OR}^6$, alcanoiloxi C_2-C_4 , $-\text{C}(\text{O})R^7$ y $-\text{NR}^6R^6$; y en donde dicho $-\text{NHSO}_2R^5$, ftalimido–(alquilsulfonilamino– C_1-C_4 , benzamido, bencensulfonilamino, 3–fenilureido, 2–oxopirrolidin–1–ilo, 2,5–dioxopirrolidin–1–ilo, y grupos R^{10} –alcanoilamino–(C_2-C_4) R^1 son opcionalmente sustituidos con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados de halo, alquilo C_1-C_4 , ciano, metansulfonilo y alcoxi C_1-C_4 ;

o dos grupos R^1 se toman juntos con los carbonos a los que están unidos para formar un anillo de 5 a 8 miembros que incluye 1 o 2 heteroátomos seleccionados de O, S y N;

R^2 es hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionado de halo, alcoxi C_1-C_4 , $-\text{NR}^6R^6$, y $-\text{SO}_2R^5$;

n es 1 o 2 y cada R^3 es independientemente seleccionado de hidrógeno, halo, hidroxilo, alquilo C_1-C_6 , $-\text{NR}^6R^6$, y alcoxi C_1-C_4 , en donde las porciones de alquilo de dichos grupos R^3 están opcionalmente sustituidas con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halo, alcoxi C_1-C_4 , $-\text{NR}^6R^6$ y $-\text{SO}_2R$; y

R^4 es azido o $-(\text{etinilo})-R^{11}$ en donde R^{11} es hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con hidroxilo, $-\text{OR}^6$, o $-\text{NR}^6R^6$.

En una realización particular, el antagonista de EGFR es un compuesto de acuerdo con la fórmula I seleccionada del grupo que consiste de:

(6,7–dimetoxiquinazolin–4–il)–(3–etinilfenil)–amina; (6,7–
dimetoxiquinazolin–4–il)–[3–(3'–hidroxipropin–1–il)fenil]– amina; [3–(2'–
(aminometil)–etinil)fenil]–(6,7–dimetoxiquinazolin–4–il)–amina; (3–etinilfenil)–(6–
nitroquinazolin–4–il)–amina; (6,7–dimetoxiquinazolin–4–il)–(4–etinilfenil)–amina;
(6,7–dimetoxiquinazolin–4–il)–(3–etinil–2–metilfenil)–amina; (6–aminoquinazolin–
4–il)–(3–etinilfenil)–amina; (3–etinilfenil)–(6–metansulfonilaminoquinazolin–4–il)–

amina; (3-etinilfenil)-(6,7-metilendioxiquinazolin-4-il)-amina; (6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-(3-etinil-6-metilfenil)-amina; (3-etinilfenil)-(7-nitroquinazolin-4-il)-amina; (3-etinilfenil)-[6-(4'-toluensulfonilamino)quinazolin-4-il]-amina; (3-etinilfenil)-[6-[2'-ftalimido-et-1'-il-sulfonilamino]quinazolin-4-il]-amina; (3-etinilfenil)-(6-guanidinoquinazolin-4-il)-amina; (7-aminoquinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (3-etinilfenil)-(7-metoxiquinazolin-4-il)-amina; (6-carbometoxiquinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (7-carbometoxiquinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; [6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-il]-(3-etinilfenil)-amina; (3-azidofenil)-(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-amina; (3-azido-5-clorofenil)-(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-amina; (4-azidofenil)-(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-amina; (3-etinilfenil)-(6-metansulfonil-quinazolin-4-il)-amina; (6-etansulfanil-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-(3-etinil-4-fluoro-fenil)-amina; (6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-[3-(propin-1'-il)-fenil]-amina; [6,7-bis-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(5-etinil-2-metil-fenil)-amina; [6,7-bis-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-4-fluoro-fenil)-amina; [6,7-bis-(2-cloro-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; [6-(2-cloro-etoxi)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; [6,7-bis-(2-acetoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; 2-[4-(3-etinil-fenilamino)-7-(2-hidroxi-etoxi)-quinazolin-6-iloxi]-etanol; [6-(2-acetoxi-etoxi)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; [7-(2-cloro-etoxi)-6-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; [7-(2-acetoxi-etoxi)-6-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; 2-[4-(3-etinil-fenilamino)-6-(2-hidroxi-etoxi)-quinazolin-7-iloxi]-etanol; 2-[4-(3-etinil-fenilamino)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-6-iloxi]-etanol; 2-[4-(3-etinil-fenilamino)-6-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-7-iloxi]-etanol; [6-(2-acetoxi-etoxi)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; (3-etinil-fenil)-[6-(2-metoxi-etoxi)-7-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-etoxi]-quinazolin-4-il]-amina; (3-etinil-fenil)-[7-(2-metoxi-etoxi)-6-(2-morfolin-4-il)-etoxi]-quinazolin-4-il]-amina; (6,7-dietoxiquinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-dibutoxiquinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-diisopropoxiquinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina;

(6,7-dietoxiquinazolin-1-il)-(3-etinil-2-metil-fenil)-amina; [6,7-bis-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-1-il]-(3-etinil-2-metil-fenil)-amina; (3-etinilfenil)-[6-(2-hidroxi-etoxi)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-1-il]-amina; [6,7-bis-(2-hidroxi-etoxi)-quinazolin-1-il]-(3-etinilfenil)-amina; 2-[4-(3-etinil-fenilamino)-6-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-7-il]-etanol; (6,7-dipropoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinil-fenil)-amina; (6,7-dietoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinil-5-fluoro-fenil)-amina; (6,7-dietoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinil-4-fluoro-fenil)-amina; (6,7-dietoxi-quinazolin-4-il)-(5-etinil-2-metil-fenil)-amina; (6,7-dietoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinil-4-metil-fenil)-amina; (6-aminometil-7-metoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinil-fenil)-amina; (6-aminometil-7-metoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarbonilmetil-7-metoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarboniletil-7-metoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarbonilmetil-7-etoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarboniletil-7-etoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarbonilmetil-7-isopropoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarbonilmetil-7-propoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarbonilmetil-7-metoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6-aminocarboniletil-7-isopropoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; y (6-aminocarboniletil-7-propoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-dietoxiquinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; (3-etinilfenil)-[6-(2-hidroxi-etoxi)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-1-il]-amina; [6,7-bis-(2-hidroxi-etoxi)-quinazolin-1-il]-(3-etinilfenil)-amina; [6,7-bis-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-1-il]-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-dimetoxiquinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; (3-etinilfenil)-(6-metansulfonilamino-quinazolin-1-il)-amina; and (6-amino-quinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina.

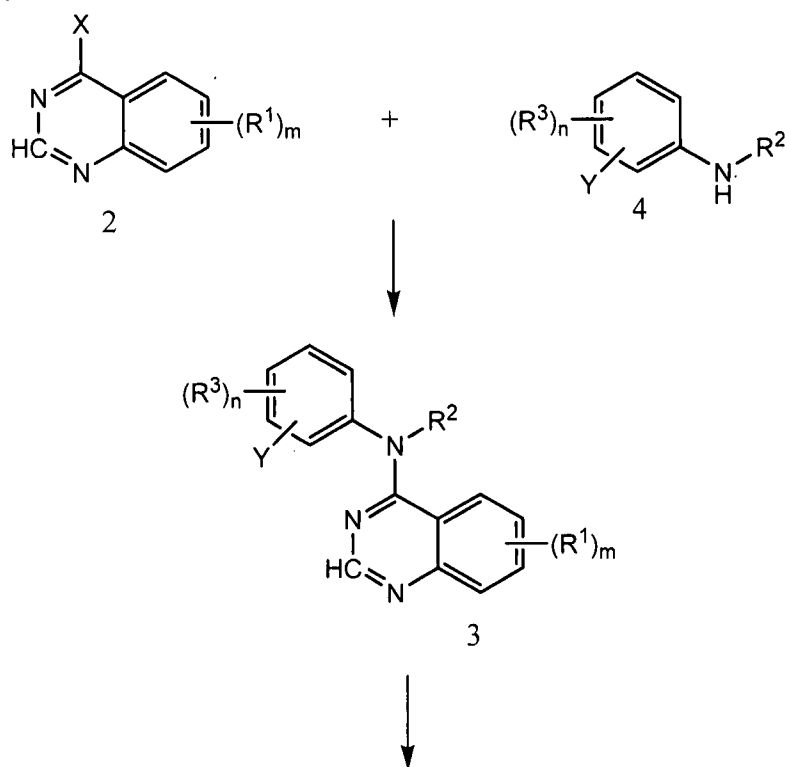
En una realización particular, el antagonista de EGFR de fórmula I es N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina. En una realización particular, el antagonista de EGFR N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina es en forma de sal HCl. En otra realización particular, el antagonista de EGFR N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina

2

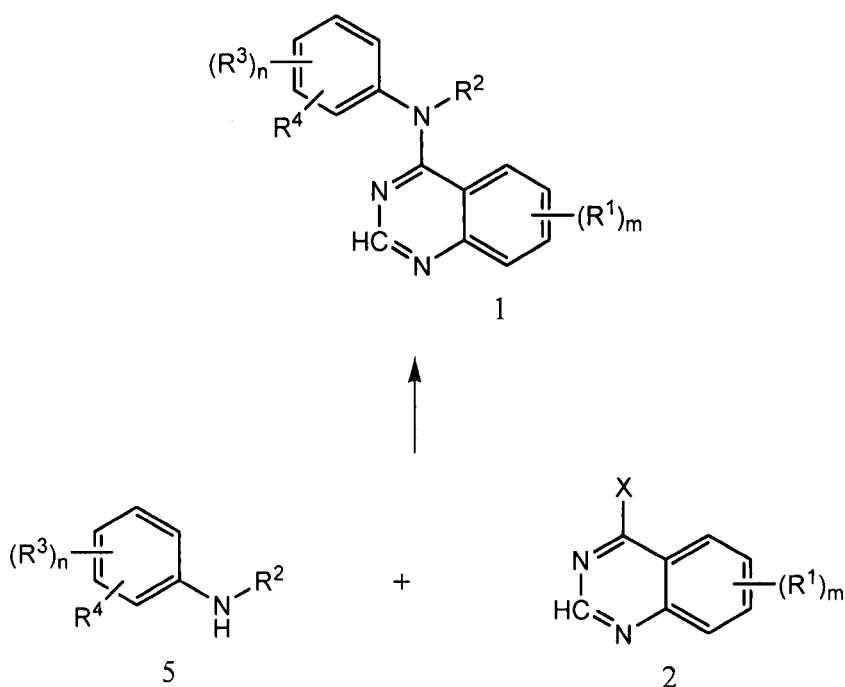
es una forma polimorfa cristalina sustancialmente homogénea (descrita como un polimorfo B en WO 01/34.574) que exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-theta a aproximadamente 6,26, 12,48, 13,39, 16,96, 20,20, 21,10, 22,98, 24,46, 25,14 y 26,91. Se hace referencia a dicha forma polimorfa de N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina como TarcevaTM así como también OSI-774, CP-358774 y erlotinib.

Los compuestos de la fórmula I, las sales y las prodrogas de las mismas aceptables farmacéuticamente (en adelante, los compuestos activos) pueden prepararse mediante un proceso conocido por ser aplicable a la preparación de compuestos relacionados químicamente. En general, los compuestos activos pueden realizarse de la quinazolina sustituida apropiadamente mediante el uso de la amina sustituida apropiadamente como se muestra en el esquema general I revelado en US 5.747.498:

Esquema I



54



Tal como se muestra en el Esquema I la quinazolina 2 4 -sustituida apropiada donde X es un grupo de partida adecuado desplazable tal como halo, ariloxi, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo tales como trifluorometansulfonilo, arilsulfinilo, arilsulfonilo, siloxi, ciano, pirazolo, triazolo o tetrazolo, preferentemente una 4-cloroquinazolina, se reacciona con la amina o hidrocloreto de amina 4 o 5 apropiada, en donde R^4 , tal como se describe arriba y Y es Br, I, o trifluorometano-sulfonilo en un solvente tal como un alcohol (C_1-C_6), dimetilformamida (DMF), N-metilpirrolidin-2-ona, cloroformo, acetonitrilo, tetrahidrofurano (THF), 1-4 dioxano, piridina u otro solvente aprótico. La reacción puede efectuarse en presencia de una base, preferentemente un carbonato de metal alcalinotérreo o alcalino o hidróxido o una base de amina terciaria, tales como piridina, 2,6-lutidina, colidina, N-metil-morfolina, trietilamina, 4-dimetilamino-piridina o N,N-dimetilanilina. Se hará referencia a estas bases en adelante como bases adecuadas. La mezcla de reacción se mantiene a una temperatura aproximadamente ambiente a aproximadamente la temperatura de reflujo del solvente, preferentemente desde alrededor de 35°C hasta alrededor de reflujo, hasta que no se pueda detectar sustancialmente el resto de 4-haloquinazolina, típicamente alrededor de 2 a alrededor de 24 horas. Preferentemente, la reacción se realiza bajo una atmósfera inerte tal como el

5
4

nitrógeno seco.

Generalmente, los reactivos se combinan estequiométricamente. Cuando se utiliza una base de amina para aquellos compuestos donde se utiliza una sal (típicamente la sal HCl) de una amina 4 o 5, es preferible utilizar el exceso de la base de amina, generalmente una equivalente extra de base amina. (Alternativamente, si una base de amina no se utiliza, se puede utilizar el exceso de amina 4 o 5).

Para aquellos compuestos donde se utiliza un amina 4 inhibido estéricamente (tal como un 2–alquil–3–etinilanilina) o una 4–haloquinazolina muy reactiva, es preferible utilizar alcohol t–butilo o un solvente aprótico polar tal como DMF o N–metilpirrolidin–2–ona como el solvente.

Alternativamente, una quinazolina 2 4–sustituida en donde X es hidroxil u oxo (y el 2–nitrogeno es hidrogenado) se reacciona con tetracloruro de carbono y una triarilfosfina opcionalmente sustituida que es portada opcionalmente en un polímero inerte (por ejemplo trifenilfosfina, polímero suportado, Aldrich Cat. N° 36.645–5, que es un divinilbenceno 2% ligado cruzadamente a un poliestireno que contiene 3 mmol de fosforo por gramo de resina) en un solvente tal como tetracloruro de carbono, cloroformo, dicloroetano, tetrahidrofurano, acetonitrilo u otros solventes aproicos o mezclas de los mismos. La mezcla de reacción se mantiene a una temperatura de entre alrededor de ambiente a reflujo, preferentemente desde alrededor de 35°C a reflujo, durante 2 a 24 horas. La mezcla se reacciona con la amina apropiada o con el hidrocloreuro de amina 4 o 5 ya sea directamente o luego de la remoción del solvente, por ejemplo mediante evaporación al vacío y la adición de un solvente alternativo adecuado tal como un alcohol (C₁–C₆), DMF, N–metilpirrolidin–2–ona, piridina o 1–4 dioxano. Luego, la mezcla de reacción se mantiene a temperatura desde alrededor a ambiente hasta a temperatura de reflujo del solvente preferentemente desde alrededor de 35°C hasta alrededor de reflujo, hasta que se alcance la formación sustancialmente completa del producto, típicamente desde alrededor de 2 hasta alrededor de 24 horas. Preferentemente la reacción se lleva a cabo bajo una atmosfera inerte tal

como nitrógeno seco.

Cuando se utilice el compuesto 4, en donde Y es Br, I, o trifluorometansulfonilo, como el material de partida en la reacción con quinazolina 2, se forma un compuesto fórmula 3 en donde R^1 , R^2 , R^3 , y Y son tal como se los describe más arriba. El compuesto 3 se convierte en compuestos de fórmula 1 en donde R^4 es R^{11} etinilo y R^{11} es tal como se lo describe más arriba, mediante reacción con un reactivo de paladio adecuado tal como tetrakis(trifenilfosfina)paladio o dicloruro de bis(trifenilfosfina)paladio en presencia de un ácido Lewis adecuado tal como cloruro de cobre y un alquino adecuado tal como trimetilsililacetileno, alcohol propargilo o 3-(N,N- dimetilamino)-propino en un solvente tal como dietilamina o trietilamina. Los compuestos 3, en donde Y es NH_2 , pueden convertirse en compuestos 1 en donde R^4 es azido mediante el tratamiento del compuesto 3 con un agente diazotizante, tales como un ácido y un nitrito (por ejemplo, ácido acético y $NaNO_2$) seguido de un tratamiento del producto resultante con una azida, tal como NaN_3 .

Para la producción de dichos compuestos de Fórmula I en donde un R^1 es un amino o grupo hidroxiamino, se emplea la reducción del compuesto de Fórmula I correspondiente en donde R^1 es nitro.

La reducción se puede llevar a cabo convenientemente mediante todo procedimiento conocido para dichas transformaciones. La reducción puede realizarse, por ejemplo, por la hidrogenación del compuesto nitro en un solvente de reacción inerte en presencia de un catalizador de metal adecuado tales como paladio, platino o níquel. Otro agente de reducción adecuado es, por ejemplo, un metal activado tal como el hierro activado (producido por el lavado del polvo de hierro con una solución diluida de un ácido tal como el ácido hidrocórico). De ese modo, por ejemplo, la reducción puede realizarse mediante el calentamiento de una mezcla del compuesto nitro y el metal activado con ácido hidrocórico concentrado en un solvente tal como una mezcla de agua y un alcohol, por ejemplo, metanol o etanol, una temperatura que varíe entre, por ejemplo, 50° y 150° C., convenientemente a los 70°C o cerca de los 70°C. Otra clase de agente

+

de reducción adecuados son los ditionitos de metal alcalino, tales como el ditionito de sodio, que puede utilizarse en ácidos alcanoicos(C_1-C_4), alcoholes(C_1-C_6), agua o mezclas de ellos.

Para la producción de dichos compuestos de Formula I en donde R^2 o R^3 incorpora una porción de amino primaria o secundaria (diferente al grupo amino se intenta reaccionar con la quinazolina), dicho grupo amino libre se protege preferentemente con anterioridad a la reacción descrita más arriba seguida de desprotección, seguido de la reacción con 4-(sustituido)quinazolina 2 descrita arriba.

Diferentes grupos de protección de nitrógeno conocidos pueden utilizarse. Dichos grupos incluyen alcoxicarbonilo(C_1-C_6), benziloxicarbonilo opcionalmente sustituido, ariloxicarbonilo, tritilo, viniloxicarbonilo, O- nitrofenilsulfonilo, difenilfosfinilo, p-toluensulfonilo, y benzilo. La adición del grupo protector de nitrógeno puede realizarse en un solvente hidrocarbonado clorinado tal como cloruro de metileno o 1,2-dicloroetano o un solvente etéreo tal como glime, diglime o THF, en presencia o ausencia de una base amina terciaria tal como la trietilamina, diisopropiletilamina o piridina, preferentemente trietilamina, a una temperatura de alrededor de 0°C a alrededor de 50°C , preferentemente alrededor de temperatura ambiente. Alternativamente, los grupos protectores se adjuntan convenientemente mediante el uso de condiciones Schotten-Baumann.

Con posterioridad a la reacción de acoplamiento de los compuestos 2 y 5 descrita arriba, el grupo protector puede removerse mediante métodos desprotectores conocidos para aquellos versados en la técnica tales como el tratamiento con ácido trifluoroacético en cloruro de metileno para los productos protegidos terc-butoxicarbonilo.

Para una descripción de los grupos protectores y su uso, ver T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis" Second Ed., John Wiley & Sons, New York, 1991.

Para la producción de compuestos de Fórmula I en donde R^1 o R^2 es hidroxilo, se prefiere la escisión de un compuesto de una Fórmula I en donde R^1 o

R^2 es alcoxi(C_1-C_4).

La reacción de escisión puede realizarse convenientemente mediante todo procedimiento conocido para dicha transformación. El tratamiento de la fórmula I derivada protegida con molten hidrocloreuro de piridina (20–30 eq.) a 150° hasta 175°C puede emplearse para O-dealquilaciones. Alternativamente, la reacción de escisión puede realizarse, por ejemplo, mediante el tratamiento de la quinazolina protegida derivada con un metal alcalino alquilsulfuro(C_1-C_4), tal como sodio etanotiolato o mediante tratamiento con un diarilfosfuro de metal alcalino tal como difenilfosfuro de litio. La reacción de escisión también puede, convenientemente, realizarse mediante el tratamiento de la quinazolina derivada protegida con un trihaluro de boro o aluminio tales como al tribromuro de boro. Dichas reacciones se realizan preferentemente en la presencia de un solvente inerte a la reacción a una temperatura adecuada.

Los compuestos de fórmula I, en donde R^1 o R^2 es un grupo de alquilsulfinilo (C_1-C_4) o alquilsulfonilo (C_1-C_4) están preferentemente preparados mediante oxidación de un compuesto de fórmula I en donde R^1 o R^2 es un grupo alquilsulfanilo (C_1-C_4). Los agentes oxidantes adecuados conocidos en la técnica para la oxidación de sulfanilo a sulfinilo y/o sulfonilo, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, un perácido (tal como 3-cloroperoxibenzóico o ácido peroxiacético), un peroxisulfato de metal alcalino (tal como el peroximonosulfato de potasio), cromo trióxido u oxígeno gaseoso en la presencia de platino. La oxidación generalmente se realiza bajo las condiciones tan moderadas como fuera posible mediante el uso de una cantidad estequiométrica de agente oxidante a los efectos de reducir el riesgo de sobreoxidación y daño a otros grupos funcionales. En general, la reacción se realiza en un solvente adecuado tal como cloruro de metileno, cloroformo, acetona, tetrahidrofurano o terc-butil metil éter y a una temperatura que varíe entre alrededor de -25° a 50°C, preferentemente a temperatura ambiente o alrededor de una temperatura ambiente, es decir, dentro del rango de 15° a 35°C. Cuando se desee un compuesto que lleve un grupo de sulfinilo, se deberían utilizar agentes de oxidación más moderados tales como metaperiodato

de sodio o potasio, convenientemente en un solvente polar tal como ácido acético o etanol. Los compuestos de fórmula I que contienen un grupo alquilsulfonilo(C_1-C_4) pueden obtenerse por oxidación del compuesto alquilsulfinilo (C_1-C_4) correspondiente así como también del compuesto alquilsulfanilo(C_1-C_4) correspondiente.

Los compuestos de fórmula I en donde R^1 es alcanoilamino (C_2-C_4) opcionalmente sustituido, ureido, 3-fenilureido, benzamido o sulfonamido pueden prepararse mediante acilación o sulfonilación del compuesto correspondiente en donde R^1 es amino. Los agentes de acilación correspondientes son todos los agentes conocidos en la técnica para la acilación de amino a acilamino, por ejemplo, haluros acilo, por ejemplo, un cloruro o bromuro de alcanilo(C_2-C_4) o un cloruro o bromuro de benzoilo, anhídridos de ácido alcanóico o anhídridos mixtos (por ejemplo, anhídrido acético o el anhidro mixto formado por la reacción de un ácido alcanóico y un haluro de alcóxicarbonilo(C_1-C_4), por ejemplo cloruro de alcóxicarbonilo(C_1-C_4), en la presencia de una base adecuada. Para la producción de aquellos compuestos de Fórmula I en donde R^1 es ureido o 3-fenilureido, un agente acilante adecuado es, por ejemplo, un cianato, por ejemplo, un cianato de metal alcalino tal como cianato de sodio o un isocianato tal como isocianato de fenilo. Las n-sulfonilaciones pueden efectuarse con haluros de sulfonilo adecuados o sulfonilanhídridos en la presencia de una base de amina terciaria. En general, la acilación o sulfonilación se realiza en un solvente de reacción inerte y a una temperatura que varíe entre alrededor de -30° y 120°C , convenientemente a o alrededor de la temperatura ambiente.

Los compuestos de Fórmula I en donde R^1 sea alcoxi(C_1-C_4) o alcoxi(C_1-C_4) sustituido o R^1 sea alquilamino(C_1-C_4) o (C_1-C_4)alquilamino mono-N- o di-N,N sustituido, se preparan por la alquilación, preferentemente en la presencia de una base adecuada, de un compuesto correspondiente en donde R^1 sea hidroxilo o amino, respectivamente. Se incluyen entre los agentes alquilantes adecuados alquilo o haluros de alquilo sustituidos, por ejemplo, un cloruro de alquilo (C_1-C_4) opcionalmente sustituido, bromuro o yoduro, en la presencia de una base



adecuada en un solvente de reacción inerte y a una temperatura que varíe entre alrededor de 10° y 140°C, convenientemente a o alrededor de la temperatura ambiente.

Para la producción de aquellos compuestos de Fórmula I en donde R¹ es un sustituyente alquilo(C₁–C₄) amino–, oxi– o ciano– sustituido, un compuesto correspondiente en donde R¹ es un sustituyente alquilo (C₁–C₄) con un grupo que sea desplazable por un grupo de amino–, alcoxi–, o ciano se reacciona con una amina, un alcohol o un cianuro apropiado, preferentemente en la presencia de una base adecuada. La reacción se efectúa preferentemente en un solvente de reacción inerte o en un diluyente y a una temperatura que varíe entre alrededor de 10° y 100°C, preferentemente a o alrededor de la temperatura ambiente.

Los compuestos de Fórmula I, en donde R¹ sea un sustituyente de carboxi o un sustituyente que incluya un grupo de carboxi se preparan mediante hidrolisis de un compuesto correspondiente donde R¹ sea un sustituyente de alcóxicarbonilo (C₁–C₄) o un sustituyente que incluya un grupo alcóxicarbonilo (C₁–C₄). La hidrolisis puede realizarse convenientemente, por ejemplo, bajo condiciones básicas, por ejemplo, en la presencia de hidróxido de metal alcalino.

Los compuestos de Fórmula I en donde R¹ es amino, (C₁–C₄)alquilamino, di–[(C₁–C₄)alquil]amino, pirrolidin–1–il, piperidino, morfolino, piperazin–1–il, 4–(C₁–C₄)alquimpiperazin–1–il o alquisulfanilo(C₁–C₄), pueden prepararse mediante la reacción, en la presencia de una base adecuada de un compuesto correspondiente en donde R¹ sea un grupo desplazable de amina o tiol con una amina o tiol apropiado. La reacción se realiza preferentemente en un solvente de reacción inerte o en un diluyente y a una temperatura que varíe entre alrededor de 10° y 180°C, convenientemente que varíe entre 100° y 150°C.

Los compuestos de la Fórmula I en donde R¹ es 2–oxopirrolidin–1–il o 2–oxopiperidin–1–il son preparados por la ciclización, en presencia de una base adecuada, de un compuesto correspondiente en donde R¹ es un grupo halo–alcanoilamino(C₂–C₄). La reacción se realiza preferentemente en un solvente o diluyente inerte a reacciones y a temperatura en el rango de 10° a 100°C,

convenientemente a temperatura ambiente o alrededor de esa temperatura.

Para la producción de compuestos de la Fórmula I en donde R^1 es carbamoilo, carbamoilo sustituido, alcanoiloxi o alcanoiloxi sustituido, es conveniente la carbamoilación o acilación de un compuesto correspondiente en donde R^1 es hidroxil.

Los agentes de acilación adecuados conocidos en la técnica para la acilación de porciones de hidroxiarilo a grupos de alcanoiloxiarilo incluyen, por ejemplo, haluros de alcanoilo (C_2-C_4), anhídridos de alcanoilo (C_2-C_4) y anhídridos mixtos, como se describe más arriba, y se pueden emplear sus derivados sustituidos adecuados, típicamente en presencia de una base adecuada. Alternativamente, ácidos alcanoicos (C_2-C_4) o sus derivados sustituidos adecuadamente pueden unirse a un compuesto de la Fórmula I en donde R^1 es hidroxil con la ayuda de un agente condensador como por ejemplo carbodiimida. Para la producción de los compuestos de la Fórmula I en donde R^1 es carbamoilo o carbamoilo sustituido, los agentes carbamoilantes adecuados son, por ejemplo, cianatos o alquilo o arilisocianatos, típicamente en presencia de una base adecuada. Alternativamente, pueden ser generados intermediarios adecuados como cloroformato o derivado de carbonilimidazolilo de un compuesto de la Fórmula I en donde R^1 es hidroxil, por ejemplo, por tratamiento de dicho derivado con fosgeno (o un equivalente de fosgeno) o carbonildiimidazol. El intermediario resultante puede hacerse reaccionar posteriormente con una amina apropiada o amina sustituida para producir los derivados de carbamoilo deseados.

Los compuestos de la fórmula I en donde R^1 es aminocarbonilo o aminocarbonilo sustituido puede ser preparado por aminólisis de un intermediario adecuado en donde R^1 es carboxil.

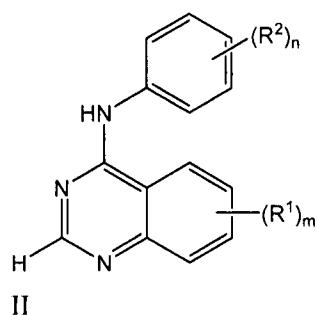
La activación y acoplamiento de compuestos de la fórmula I en donde R^1 es carboxil pueden ser realizados por distintos métodos conocidos por los versados en la técnica. Los métodos adecuados incluyen activación del carboxilo como un ácido haluro, azido, anhídrido simétrico o mixto, o éster activo de una reactividad

28

apropiada para su acoplamiento con una amina deseado. Pueden hallarse en forma extensiva ejemplos de este tipo de intermediarios y su producción y uso en acoplamientos con aminas en la literatura, por ejemplo: M. Bodansky y A. Bodansky, "The Practice of Peptide Synthesis", Springer-Verlag, Nueva York, 1984. Los compuestos de la fórmula I resultantes pueden ser aislados y purificados por métodos estándar, como por ejemplo, extracción con solvente y recristalización o cromatografía.

Los materiales de partida el esquema de reacción I descrito (por ej., aminas, quinazolininas y grupos protectores de amina) están disponibles o pueden ser sintetizados fácilmente por los versados en la técnica utilizando métodos convencionales de síntesis orgánica. Por ejemplo, la preparación de 2,3-dihidro-1,4-derivados de benzoxazina se describen en R. C. Elderfield, W. H. Todd, S. Gerber, Cap. 12 en "Heterocyclic Compounds", Vol. 6, R. C. Elderfield ed., John Wiley and Sons, Inc., N.Y., 1957. Los compuestos de 2,3-dihidrobenzotiazinilo sustituido se describen por R. C. Elderfield y E. E. Harris el el Cap. 13 del Volumen 6 del libro de Elderfield, "Heterocyclic Compounds".

En otra realización particular, el antagonista de EGFR tiene una fórmula general II como se describe en US 5.457.105, incorporado aquí a modo de referencia:



en donde:

m es 1, 2 o 3 y

cada R^1 es independientemente 6- hidroxil, 7-hidroxil, amino, carboxil, carbamoilo, ureido, alcóxicarbonilo(1-4C), N-alkilcarbamoilo(1-4C), N,N-di- [alkil(1-4C)]carbamoilo, hidroxiamino, alcóxiamino(1-4C), alcánoloxiamino(2-4C), trifluorometoxil, alkilo(1-4C), 6-alcóxil(1-4C), 7-alcóxil(1-4C),

alquilendioxi(1-3C), alquilamino(1-4C), di-[alquil(1-4C)]amino, pirrolidin-1-ilo, piperidino, morfolino, piperazin-1-ilo, 4-alquilpiperazin-1-ilo(1-4C), alquiltio(1-4C), alquilsulfinilo(1-4C), alquilsulfonilo(1-4C), bromometilo, dibromometilo, hidroxialquilo(1-4C), alcanoiloxi(2-4C)-alquilo(1-4C), alcoxi(1-4C)-alquilo(1-4C), carboxialquilo(1-4C), alcoxicarbonilo(1-4C)-alquilo(1-4C), carbamoiloalquilo(1-4C), N-alquilcarbamoilo(1-4C)-alquilo(1-4C), N, N-di-[alquil(1-4C)]carbamoiloalquilo(1-4C), aminodialquilo(1-4C), alquilamino(1-4C)-alquilo(1-4C), di-[alquil(1-4C)]aminoalquilo(1-4C), piperidinoalquilo(1-4C), morfolinoalquilo(1-4C), piperazin-1-ilalquilo(1-4C), 4-alquilpiperazin-1-ilo(1-4C)-alquilo(1-4C), hidroxialcoxi(2-4C)-alquilo(1-4C), alcoxi(1-4C)-alcoxi(2-4C)-alquilo(1-4C), hidroxialquilamino(2-4C)-alquilo(1-4C), alcoxi(1-4C)-alquilamino(2-4C)-alquilo(1-4C), alquiltio(1-4C)-alquilo(1-4C), hidroxialquiltio(2-4C)-alquilo(1-4C), alcoxi(1-4C)-alquiltio(2-4C)-alquilo(1-4C), fenoxialquilo(1-4C), anilinoalquilo(1-4C), feniltioalquilo(1-4C), cianoalquilo(1-4C), halógenoalcoxi(2-4C), hidroxialcoxi(2-4C), alcanoiloxi(2-4C)-alcoxi(2-4C), alcoxi(1-4C)-alcoxi(2-4C), carboxialcoxi(1-4C), alcoxicarbonilo(1-4C)-alcoxi, carbamoilo(1-4C)-alcoxi(1-4C), N-alquilcarbamoilo(1-4C)-alcoxi(1-4C), N, N-di-[alquilo(1-4C)]carbamoiloalcoxi(1-4C), aminodialcoxi(2-4C), alquilamino(1-4C)-alcoxi(2-4C), di-[alquilo(1-4C)]aminoalcoxi(2-4C), alcanoiloxi(2-4C), hidroxialcanoiloxi(2-4C), alcoxi(1-4C)-alcanoiloxi(2-4C), fenilalcoxi(1-4C), fenoxialcoxi(2-4C), anilinoalcoxi(2-4C), feniltioalcoxi(2-4C), piperidinoalcoxi(2-4C), morfolinoalcoxi(2-4C), piperazin-1-ilalcoxi(2-4C), 4-alquilopiperazin-1-il(1-4C)-alcoxi(2-4C), halógenoalquiloamino(2-4C), hidroxialquiloamino(2-4C), alcanoiloxi(2-4C)-alquiloamino(2-4C), alcoxi(1-4C)-alquiloamino(2-4C), carboxialquiloamino(1-4C), alcoxicarbonilo(1-4C)-alquiloamino(1-4C), carbamoiloalquiloamino(1-4C), N-alquilcarbamoilo(1-4C)-alquiloamino(1-4C), N,N-di-[alquilo(1-4C)]carbamoiloalquiloamino(1-4C), aminodialquiloamino(2-4C), alquiloamino(1-4C)-alquiloamino(2-4C), di-[alquilo(1-4C)]aminoalquiloamino(2-4C), fenilalquiloamino(1-4C), fenoxialquiloamino(2-4C), anilinoalquiloamino(2-4C),

feniltio–alquiloamino(2–4C), alcanoilamino(2–4C), alcoxycarbonilamino(1– 4C), alquilosulfonilamino(1–4C), benzamido, benzensulfonamido, 3–fenilureido, 2–oxopirrolidin–1–ilo, 2,5– dioxopirrolidin–1–ilo, halógeno–alcanoilamino(2–4C), hidroxi–(2– 4C)alcanoilamino, alcoxi(1–4C)– alcanoilamino(2–4C), carboxi–alcanoilamino(2– 4C), alcoxycarbonilo(1–4C)– alcanoilamino(2–4C), carbamoilo–alcanoilamino(2–4C), N–alquilcarbamoilo(1–4C)– alcanoilamino(2–4C), N,N–di–[alquilo(1– 4C)]carbamoilo–alcanoilamino(2–4C), amino–alcanoilamino(2–4C), alquiloamino(1–4C)– alcanoilamino(2–4C) o di–[alquil(1–4C)]amino–alcanoilamino(2–4C), y en donde dicho sustituyente benzamido o benzensulfonamido o cualquier grupo anilino, fenoxi o fenilo en un sustituyente R¹ puede opcionalmente llevar uno o dos halógenos, sustituyentes alquilo(1–4C) o alkoxi(1–4C);

n es 1 o 2 y

cada R² es independientemente hidrógeno, hidroxi, halógeno, trifluorometilo, amino, nitro, ciano, alquilo(1–4C), alcoxi(1–4C), alquiloamino(1–4C), di–[alquilo(1–4C)]amino, alquilotio(1–4C), alquilosulfinilo(1–4C) o alquilosulfonilo(1–4C); o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, excepto que se excluyen 4–(4'– hidroxianilino)–6–metoxiquinazolino, 4–(4'–hidroxianilino)–6,7– metilenedioxiquinazolino, 6–amino–4–(4'–aminoanilino)quinazolino, 4–anilino–6–metilquinazolino o la sal hidrociorada del mismo y 4– anilino–6,7– dimetoxiquinazolino o la sal hidrociorada del mismo.

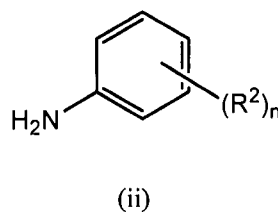
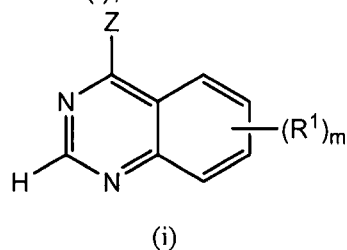
En una realización particular, el antagonista de EGFR es un compuesto según la fórmula II seleccionada de un grupo que consiste de: 4–(3'–cloro–4'–fluoroanilino)–6,7–dimetoxiquinazolina; 4–(3',4'–dicloroanilino)–6,7–dimetoxiquinazolina; 6,7–dimetoxi–4–(3'–nitroanilino)–quinazolina; 6,7–dietoxi–4–(3'–metilanilino)–quinazolina; 6–metoxi–4–(3'–metilanilino)–quinazolina; 4–(3'–cloroanilino)–6–metoxiquinazolina; 6,7–etilenedioxi–4–(3'–metilanilino)–quinazolina; 6–amino–7–metoxi–4–(3'–metilanilino)–quinazolina; 4–(3'–metilanilino)–6–ureidoquinazolina; 6–(2–metoxietoximetil)–4–(3'–metilanilino)–quinazolina; 6,7–di–(2–metoxietoxi)–4–(3'–metilanilino)–quinazolina; 6–

5
8

dimetilamino-4-(3'-metilanilino)quinazolina; 6-benzamido-4-(3'-metilanilino)quinazolina; 6,7-dimetoxi-4-(3'-trifluorometilanilino)-quinazolina; 6-hidroxi-7-metoxi-4-(3'-metilanilino)-quinazolina; 7-hidroxi-6-metoxi-4-(3'-metilanilino)-quinazolina; 7-amino-4-(3'-metilanilino)-quinazolina; 6-amino-4-(3'-metilanilino)quinazolina; 6-amino-4-(3'-cloroanilino)-quinazolina; 6-acetamido-4-(3'-metilanilino)-quinazolina; 6-(2-metoxietilamino)-4-(3'-metilanilino)-quinazolina; 7-(2-metoxiacetamido)-4-(3'-metilanilino)-quinazolina; 7-(2-hidroxietoxi)-6-metoxi-4-(3'-metilanilino)-quinazolina; 7-(2-metoxietoxi)-6-metoxi-4-(3'-metilanilino)-quinazolina; 6-amino-4-(3'-metilanilino)-quinazolina.

Un derivado de quinazolina de la fórmula II, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, puede ser preparado con cualquier proceso aplicable para la preparación de compuestos relacionados químicamente. Un proceso adecuado es, por ejemplo, ilustrado con el utilizado en US 4.322.420. Los materiales necesarios de partida pueden estar disponibles comercialmente o pueden obtenerse por procedimientos estándar de química orgánica.

(a) La reacción, convenientemente en presencia de una base adecuada, de quinazolina (i), en donde Z es un grupo desplazable, con una anilina (ii).



Un grupo Z desplazable adecuado es, por ejemplo, un grupo halógeno, alcoxi, ariloxi o sulfonilo, por ejemplo, un grupo cloro, bromo, metoxi, fenoxi, metansulfonilo o tolueno-p-sulfonilo.

Una base adecuada es, por ejemplo, una base de amina orgánica como, por ejemplo, piridina, 2,6-lutidina, colidina, 4-dimetilaminopiridina, trietilamina, morfolina, N-metilmorfolina o diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene, o por ejemplo, carbonato o hidróxido de metal alcalino o alcalinotérreo, por ejemplo, carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de calcio, hidróxido de sodio o hidróxido de

potasio.

La reacción se lleva a cabo preferentemente en presencia a un solvente o diluyente inerte adecuado, por ejemplo, un alcohol o éster como metanol, etanol, isopropanol o acetato de etilo, un solvente halogenado como cloruro de metileno, cloroformo o tetracloruro de carbono, un eter como tetrahidrofurano o 1,4-dioxano, un solvente aromático como tolueno, o un solvente aprótico dipolar como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N-metilpirrolidin-2-ona o dimetilsulfoxido. La reacción se realiza convenientemente en una temperatura del rango de, por ejemplo, 10° a 150°C, preferentemente en el rango de 20° a 80°C.

El derivado de quinazolina de la fórmula II puede ser obtenido de este proceso en la forma de una base libre o alternativamente puede ser obtenido en forma de sal con el ácido de la fórmula H-Z en donde Z tiene el sentido mencionado más arriba. Cuando se desea obtener una base libre de la sal, la sal puede ser tratada con una base adecuada tal como se define más arriba con el procedimiento convencional.

(b) Para la producción de los compuestos de la fórmula II en donde R¹ o R² es hidroxilo, la escisión de un derivado de quinazolina de la fórmula II en donde R¹ o R² es alcoxi (1-4C).

La reacción de escisión puede ser realizada convenientemente con cualquiera de los procedimientos conocidos para dicha transformación. La reacción puede realizarse, por ejemplo, por tratamiento del derivado de quinazolina con un metal alcalino alquilsulfido(1-4C) como etanetiolato de sodio o, por ejemplo, por tratamiento con un metal alcalino diarilfosfuro como difenilfosfuro de litio. Alternativamente, la reacción de escisión puede realizarse convenientemente, por ejemplo, por tratamiento del derivado de quinazolina con trihaluro de boro o aluminio como tribromuro de boron. Dichas reacciones se realizan preferentemente en presencia de un solvente o diluyente inerte adecuado tal como se define anteriormente y a una temperatura adecuada.

(c) Para la producción de aquellos compuestos de la fórmula II en donde R¹ o R² es un grupo alquilsulfinilo(1-4C) o alquilsulfonilo(1-4C), la oxidación de un

derivado de quinazolina de la fórmula II en donde R^1 o R^2 es un grupo alquiltio(1-4C).

Un agente oxidante adecuado es por ejemplo cualquier agente conocido en la técnica para la oxidación de tio a sulfinil y/o sulfonyl, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, perácido (como por ejemplo ácido 3-cloroperoxibenzoico o peroxiacético), peroxisulfato de metal alcalino (como por ejemplo, peroximonosulfato de potasio), trióxido de cromo u oxígeno gaseoso en presencia de platino. La oxidación generalmente se realiza en condiciones de la mayor moderación con la cantidad estequiométrica requerida de agente oxidizante a fin de reducir el riesgo de sobreoxidación y daño a otros grupos funcionales. En general, la reacción se realiza en un solvente o diluyente adecuado como cloruro de metileno, cloroformo, acetona, tetrahidrofurano o éter terc-butil metilo y a una temperatura, por ejemplo, de -25° a 50°C , convenientemente a temperatura ambiente o cerca de esa temperatura, esto es, en el rango de 15° a 35°C . Cuando un compuesto que transporta un grupo sulfinilo requiere un agente oxidante más leve también puede utilizarse por ejemplo, metaperiodato de sodio o potasio, convenientemente en un solvente polar como por ejemplo ácido acético o etanol. Se apreciará que cuando se requiera un compuesto de la fórmula II que contenga un grupo alquilsulfonyl(1-4C), se puede obtener por oxidación del correspondiente compuesto alquilsulfinilo(1-4C) así como del correspondiente compuesto alquiltio(1-4C).

(d) Para la producción de aquellos compuestos de la fórmula II en donde R^1 es amino, la reducción de un derivado de quinazolina de la fórmula I en donde R^1 es nitro.

La reducción se realizará convenientemente con cualquiera de los procedimientos conocidos para dicha transformación. La reducción puede realizarse por ejemplo por hidrogenación de una solución del compuesto nitro en un solvente o diluyente inerte tal como se define más arriba en presencia de un catalizador de metal adecuado como paladio o platino. Otro agente reductor adecuado es, por ejemplo, un metal activado como por ejemplo hierro activado



(producido por el lavado de polvo de hierro con una solución diluyente de un ácido, por ejemplo, ácido hidroclicóric). Así, por ejemplo, la reducción puede llevarse a cabo al calentar una mezcla de compuestos nitro con el metal activado en un solvente o diluyente adecuado, por ejemplo, una mezcla de agua y alcohol, como metanol o etanol a una temperatura del rango de, por ejemplo, 50° a 150°C, convenientemente a 70°C o cerca de esa temperatura.

(e) Para la producción de aquellos compuestos de la fórmula II en donde R¹ es alcanoilamino(2-4C) o alcanoilamino(2-4C) sustituido, ureido, 3-fenilureido o benzamido, o R² es acetamido o benzamido, la acilación de un derivado de quinazolina de la fórmula II en donde R¹ o R² es amino.

Un agente acilante adecuado es por ejemplo cualquier agente conocido en la técnica para la acilación de amino o acilamino, por ejemplo haluro de acilo o cloruro o bromuro de alcanoilo(2-4C) o cloruro o bromuro de benzoilo, convenientemente en presencia de una base adecuada como se define más arriba, un ácido anhídrido alcanoico o anhídrido mixto, por ejemplo ácido anhídrido alcanoico(2-4C) como anhídrido acético o anhídrido mixto formado por la reacción de un ácido alcanoico y haluro de alcóxicarbonilo(1-4C), por ejemplo cloruro de alcóxicarbonilo(1-4C), en presencia de una base adecuada tal como se define más arriba. Para la producción de aquellos compuestos de la fórmula II en donde R¹ es ureido o 3-fenilureido, agente de acilación adecuado es, por ejemplo, cianato, por ejemplo, cianato de metal alcalino como cianato de sodio o un isocianato como por ejemplo isocianato de fenilo. En general, la acilación se realiza en un solvente o diluyente inerte como se define más arriba y a temperatura del rango de -30° a 120°C, preferentemente a temperatura ambiente o cerca de esa temperatura.

(f) Para la producción de aquellos compuestos de la fórmula II en donde R¹ es alcóxi(1-4C) o alcóxi(1-4C) sustituido o R¹ es alquilamino(1-4C) o alquilamino(1-4C) sustituido, la alquilación, preferentemente en presencia de una base adecuada como se define más arriba de un derivado de quinazolina de la fórmula II en donde R¹ es hidróxi o amino según sea apropiado.

Un agente alquilante adecuado es por ejemplo cualquier agente conocido en la técnica para la alquilación de hidroxilo a alcoxi o alcoxi sustituido o para la alquilación de amino a alquilamino o alquilamino sustituido, por ejemplo alquilo o haluro de alquilo sustituido, por ejemplo cloruro de alquilo(1-4C), bromuro o yoduro o cloruro, bromuro o yoduro de alquilo(1-4C) sustituido, en presencia de una base adecuada como se define más arriba en un diluyente o solvente inerte adecuado como se define más arriba a una temperatura en el rango de los 10° a 140°C, convenientemente a temperatura ambiente o cerca de esa temperatura.

(g) Para la producción de aquellos compuestos de la fórmula II en donde R¹ es un sustituyente de carboxi o un sustituyente que incluye un grupo carboxi, la hidrólisis de un derivado de quinazolina de la fórmula II en donde R¹ es un sustituyente de alcóxicarbonilo(1-4C) o un sustituyente que incluya un grupo alcóxicarbonilo(1-4C).

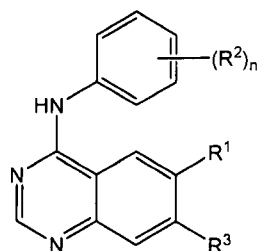
Es conveniente que la hidrólisis se realice, por ejemplo, en condiciones básicas.

(h) Para la producción de aquellos compuestos de la fórmula II en donde R¹ es un sustituyente alquilo(1-4C) amino-, oxi-, tio- o ciano- sustituido, la reacción, preferentemente en presencia de una base adecuada como se define más arriba de un derivado de quinazolina de la fórmula II en donde R¹ es un sustituyente alquilo(1-4C) con un grupo desplazable como se define más arriba con un amina, alcohol, tiol o cianuro apropiado.

La reacción se realiza preferentemente en un solvente o diluyente inerte como se define más arriba y a temperatura en el rango de 10° a 100°C, preferentemente en temperatura ambiente o cerca de esa temperatura.

Cuando se requiere una sal farmacéuticamente aceptable de un derivado de quinazolina de la fórmula II, ésta puede ser obtenida, por ejemplo, por la reacción de dicho compuesto con, por ejemplo, un ácido adecuado, mediante un procedimiento convencional.

En una realización particular, el antagonista de EGFR es un compuesto de conformidad con la fórmula II' como se describe en US 5.770.599, incorporado aquí a modo de referencia:



II

en donde:

n es 1, 2 o 3;

cada R² es independientemente halógeno o trifluorometilo

R³ es alcoxi(1-4C) y

R¹ es di-[alquilo(1-4C)]amino-alcoxi(2-4C), pirrolidin-1-il-alcoxi(2-4C), piperidino-alcoxi(2-4C), morfolino-alcoxi(2-4C), piperazin-1-il-alcoxi(2-4C), 4-(1-4C)alquilopiperazin-1-il-alcoxi(2-4C), imidazol-1-il-alcoxi(2-4C), di-[alcoxi(1-4C)-alquilo(2-4C)]amino-alcoxi(2-4C), tiamorfolino-alcoxi(2-4C), 1-oxotiamorfolino-alcoxi(2-4C) o 1,1-dioxotiamorfolino-alcoxi(2-4C), y en donde cualquiera de los sustituyentes R¹ mencionados más arriba comprendan un grupo CH₂ (metileno) que no esté unido a átomos N u O opcionalmente carga en dicho grupo CH₂ un sustituyente de hidroxilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En una realización particular, el antagonista de EGFR es un compuesto según la fórmula II' seleccionada de un grupo que consiste de:

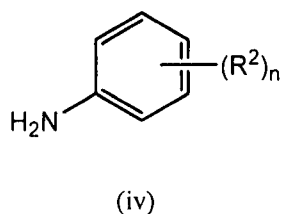
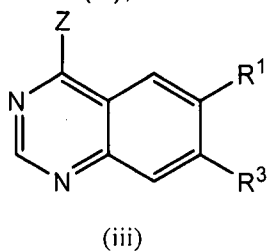
4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(2-pirrolidin-1-iletoxi)-quinazolina;	4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(2-morfolinoetoxi)-quinazolina;
4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-6-(3-dietilaminopropoxi)-7-metoxiquinazolina;	4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-pirrolidin-1-ilpropoxi)-quinazolina;
4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-6-(3-dimetilaminopropoxi)-7-metoxiquinazolina;	4-(3',4'-difluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)-quinazolina;
4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-piperidinopropoxi)-quinazolina;	4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-piperidinopropoxi)-quinazolina;

fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)-quinazolina; 4-(3'-cloro-4'-
 fluoroanilino)-6-(2-dimetilaminoetoxi)-7-metoxiquinazolina; 4-(2',4'-
 difluoroanilino)-6-(3-dimetilaminopropoxi)-7-metoxiquinazolina; 4-(2',4'-
 difluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)-quinazolina; 4-(3'-cloro-4'-
 fluoroanilino)-6-(2-imidazol-1-iletoxi)-7-metoxiquinazolina; 4-(3'-cloro-4'-
 fluoroanilino)-6-(3-imidazol-1-ilpropoxi)-7-metoxiquinazolina; 4-(3'-cloro-4'-
 fluoroanilino)-6-(2-dimetilaminoetoxi)-7-metoxiquinazolina; 4-(2',4'-
 difluoroanilino)-6-(3-dimetilaminopropoxi)-7-metoxiquinazolina; 4-(2',4'-
 difluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)-quinazolina; 4-(3'-cloro-4'-
 fluoroanilino)-6-(2-imidazol-1-iletoxi)-7-metoxiquinazolina; y 4-(3'-cloro-4'-
 fluoroanilino)-6-(3-imidazol-1-ilpropoxi)-7-metoxiquinazolina.

En una realización particular, el antagonista de EGFR es un compuesto según la fórmula II' que es 4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)-quinazolina, alternativamente referido como ZD 1839, gefitinib e Iressa®.

Un derivado de quinazolina de la fórmula II', o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede ser preparado con cualquier proceso aplicable para la preparación de compuestos relacionados químicamente. Los procesos adecuados incluyen por ejemplo, los ilustrados en US5616582, US 5580870, US 5475001 y US5569658. A menos que se especifique de otra manera, n , R^2 , R^3 y R^1 poseen cualquiera de los significados otorgados más arriba para derivado de quinazolina de la fórmula II'. Los materiales necesarios de partida están disponibles comercialmente o se obtienen por métodos estándar de química orgánica.

(a) La reacción, convenientemente en presencia de una base adecuada, de quinazolina (iii), en donde Z es un grupo desplazable, con un anilina (iv)



Un grupo Z desplazable adecuado es, por ejemplo, un grupo halógeno, alcoxi, ariloxi o sulfoniloxi, por ejemplo, un grupo cloro, bromo, metoxi, fenoxi, metansulfoniloxi or tolueno-4-sulfoniloxi.

Una base adecuada es, por ejemplo, una base de amina orgánica como por ejemplo piridina, 2,6-lutidina, colidina, 4-dimetilaminopiridina, trietilamina, morfolina, N-metilmorfolina o diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene, o por ejemplo, carbonato o hidróxido de metal alcalinoterreo o alcalino, por ejemplo, carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de calcio, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio. Alternativamente, una base adecuada es por ejemplo, metal alcalino o amida de metal alcalinotérreo, por ejemplo amida de sodio o amida bis(trimetilsilil) de sodio.

La reacción se lleva a cabo preferentemente en presencia a un solvente o diluyente inerte adecuado, por ejemplo, un alcohol o éster como metanol, etanol, isopropanol o acetato de etilo, un solvente halogenado como cloruro de metileno, cloroformo o tetracloruro de carbono, un éter como tetrahidrofurano o 1,4-dioxano, un solvente aromático como tolueno, o un solvente aprótico dipolar como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N-metilpirrolidina-2-mono o dimetilsulfoxido. La reacción se realiza convenientemente en una temperatura en el rango de, por ejemplo, 10° a 150°C, preferentemente en el rango de 20° a 80°C.

El derivado de quinazolina de la fórmula II' puede ser obtenido con este proceso en la forma de una base libre o alternativamente puede ser obtenido en forma de sal con el ácido de la fórmula H-Z en donde Z tiene el sentido mencionado más arriba. Cuando se desea obtener una base libre de la sal, la sal puede ser tratada con una base adecuada tal como se define más arriba con el procedimiento convencional.

(b) Para la producción de aquellos compuestos de la fórmula II' en donde R¹ es un grupo alcoxi(2-4C) sustituido con amino, la alquilación, convenientemente en presencia de una base adecuada tal como se define más arriba de un derivado de quinazolina de la fórmula II' en donde R¹ es un grupo hidroxil.

Un agente alquilante adecuado es por ejemplo, cualquier agente conocido en la técnica para la alquilación de hidroxilo a alcoxi amino sustituido, por ejemplo haluro de alquilo amino sustituido, o cloruro, bromuro o yoduro de alquilo(2-4C) amino sustituido, en presencia de una base adecuada tal como se define más arriba en un solvente o diluyente inerte adecuado como se define más arriba y a una temperatura en el rango de, por ejemplo, 10° a 140°C, convenientemente a 80°C o cerca de esa temperatura.

(b) Para la producción de aquellos compuestos de la fórmula II' en donde R¹ es un grupo alcoxi (2-4C) sustituido con amino, la reacción, convenientemente en presencia de una base adecuada tal como se define más arriba, de un compuesto de la fórmula II' en donde R¹ es un grupo hidroxilo-alcoxi(2-4C), o un derivado reactivo del mismo, con una amina adecuada.

Un derivado reactivo adecuado de un compuesto de la fórmula II' en donde R¹ es un grupo hidroxilo-alcoxi(2-4C) es, por ejemplo, un grupo halógeno o sulfoniloalcoxi(2-4C) como grupo bromo- o metanosulfoniloalcoxi(2-4C).

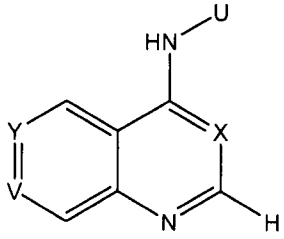
La reacción se realiza preferentemente en presencia de un solvente o diluyente inerte como se define más arriba y a temperatura en el rango de 10° a 150°C, preferentemente a 50°C o cerca de esa temperatura.

(d) Para la producción de aquellos compuestos de la fórmula II' en donde R¹ es un grupo hidroxilo-amino-alcoxi(2-4C), la reacción de un compuesto de la fórmula II' en donde R¹ es un grupo 2,3-epoxipropoxi o un grupo 3,4-epoxibutoxi con una amina apropiada.

La reacción se realiza preferentemente en presencia de un solvente o diluyente inerte como se define más arriba y a temperatura en el rango de, por ejemplo, 10° a 150°C, convenientemente a 70°C o cerca de esa temperatura.

Cuando una sal farmacéuticamente aceptable de un derivado de quinazolina de la fórmula II' sea necesario, por ejemplo, una sal de adición de ácido mono- o di- de un derivado de quinazolina de la fórmula II', puede obtenerse, por ejemplo, por la reacción de dicho compuesto con, por ejemplo, un ácido adecuado utilizando un método convencional.

En una realización particular, el antagonista de EGFR es un compuesto según la fórmula III como se describe en WO9935146, incorporado aquí a modo de referencia:



III

o una sal o solvato de la misma; en donde

X es N o CH;

Y es CR¹ y V es N;

o Y es N y V es CR¹;

o Y es CR¹ y V es CR²;

o Y es CR² y V es CR¹;

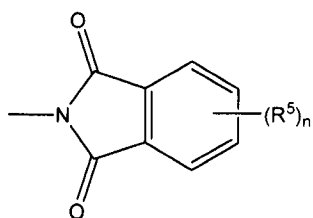
R¹ representa un grupo CH₃SO₂CH₂CH₂NHCH₂-Ar-, en donde Ar se selecciona de fenilo, furano, tiofeno, pirrol y tiazol, cada uno de ellos puede estar sustituido opcionalmente con uno o dos halo, alquiloC₁₋₄ o grupos alcoxiC₁₋₄;

R² se selecciona del grupo de conforman hidrógeno, halo, hidroxí, alquiloC₁₋₄, alcoxiC₁₋₄, alquilaminoC₁₋₄ y di[alquilC₁₋₄]amino;

U representa un grupo fenilo, piridilo, 3H-imidazolilo, indolilo, isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, 1H-indazolilo, 2,3-dihidro-1H-indazolilo, 1H-benzimidazolilo, 2,3-dihidro-1H-benzimidazolilo o un grupo 1H-benzotriazolilo, sustituido con un grupo R³ y opcionalmente sustituido con al menos un grupo R⁴ seleccionado independientemente;

R³ se selecciona del grupo que comprende benzilo, halo-, dihalo- y trihalobenzilo, benzoilo, piridiimetilo, piridilmetoxi, fenoxi, benziloxi, halo-, dihalo- y trihaoobenziloxi y benzenosulfonilo; o R³ representa trihalometilbenzilo o trihalometilbenziloxi;

o R³ representa un grupo de fórmula



en donde cada R^5 es independientemente seleccionado de halógeno, alquilo C_{1-4} y alcoxi C_{1-4} ; y n es 0 a 3; y

cada R^4 es independientemente hidroxilo, halógeno, alquilo C_{1-4} , alqueno C_{2-4} , alquino C_{2-4} , alcoxi C_{1-4} , amino, alquilamino C_{1-4} , di[alquil C_{1-4}]amino, alquiltio C_{1-4} , alquilsulfinilo C_{1-4} , alquilsulfonilo C_{1-4} , alquilcarbonilo C_{1-4} , carboxi, carbamoilo, alcoxycarbonilo C_{1-4} , alcanoilamino C_{1-4} , N -(alquil C_{1-4})carbamoilo, N,N -di(alquil C_{1-4})carbamoilo, ciano, nitro y trifluorometilo.

En una realización particular, los antagonistas de EGFR de la fórmula III excluyen: (1-Benzil-1H-indazol-5-il)-(6-(5-((2-metanosulfonil-etilamino)-metil)-furan-2-il)-pirrido[3,4-d]pirimidin-4-il)-amina; (4-Benziloxi-fenil)-(6-(5-((2-metanosulfonil-etilamino)-metil)-furan-2-il)-pirido[3,4-d]pirimidin-4-il)-amina; (1-Benzil-1H-indazol-5-il)-(6-(5-((2-metanosulfonil-etilamino)-metil)-furan-2-il)-quinazolin-4-il)-amina; (1-Benzil-1H-indazol-5-il)-(7-(5-((2-metanosulfonil-etilamino)-metil)-furan-2-il)-quinazolin-4-il)-amina; y (1-Benzil-1H-indazol-5-il)-(6-(5-((2-metanosulfonil-etilamino)-metil)-1-metil-pirrol-2-il)-quinazolin-4-il)-amina.

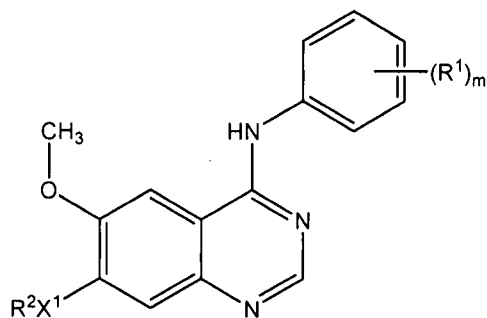
En una realización particular, los antagonistas de EGFR de la fórmula III se seleccionan de un grupo que consiste de: 4-(4-Fluorobenziloxi)-fenil)-(6-(5-((2-metansulfonil-etilamino)metil)-furan-2-il)-pirrido[3,4-d]pirimidin-4-il)-amina; (4-(3-Fluorobenziloxi)-fenil)-(6-(5-((2-metansulfonil-etilamino)metil)furan-2-il)-pirido[3,4-d]pirimidin-4-il)-amina; (4-Benzenosulfonil-fenil)-(6-(5-((2-metansulfonil-etilamino)-metil)-furan-2-il)-pirido[3,4-d] pirimidin-4-il)-amina; (4-Benziloxi-fenil)-(6-(3-((2-metansulfonil-etilamino)-metil)-fenil)-pirido[3,4-d]pirimidin-4-il)-amina; (4-Benziloxi-fenil)-(6-(5-((2-metansulfonil-etilamino)-metil)-furan-2-il)quinazolin-4-il)-amina; (4-(3-Fluorobenziloxi)-fenil)-(6-(4-((2-metansulfonil-etilamino)-metil)-

furan-2-il)-pirrido[3,4-d]pirimidin-4-il)-amina; (4-Benziloxi-fenil)-(6-(2-
 ((2-metansulfoniletilamino)-metil)-tiazol-4-il)quinazolin-4-il)-amina; N-{4-[(3-
 Fluorobenzil)oxi]fenil}-6-[5-({[2-(metansulfonil)etil]amino}metil)-2-furil]-4-
 quinazolinamina; N-{4-[(3-Fluorobenzil)oxi]-3-metoxifenil}-6-[5-({[2-
 (metansulfonil)etil]amino}metil)-2-furil]-4-quinazolinamina; N-[4-
 (Benziloxi)fenil]-7-metoxi-6-[5-({[2-(metansulfonil)etil]amino}metil)-2-furil]-4-
 quinazolinamina; N-[4-(Benziloxi)fenil]-6-[4-({[2-
 (metansulfonil)etil]amino}metil)-2-furil]-4-quinazolinamina; N-{4-[(3-
 Fluorobenzil)oxi]-3-metoxifenil}-6-[2-({[2-(metansulfonil)etil]amino}metil)-1,3-
 tiazol-4-il]-4-quinazolinamina; N-{4-[(3-Bromobenzil)oxi]fenil}-6-[2-({[2-
 (metansulfonil)etil]amino}metil)-1,3-tiazol-4-il]-4-quinazolinamina; N-{4-[(3-
 Fluorobenzil)oxi]fenil}-6-[2-({[2-(metansulfonil)etil]amino}metil)-1,3-tiazol-4-il]-
 4-quinazolinamina; N-[4-(Benziloxi)-3-fluorofenil]-6-[2-({[2-
 (metansulfonil)etil]amino}metil)-1,3-tiazol-4-il]-4-quinazolinamina; N-(1-
 Benzil-1H-indazol-5-il)-7-metoxi-6-[5-({[2-(metansulfonil)etil]amino}metil)-2-
 furil]-4-quinazolinamina; 6-[5-({[2-(Metanosulfonil)etil]amino}metil)-2-furil]-N-
 (4-{[3-(trifluorometil)benzil]oxi}fenil)-4-quinazolinamina; N-{3-Fluoro-4-[(3-
 fluorobenzil)oxi]fenil}-6-[5-({[2-(metansulfonil)etil]amino}metil)-2-furil]-4-
 quinazolinamina; N-{4-[(3-Bromobenzil)oxi]fenil}-6-[5-({[2-
 (metansulfonil)etil]amino}metil)-2-furil]-4-quinazolinamina; N-[4-
 (Benziloxi)fenil]-6-[3-({[2-(metansulfonil)etil]amino}metil)-2-furil]-4-
 quinazolinamina; N-[1-(3-Fluorobenzil)-1H-indazol-5-il]-6-[2-({[2-
 (metansulfonil)etil]amino}metil)-1,3-tiazol-4-il]-4-quinazolinamina; 6-[5-({[2-
 (Metansulfonil)etil]amino}metil)-2-furil]-N-[4-(benzensulfonil)fenil]-4-
 quinazolinamina; 6-[2-({[2-(Metansulfonil)etil]amino}metil)-1,3-tiazol-4-il]-N-
 [4-(benzensulfonil)fenil]-4-quinazolinamina; 6-[2-({[2-
 (Metanosulfonil)etil]amino}metil)-1,3-tiazol-4-il]-N-(4-{[3-
 (trifluorometil)benzil]oxi}fenil)-4-quinazolinamina; N-{3-fluoro-4-[(3-
 fluorobenzil)oxi]fenil}-6-[2-({[2-(metansulfonil)etil]amino}metil)-1,3-tiazol-4-
 il]-4-quinazolinamina; N-(1-Benzil-1H-indazol-5-il)-6-[2-({[2-

(metansulfonil)etil]amino)metil)-1,3-tiazol-4-il]-4-quinazolinamina; N-(3-Fluoro-4-benziloxifenil)-6-[2-({[2-(metansulfonil)etil]amino)metil)-1,3-tiazol-4-il]-4-quinazolinamina; N-(3-Cloro-4-benziloxifenil)-6-[2-({[2-(metansulfonil)etil]amino)metil)-1,3-tiazol-4-il]-4-quinazolinamina; N-{3-Cloro-4-[(3-fluorobenzil)oxi]fenil}-6-[5-({[2-(metansulfonil)etil]amino)metil)-2-furil]-4-quinazolinamina; 6-[5-({[2-(Metansulfonil)etil]amino)metil)-2-furil]-7-metoxi-N-(4-benzensulfonil)fenil-4-quinazolinamina; N-[4-(Benziloxi)fenil]-7-fluoro-6-[5-({[2-(metansulfonil)etil]amino)metil)-2-furil]-4-quinazolinamina; N-(1-Benzil-1H-indazol-5-il)-7-fluoro-6-[5-({[2-(metansulfonil)etil]amino)metil)-2-furil]-4-quinazolinamina; N-[4-(Benzensulfonil)fenil]-7-fluoro-6-[5-({[2-(metansulfonil)etil]amino)metil)-2-furil]-4-quinazolinamina; N-(3-Trifluorometil-4-benziloxifenil)-6-[5-({[2-(metansulfonil)etil]amino)metil)-4-furil]-4-quinazolinamina; y sus sales y solvatos.

En una realización particular, el antagonista de EGFR es: N-[3-cloro-4-[(3-fluorofenil) metoxi] fenil]-6-[5-[[[2-(metilsulfonil)etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina sal de ditosilato (lapatinib).

En una realización particular, el antagonista de EGFR es un compuesto de conformidad con la fórmula IV como se describe en WO0132651, incorporado aquí a modo de referencia:



IV

en donde:

m es un entero de 1 a 3;

R¹ representa halógeno o alquiloC₁₋₃;

X¹ representa -O-;

R^2 se selecciona de uno de los siguientes tres grupos:

1) alquilo $C_{1-5}R^3$ (en donde R^3 es piperidin-4-ilo que puede tener uno o dos sustituyentes seleccionados de hidroxilo, halógeno, alquilo C_{1-4} , hidroxialquilo C_{1-4} y alcoxi C_{1-4} ;

2) alqueno $C_{2-5}R^3$ (en donde R^3 es como se define aquí);

3) alquino $C_{2-5}R^3$ (en donde R^3 es como se define aquí);

y en donde cualquier grupo alquilo, alqueno o alquino puede tener uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo, halógeno y amino; o una sal del mismo.

En una realización particular, los antagonistas de EGFR se seleccionan de un grupo que consiste de: 4-(4-cloro-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina; 4-(2-fluoro-4-metilanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina; 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina; 4-(4-cloro-2,6-difluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina; 4-(4-bromo-2,6-difluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina; 4-(4-cloro-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(piperidin-4-ilmetoxi)quinazolina; 4-(2-fluoro-4-metilanilino)-6-metoxi-7-(piperidin-4-ilmetoxi)quinazolina; 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(piperidin-4-ilmetoxi)quinazolina; 4-(4-cloro-2,6-difluoroanilino)-6-metoxi-7-(piperidin-4-ilmetoxi)quinazolina; 4-(4-bromo-2,6-difluoroanilino)-6-metoxi-7-(piperidin-4-ilmetoxi)quinazolina; y sales y solvatos del mismo farmacéuticamente aceptables.

En una realización particular, el antagonista de EGFR es 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina (Zactima) y sales del mismo.

Terapias de combinación

La presente invención presenta el uso combinatorio de un antagonista de c-met y un antagonista de EGFR como parte de un régimen de tratamiento específico que posee la intención de proporcionar un efecto beneficioso de la actividad combinada de estos agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la

combinación incluye, sin limitación, la acción conjunta farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de agentes terapéuticos. La presente invención es particularmente útil en el tratamiento de cáncer de varios tipos en varios estadios.

El término cáncer conlleva un agrupamiento de trastornos proliferativos, entre ellos, crecimientos precancerígenos, tumores benignos y malignos. Los tumores benignos permanecen ubicados en el lugar de origen y no poseen la capacidad de infiltrar, invadir o hacer metástasis en lugares lejanos. Los tumores malignos invadirán y dañarán otros tejidos que se encuentren a su alrededor. También pueden lograr tener la capacidad de traspasar el lugar donde se originaron para esparcirse a otras partes del cuerpo (hacer metástasis) generalmente a través del flujo sanguíneo o por el sistema linfático, donde se ubican los nódulos linfáticos. Los tumores primarios se clasifican por el tipo de tejido en que se originan, los tumores metastásicos se clasifican por el tipo de tejido del cual las células cancerígenas se derivan. Con el paso del tiempo, las células de un tumor maligno se convierten en cada vez más anormales y su aspecto es cada vez menos parecido al de células normales. Este cambio en la apariencia de células cancerígenas se denomina el grado del tumor y dichas células se describen como células bien diferenciadas (grado bajo), moderadamente diferenciadas, debilmente diferenciadas o indiferenciadas (grado alto). Las células bien diferenciadas son de aspecto bastante normal y son de similar aspecto a las células normales de las que se originaron. Las células indiferenciadas son aquellas que se han convertido en tan anormales que ya no es posible determinar el origen de las células.

Los sistemas de estadios del cáncer describen cuán lejos se ha esparcido el cáncer anatómicamente e intenta colocar a los pacientes en pronóstico y tratamientos similares en el mismo estadio. Se pueden llevar a cabo varios estudios para determinar el estadio del cáncer, entre ellos, biopsias o estudios de imágenes como placa radiográfica de tórax, mamografías, exploraciones óseas, tomografías computarizadas y resonancias magnéticas. Los análisis de sangre y

la evaluación clínica también se utilizan para evaluar la salud general del paciente a fin de detectar si el cáncer ha hecho metástasis a ciertos órganos.

Para determinar el estadio de cáncer, el Comité Unido Americano sobre Cáncer [American Joint Committee on Cancer] ubica en primer lugar el cáncer, particularmente tumores sólidos, en una categoría por letra según el sistema de clasificación TNM. A cada tipo de cáncer se le asigna la letra T (tamaño del tumor), N (nódulos palpables), y/o M (metástasis). T1, T2, T3, y T4 describen el tamaño de la lesión primaria en forma creciente; N0, N1, N2, N3 indica el avance progresivo de involucramiento del nódulo; y M0 y M1 reflejan la ausencia o presencia de metástasis distante.

En el segundo método de estadios, conocido como Agrupamiento por estadio o estadificación por números romanos, el cáncer se divide en los estadios 0 a IV, e incorpora el tamaño de las lesiones primarias así como la presencia de esparcimiento en los nódulos y metástasis distantes. Dentro de este sistema, los casos se agrupan en cuatro etapas determinadas por los números romanos I a IV, o se clasifican como "recurrentes". En el caso de algunos cánceres, el estadio 0 se refiere como "in situ" o "Tis," como el carcinoma ductal in situ o el carcinoma lobular in situ en el caso de cáncer de mama. Los adenomas de grado alto también pueden ser clasificados como estadio 0. En general, el cáncer en estadio I representa al cáncer pequeño que generalmente tiene cura, mientras que el estadio IV generalmente representa al cáncer inoperable o metastásico. El cáncer en los estadios II y III está generalmente avanzado en la zona de origen y/o presenta involucramiento de nódulos linfáticos locales. En general, los números de estadio más altos indican una enfermedad más avanzada, con tumores de mayor tamaño y/o metástasis a nódulos linfáticos cercanos y/o a órganos cercanos al tumor principal. Estos estadios se definen precisamente, pero la definición es diferente para cada tipo de cáncer y es conocida por quienes estén versados en la técnica.

Muchos registros del tema, incluido el programa NCI's Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER), utilizan este tipo de clasificación.

Este sistema se utiliza para todos los tipos de cáncer. Agrupa al cáncer en cinco categorías principales:

In situ es el cáncer en estadio temprano que se encuentra presente solo en la capa de células en las que se originó.

Localizado es el cáncer limitado al órgano en que se originó, sin evidencia de expansión.

Regional es aquel cáncer que se ha esparcido más allá de su lugar original (primario) a nódulos linfáticos cercanos u órganos y tejidos.

Distante es cáncer que se ha esparcido de su lugar primaria hacia órganos o nódulos linfáticos distantes.

Desconocido se utiliza para describir casos para los que no hay suficiente información para indicar un estadio.

Además, es común que el cáncer reaparezca meses o años después de la extracción del tumor primario. El cáncer que vuelve a aparecer luego de la erradicación de todo tumor visible es denominado enfermedad recurrente. La enfermedad que es recurrente en el área del tumor primario es localmente recurrente y la enfermedad que es recurrente en forma de metástasis se denomina recurrencia distante.

El tumor puede ser un tumor sólido, no sólido o de tejido blando. Dentro de los ejemplos de tumores de tejido blando se pueden mencionar leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda en adultos, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda de células B maduras, leucemia linfocítica crónica, leucemia polinfocítica o leucemia de células pilosas) o linfoma (por ejemplo, linfoma no Hodgkin, linfoma cutáneo de células T o enfermedad de Hodgkin). Un tumor sólido incluye cualquier cáncer de tejidos aparte de la sangre, médula o sistema linfático. Los tumores sólidos pueden dividirse a su vez en aquellos de origen en células epiteliales y de origen en células no epiteliales. Dentro de los ejemplos de tumores sólidos de células epiteliales podemos encontrar tumores del tracto gastrointestinal, colon, mama, próstata, pulmón, riñón, hígado, páncreas, ovario,

cabeza y cuello, cavidad oral, estómago, duodeno, intestino delgado, intestino grueso, ano, vesícula biliar, labio, nasofaringe, piel, útero, órganos genitales masculinos, órganos urinarios vejiga y piel. Los tumores sólidos de origen no epitelial incluyen sarcomas, tumores cerebrales y óseos.

En algunas realizaciones, el paciente se somete a una prueba de diagnóstico, por ejemplo, antes y/o durante y/o luego de la terapia. Generalmente, si una prueba de diagnóstico se lleva adelante, una muestra puede ser obtenida de un paciente que necesite terapia. En los casos en que el individuo tiene cáncer, la muestra puede ser del tumor u otra muestra biológica como por ejemplo de fluido biológico, entre ellas, sin limitación, sangre, orina, saliva, líquido ascítico o derivados como suero o plasma sanguíneo, y similares.

La muestra biológica aquí puede ser una muestra fija, por ejemplo, una muestra fija en formalina embebida en parafina (FFPE) o congelada.

Varios métodos para determinar la expresión de mRNA o proteína incluye, sin limitación, perfil de expresión de genes, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) incluidos cálculos en tiempo real de PCR (qRT-PCR), análisis de micromatriz, análisis serial de expresión de genes (SAGE), MassARRAY, análisis de expresión de genes por secuenciación de firma paralela masiva (MPSS), proteómica, inmunohistoquímica (IHC), etc. Preferentemente se cuantifica el mRNA. Dicho análisis de mRNA se realiza preferentemente utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o por análisis de micromatriz. Cuando se emplea PCR, una forma preferida de PCR es cuantitativa en tiempo real de PCR (qRT-PCR). En una realización, la expresión de uno o más de los genes descritos anteriormente se considera expresión positiva si está en la mediana o por encima de ella, por ejemplo, comparada con otras muestras del mismo tipo de tumor. El nivel de expresión de la mediana puede ser determinado esencialmente contemporáneamente con medición de expresión de genes o puede haber sido determinada con anterioridad.

Los pasos de un protocolo representativo para expresión de perfiles de expresión de genes utilizando tejidos fijos, embebidos en parafina como fuente de

RNA incluyen aislación de mRNA, purificación, extensión de cebador y amplificación que se presentan en varios artículos publicados (por ejemplo: Godfrey *et al.* *J. Molec. Diagnostics* 2: 84–91 (2000); Specht *et al.*, *Am. J. Pathol.* 158: 419–29 (2001)). Brevemente, un proceso representativo se inicia con el corte de aproximadamente secciones de 10 microgramos de espesor de muestras de tejido de tumor embebido en parafina. Posteriormente, se extrae el RNA y se elimina la proteína y el ADN. Luego del análisis de la concentración de RNA, los pasos de amplificación y/o reparación de RNA se pueden incluir, se fuere necesario, y el RNA se transcribe en reversa utilizando promotores de genes específicos seguidos de PCR. Finalmente, la información se analiza para identificar las mejores opciones (u opción) para el tratamiento disponibles para el paciente sobre la base de las características del patrón de expresión de gene identificado en la muestra del tumor examinada.

La detección de expresión de gen o proteína puede realizarse en forma directa o indirecta.

Uno puede determinar la expresión o amplificación de c-met y/o EGFR en el cáncer (directa o indirectamente). Varios ensayos de diagnóstico/prognosis están disponibles a tal efecto. En una realización, la sobreexpresión de c-met y/o EGFR puede ser analizada por IHC. Las secciones obtenidas de tejido embebido en parafina con la biopsia de un tumor pueden estar sujetas al ensayo IHC y según criterios de intensidad de coloración de proteína de c-met y/o EGFR según la siguiente clasificación:

Puntaje 0 no se observa coloración o coloración de membrana en menos del 10% de las células del tumor.

Puntaje 1+ se detecta coloración leve, sutilmente perceptible en la membrana de más del 10% de las células del tumor. Las células presentan coloración solo en parte de su membrana.

Puntaje 2+ se observa coloración ligera a moderada en toda la membrana de más del 10% de las células del tumor.

Puntaje 3+ se observa coloración moderada a fuerte en toda la membrana de más del 10% de las células del tumor.

En algunas realizaciones, los tumores con puntaje 0 o 1+ para evaluación de sobreexpresión de c-met y/o EGFR pueden caracterizarse como sin sobreexpresión de c-met y/o EGFR, mientras que aquellos tumores con puntaje de 2+ o 3+ pueden tener sobreexpresión de c-met y/o EGFR.

En algunas realizaciones, los tumores que presentan sobreexpresión de c-met y/o EGFR pueden tener un puntaje inmunohistoquímico correspondiente al número de copias de moléculas de c-met y/o EGFR expresadas por célula y pueden ser determinadas bioquímicamente:

0 = 0–10.000 copias/célula,

1+ = como mínimo alrededor de 200.000 copias/célula,

2+ = como mínimo alrededor de 500.000 copias/célula,

3+ = como mínimo alrededor de 2.000.000 copias/célula.

Alternativamente o adicionalmente, se pueden llevar a cabo ensayos FISH en tejido de un tumor fijado en formalina, embebido en parafina para determinar el alcance (si existiese) de amplificación de c-met y/o EGFR en el tumor.

La activación de c-met o EGFR puede estar determinada directamente (por ejemplo, por análisis fosfo-ELISA, u otro medio de detección de receptor fosforilado) o indirectamente (por ejemplo, por detección de componentes vías de señalización corriente abajo activados, detección de dímeros de recepción (por ejemplo, homodímeros, heterodímeros), detección de perfiles de expresión de gen y similares).

Similarmente, la activación constitutiva de c-met o EGFR o presencia de EGFR independiente de ligando o c-met puede ser detectado directa o indirectamente (por ejemplo, por detección de mutaciones de receptor correlacionadas con actividad constitutiva, por detección de amplificación de receptor correlacionada con actividad constitutiva y similares).

Los métodos para la detección de mutaciones de ácido nucleico son bien conocidos en la técnica. A menudo, si bien no es necesario, un ácido nucleico

objetivo en una muestra se amplifica para proporcionar la cantidad deseada de material a fin de determinar si hay mutación presente. Las técnicas de amplificación son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, el producto amplificado puede contener o no toda la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés, siempre que el producto amplificado comprenda la posición en la secuencia del ácido nucleico/ aminoácido particular donde se sospecha que existe una mutación.

En un ejemplo, la presencia de una mutación puede ser determinada por contacto del ácido nucleico de una muestra con una sonda de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente ácido nucleico que codifique ácido nucleico mutado y detectar dicha hibridación. En una realización, la sonda está marcada en forma que pueda ser detectada, por ejemplo con un radioisotopo (^3H , ^{32}P , ^{33}P etc), un agente fluorescente (rodamina, fluoresceno etc.) o un agente cromogénico. En algunas realizaciones, la sonda es oligómero antisentido por ejemplo, PNA, morfolino-fosforamidatos, LNA o 2'-alcoialcoxi. La sonda puede ser de aproximadamente 8 a aproximadamente 100 nucleótidos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 75, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 50, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30. En otro aspecto, las sondas de ácido nucleico de la invención se proporcionan en un kit de identificación de mutaciones de c-met en una muestra, dicho kit comprende un oligonucleótido que hibrida específicamente a un sitio de mutación o adyacente de él en el ácido nucleico que codifica c-met. Este kit también puede comprender instrucciones para tratar pacientes con tumores que contienen mutaciones de c-met con un antagonista de c-met basado en el resultado de una prueba de hibridación utilizando el kit.

Las mutaciones también pueden ser detectadas por la comparación de movilidad electroforética de ácido nucleico amplificado a la movilidad electroforética de ácido nucleico correspondiente que codifica c-met de tipo salvaje. Una diferencia en la movilidad indica la presencia de una mutación en la secuencia de ácido nucleico amplificada. La movilidad electroforética puede ser determinada por cualquier técnica de separación molecular, por ejemplo, con gel

de poliacrilamida.

Los ácidos nucleicos también pueden ser analizados para detección de mutaciones utilizando Detección de Mutación Enzimática (EMD, por sus siglas en inglés) (Del Tito et al, Clinical Chemistry 44:731–739, 1998). EMD utiliza bacteriófagas resolvable T₄ endonucleares VII, que revisan ADN bicatenario hasta detectar y escindir distorsiones estructurales causadas por discordancias en pares base resultantes de alteraciones en el ácido nucleico como mutaciones en puntos, inserciones y eliminaciones. La detección de dos fragmentos cortos formados por escisión de resolvable, por ejemplo, por electroforesis de gel, indica la presencia de una mutación. Los beneficios del método EMD son un protocolo único para identificar mutaciones en puntos, eliminaciones e inserciones ensayadas directamente de reacciones de amplificaciones, eliminando la necesidad de purificación de la muestra, acortando el tiempo de hibridación y aumentando la relación señal/ruido. Pueden evaluarse las mezclas de muestras contienen un exceso de hasta 20 veces los ácidos nucleicos normales y fragmentos de hasta 4 kb de tamaño. Sin embargo, el control de EMD no identifica cambios particulares de base que ocurran en las muestras de mutación positivas, por lo tanto, se requieren procedimientos de secuenciación adicional para identificar la mutación específica si fuere necesario. La enzima CEL I puede ser utilizada en forma similar para resolvable T₄ endonucleasa VII, como se demuestra en la Patente de Estados Unidos N° 5.869.245.

Otro kit simple para la detección de mutaciones es una prueba de hibridación inversa similar a Haemochromatosis StripAssay™ (Viennalabs <http://www.bamburghmarrsh.com/pdf/4220.pdf>) para detección de mutaciones múltiples en genes HFE, TFR2 y FPN1 que causan hemocromatosis. Dicho ensayo se basa en una secuencia específica de hibridación seguida de amplificación por PCR. Para ensayos de mutación única, se puede aplicar un sistema de detección con microbandejas mientras que para ensayos de mutación múltiple se utilizan pruebas como “macromatrices”. Los kits pueden incluir reactivos listos para utilizar para preparación de muestra, amplificación y detección

de mutación. Los protocolos de amplificación Multiplex son convenientes y permiten prueba de muestras con volúmenes muy limitados. Con el formato directo de StripAssay, las pruebas para veinte o más mutaciones estar completas en menos de cinco horas sin necesidad de tener equipamiento costoso. El ADN se aísla de una muestra y el ácido nucleico objetivo se amplifica in vitro (por ejemplo, con PCR) y se etiqueta generalmente en una reacción de amplificación única ("multiplex"). Los productos de amplificación luego se hibridan selectivamente a sondas oligonucleótidas (de tipo salvaje y específico mutante) inmovilizadas en un soporte sólido como una tira de prueba en la que se inmovilizan las sondas en línea paralela o en bandas. Se detectan amplicones biotinilados unidos con fosfatasa estreptavidina alcalina y sustratos de color. Dicho ensayo puede detectar todos o parte de subgrupos de mutaciones de la invención. Con respecto a una banda de sonda mutante particular, uno de tres patrones de señalización es posible: (i) una banda sólo para sonda tipo salvaje que indique una secuencia de ácido nucleico normal; (ii) bandas tanto para tipo salvaje como para mutante que indique genotipo heterocigótico; y (iii) una banda solamente para sonda mutante que indique genotipo mutante homocigótico. Concordantemente, en un aspecto, la invención proporciona un método de detección de mutaciones de la invención que comprende la aislación y/o amplificación de una secuencia de ácido nucleico de c-met objetivo de una muestra, de forma que el producto de la amplificación comprende un ligando, contactando el producto de la amplificación con una sonda que comprende una molécula de enlace detectable al ligando y la sonda es capaz de hibridar específicamente a una mutación y luego detectar la hibridación de dicha sonda a dicho producto de la amplificación. En una realización, el ligando es biotina y la molécula de enlace es avidina o estreptavidina. En una realización, el enlace comprende estreptavidina alcalina que es detectable con sustratos de color. En una realización, las sondas se inmovilizan por ejemplo en una tira de prueba en donde las sondas complementarias a las diferentes mutaciones se separan entre sí. Alternativamente, el ácido nucleico amplificado se etiqueta con un radioisotopo

y en tal caso la sonda no debe comprender una etiqueta detectable.

Las alteraciones de un gen de tipo salvaje comprenden todas las formas de mutaciones como inserciones, inversiones, eliminaciones y/o mutaciones por puntos. En una realización, las mutaciones son somáticas. Las mutaciones somáticas son aquellas que ocurren solamente en ciertos tejidos, por ejemplo, en tejidos de tumores y no se encuentran en la línea germinal. Las mutaciones de la línea germinal pueden hallarse en cualquiera de los tejidos del cuerpo.

Una muestra que comprende ácido nucleico objetivo puede obtenerse por métodos conocidos en la técnica, y que son apropiados para el tipo particular y ubicación del tumor. La biopsia de tejido se utiliza frecuentemente para obtener una porción representativa de tejido de tumor. Alternativamente, las células del tumor pueden ser obtenidas indirectamente en la forma de tejidos o fluidos que se sabe o se supone que contienen células del tumor de interés. Por ejemplo, pueden obtenerse muestras de lesiones de cáncer de pulmón con resección, broncoscopía, aspiración con aguja fina, cepillado bronquial o de esputo, fluido pleural o sangre. Los genes mutantes o productos de gen pueden ser detectados de un tumor o de otras muestras del cuerpo como orina, esputo o suero. Las mismas técnicas que se explican más arriba para detección de genes mutantes objetivo o productos de genes en muestras de tumor pueden aplicarse a otras muestras del cuerpo. Las células cancerígenas se separan de los tumores y aparecen en dichas muestras del cuerpo. Al revisar dichas muestras, se puede lograr un simple diagnóstico temprano para enfermedades como el cáncer. Además, el progreso de la terapia se puede controlar más fácilmente al hacer pruebas en dichas muestras para genes mutantes objetivo o productos de gen.

Los medios para enriquecer la preparación de un tejido para células cancerígenas son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el tejido puede ser aislado de secciones de parafina o criostáticas. Las células cancerígenas también pueden ser separadas de las células normales por citometría de flujo o microdissección con captura de láser. Éstas y otras técnicas de separación de células cancerígenas de normales son bien conocidas en la técnica. Si el tejido de

un tumor se encuentra altamente contaminado con células normales, la detección de mutaciones puede ser más difícil, si bien las técnicas para minimizar la contaminación y/o falsos resultados positivos/negativos se conocen, algunos de ellas se describen más abajo. Por ejemplo, una muestra también puede ser evaluada para la presencia de un biomarcador (incluida una mutación) conocida por su asociación con células de un tumor de interés pero no poseen una células normal correspondiente o viceversa.

La detección de mutación por puntos en ácido nucleico objetivo puede realizarse por clonación molecular de ácido nucleico objetivo y secuenciación de ácido nucleico con métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, las técnicas de amplificación como reacción de cadena de la polimerasa (PCR) pueden ser utilizados para amplificar secuencias de ácido nucleico objetivo directamente de la preparación de ADN genómico del tejido del tumor. La secuencia de ácido nucleico de las secuencias amplificadas pueden posteriormente ser determinadas y las mutaciones serán identificadas. Las técnicas de amplificación son conocidas en la técnica, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa según se describe en Saiki et al., Science 239:487, 1988; Pat. U.S. Nº 4.683.203 y 4.683.195.

Debe destacarse que el diseño y la selección de cebadores apropiados son métodos bien conocidos en la técnica.

La reacción en cadena ligasa, que es conocida en la técnica, también puede ser utilizada para amplificar secuencias objetivo de ácido nucleico. Ver, por ejemplo, Wu et al., Genomics, Vol. 4, pp. 560–569 (1989). Además, también se puede utilizar una técnica conocida como PCR específica de alelo. Ver, por ejemplo, Ruano y Kidd, Nucleic Acids Research, Vol. 17, p. 8392, 1989. Según esta técnica, se utilizan los cebadores que hibridan a sus extremos 3'a una mutación de ácido nucleico objetivo particular. Si la mutación particular no está presente, no se observa amplificación del producto. También se puede utilizar la técnica de sistema de mutación refractaria de amplificación (ARMS, por sus siglas en inglés), según se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Europea Nº

0332435, y en Newton et al., *Nucleic Acids Research*, Vol. 17, p.7, 1989. Las inserciones y eliminaciones de genes también pueden detectarse por clonación, secuenciamiento y amplificación. Además, las sondas de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) para el gen o genes marcadores circundantes pueden ser utilizadas para marcar las alteraciones de un alelo o una inserción en un fragmento polimórfico. El análisis de polimorfismos de conformación de ADN monocatenario (SSCP, en inglés) también puede utilizarse para detectar variantes de cambio de un alelo. Véase, por ejemplo, Orita et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 86, pp. 2766–2770, 1989, y *Genomics*, Vol. 5, pp. 874–879, 1989. También pueden utilizarse otras técnicas para detectar inserciones y eliminaciones conocidas en la técnica.

También se puede detectar la alteración de genes de tipo salvaje sobre la base de la alteración del producto de la expresión de tipo salvaje de un gen. Dichas expresiones de productos incluyen tanto el mRNA como el producto de la proteína. Las mutaciones por puntos pueden detectarse al amplificar y secuenciar el mRNA o por clonación molecular de ADNc del mRNA. La secuencia del ADNc clonado puede ser determinada con técnicas de secuenciación de ADN conocidas en la técnica. El ADNc también puede ser secuenciado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las discordancias son duplicaciones hibridadas de ácido nucleico que no son 100% complementarias. La falta total de complementariedad puede deberse a eliminaciones, inserciones, inversiones, sustituciones o mutaciones fuera de marco. La detección de discordancias puede utilizarse para detectar mutaciones por puntos en un ácido nucleotico objetivo. Si bien estas técnicas pueden ser menos sensibles que la secuenciación, son más simples para realizar en grandes cantidades de muestras de tejido. Un ejemplo de técnica de escisión de discordancias es el método de protección RNasa, que se describe en detalle en Winter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 82, p. 7575, 1985, y Meyers et al., *Science*, Vol. 230, p. 1242, 1985. Por ejemplo, un método de la invención puede involucrar el uso de una ribosonda etiquetada complementaria al ácido nucleico

objetivo tipo salvaje humano. La ribosonda y el ácido nucleico derivado de una muestra de tejido se aparean (hibridan) y luego se digieren con la enzima RNasa A que es capaz de detectar algunas discordancias en estructuras de RNA dobles. Si una discordancia es detectada por RNasa A, se escinde en el sitio de la discordancia. Por lo tanto, cuando la preparación de RNA apareada se separa en una matriz de gel electroforético, si una discordancia ha sido detectada y escindida por RNasa A, un producto de RNA se verá más pequeño que el RNA total duplicado para la ribosonda y el mRNA o ADN. La ribosonda no deberá ser del largo total del ácido nucleico objetivo mRNA o gen, pero puede ser una porción del ácido nucleico objetivo siempre que acompañe la posición donde se espera una mutación. Si la ribosonda comprende sólo un segmento del mRNA ácido nucleico objetivo o gen es deseable usar una cantidad de estas sondas para controlar toda la secuencia de ácido nucleico objetivo para encontrar discordancias, si se desea.

En forma similar, las sondas de ADN pueden utilizarse para detectar discordancias, por ejemplo, por escisión enzimática o química. Ver, por ejemplo, Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, 4397, 1988; y Shenk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 72, p. 989, 1975. Alternativamente, las discordancias pueden ser detectadas por cambios en la movilidad electroforética de discordancias dobles relativas a concordancias dobles. Ver, por ejemplo, Cariello, Human Genetics, Vol. 42, p. 726, 1988. Con cada ribosonda o sonda de ADN, el ácido nucleico objetivo mRNA o ADN que pueda contener una mutación puede ser ampliada antes de la hibridación. Los cambios en el ADN del ácido nucleico objetivo pueden ser utilizados con hibridación Southern, especialmente si los cambios son de reordenamiento importante como eliminaciones o inserciones.

Las secuencias de ADN de ácido nucleico objetivo que han sido amplificadas pueden ser controladas con sondas específicas de alelos. Estas sondas son oligómeros de ácido nucleico, y cada una de ellas contiene una región de gen de ácido nucleico objetivo que contiene una mutación conocida. Por ejemplo, un oligómero puede ser de cerca de 30 nucleótidos de extensión, correspondiente a una porción de secuencia de genes objetivo. Por el uso de una

serie de sondas específicas de alelos, los productos de la amplificación de ácido nucleico objetivo pueden ser controlados para identificar la presencia de una mutación previamente identificada en el gen objetivo. La hibridación de sondas específicas de alelos con secuencias de ácido nucleico objetivo amplificado puede llevarse adelante por ejemplo en un filtro de nylon. La hibridación a una sonda particular en condiciones de estricta hibridación indica la presencia de la misma mutación en el tejido del tumor así como en la sonda específica de alelo.

La alteración de genes objetivo de tipo salvaje también puede ser detectada por control de alteración de la correspondiente proteína de tipo natural. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales inmunoreactivos con un producto de gen objetivo se pueden utilizar para controlar un tejido por ejemplo un anticuerpo que es conocido por unirse a una posición mutada particular del producto del gen (proteína). Por ejemplo, un anticuerpo que se usa puede ser uno que se une a un exón eliminado (por ejemplo, exón 14) o que se une a un epítipo conformacional que comprende una porción eliminada de la proteína objetivo. La falta de un antígeno cognado indicaría mutación. Los anticuerpos específicos para productos de alelos mutantes podrían utilizarse también para detectar productos de gen mutante. Los anticuerpos pueden estar identificados por bibliotecas de expresión en fago. Dichos ensayos inmunológicos pueden realizarse en cualquier formato conveniente conocido en la técnica. Estos incluyen técnica Western blot, ensayos inmunohistoquímicos y ensayos ELISA. Cualquier medio para la detección de una proteína alterada puede ser utilizado para detectar alteración de genes objetivo de tipo salvaje.

Los pares de cebador son útiles para la determinación de secuencia de nucleótido de ácido nucleico objetivo con técnicas de amplificación de ácido nucleico como reacción en cadena de la polimerasa. Los pares de cebadores de ADN monocatenario pueden aparearse en secuencias interiores o circundantes a la secuencia de ácido nucleico objetivo a fin de cebar la amplificación a la secuencia objetivo. También se pueden utilizar cebadores específicos de alelos. Dichos cebadores se aparean solamente para una secuencia objetivo mutante

particular y entonces, sólo amplificará un producto en presencia de una secuencia de objetivo mutante como plantilla. A fin de facilitar la subsiguiente clonación de secuencias amplificadas los cebadores pueden tener restricción enzimática secuencial en sus extremos. Dichas enzimas y lugares son conocidos en la técnica. Los mismos cebadores pueden sintetizarse con métodos conocidos en la técnica. Generalmente, los cebadores pueden realizarse con máquinas sintetizadoras de oligonucleótidos disponibles comercialmente. El diseño de cebadores particulares es conocido en la técnica.

Las sondas de ácido nucleico son útiles para una variedad de propósitos. Pueden utilizarse en hibridación Southern de ADN genómico y en el método de protección de RNasa para detectar mutaciones por puntos ya discutido más arriba. Las sondas pueden utilizarse para detectar productos de amplificación de ácido nucleico objetivo. También pueden utilizarse para detectar discordancias con el gen de tipo salvaje o mRNA con otras técnicas. Las discordancias se pueden detectar con enzimas (por ej, S1 nucleasa), químicos (por ej hidroxilamina o tetróxido de osmio y piperidina) o cambios en movilidad electroforética de discordancias de híbridos en comparación con híbridos de concordancia total. Estos métodos son conocidos en la técnica. Ver Novack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, p. 586, 1986. Generalmente, las sondas son complementarias a secuencias fuera del dominio de la quinasa. Una serie entera de sondas de ácido nucleico puede ser utilizada para preparar un kit para detección de mutaciones en ácidos nucleicos objetivo. El kit permite la hibridación de una gran región de secuencia objetivo de interés. Las sondas pueden superponerse entre sí o ser continuas.

Si una ribosonda se utiliza para detectar discordancias con mRNA, es generalmente complementaria al mRNA del gen objetivo. La ribosonda es entonces, una sonda antisentido, ya que no codifica el producto de gen correspondiente ya que es complementaria a la cadena de sentido. La ribosonda en general puede etiquetarse con material radioactivo, colorimétrico o fluorométrico, logrado por cualquier método en la técnica. Si una ribosonda se usa

para detectar discordancias con ADN puede ser de polaridad, sentido o antisentido. En forma similar, las sondas de ADN también se pueden usar para detectar discordancias.

En algunos casos, el cáncer genera sobreexpresión o no en el receptor c-met y/o EGFR. La sobreexpresión del receptor puede estar determinada en un ensayo de diagnóstico o pronóstico al evaluar niveles de proteína del receptor presentes en la superficie de una célula (por ej., mediante ensayo inmunohistoquímico, IHC). Alternativamente, o adicionalmente, uno puede medir los niveles de ácido nucleico que efectúa la codificación del receptor en la célula, por ejemplo, mediante hibridación fluorescente in situ (FISH; ver WO98/45479 publicado en octubre de 1998), por método Southern blot, o por reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), como cálculo de PCR en tiempo real (RT-PCR). Además de los ensayos descritos más arriba, varios ensayos in vivo están disponibles para los familiarizados en la técnica. Por ejemplo, uno puede exponer células dentro del cuerpo de un paciente a un anticuerpo que está etiquetado opcionalmente con una etiqueta detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y unir al anticuerpo las células del paciente para evaluación, por ejemplo, por control externo de radioactividad o por el análisis de una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

Agentes Quimoterapéuticos

La terapia de combinación de la invención puede comprender además uno o más agentes quimoterapéuticos. La administración combinada incluye la coadministración o administración concurrente, con fórmulas separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden en donde preferentemente hay un período de tiempo donde ambos (o todos) los agentes reactivos ejerzan sus funciones biológicas simultáneamente.

Si se administra el agente quimoterapéutico, se efectúa en dosis conocidas para el mismo u opcionalmente se reducen debido a la acción combinatoria de las drogas o efectos negativos atribuibles a la administración de agentes quimoterapéuticos antimetabolitos. Los cronogramas de preparación y dosis para

dichos agentes pueden utilizarse según las instrucciones del fabricante o según se determine empíricamente por el técnico versado para tal procedimiento.

Varios agentes quimoterapéuticos que pueden combinarse se describen más arriba. Los agentes quimoterapéuticos preferidos para combinación se seleccionan de un grupo que comprende un taxoide (incluidos docetaxel y paclitaxel), vinca (como vinorelbina o vinblastina), compuesto de platino (como carboplatino o cisplatino), inhibidor de aromatasas (como letrozola, anastrozola, o exemestana), anti-estrógeno (fulvestrante o tamoxifeno), etoposido, tiotepa, ciclofosfamida, metotrexate, doxorubicina liposomal, doxorubicina liposomal pegilada, capecitabina, gemcitabina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), o inhibidor proteosomático (por ej. PS342).

Formulaciones, dosis y administración

Los agentes terapéuticos utilizados en la invención serán formulados, dosificados y administrados de modo consistente con las buenas prácticas de la medicina. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se trate, el paciente particular que se trate, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el lugar de administración del agente, el método de administración, el cronograma de administración, la interacción droga-droga de los agentes que se combinarán y otros factores conocidos para los médicos.

Las formulaciones terapéuticas se preparan según métodos estándar conocidos en la técnica por mezcla de ingrediente activo con el grado deseado de pureza con portadores fisiológicamente aceptables opcionales, excipientes o estabilizadores (Remington's Pharmaceutical Sciences (20^o edición), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA). Los portadores aceptables pueden ser salinos o buffers como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como ácido ascorbico; peso molecular bajo (menos de cerca de 10 residuos) polipéptidos; proteínas, como albumina de cera, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona, aminoácidos como glicina, glutamina, asparaginas, arginina o lisina; monosacáridas,

disacáridas, y otros carbohidratos como glucosa, mannosas, o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; alcoholes de azúcar como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal como el sodio; y/o sufactantes no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™, o PEG.

Opcionalmente, pero preferentemente, la formulación contiene una sal farmacéuticamente aceptable, preferentemente cloruro de sodio, y preferentemente en concentraciones fisiológicas. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden contener un conservante aceptable farmacéuticamente. En algunas realizaciones los rangos de concentración de conservante son de 0,1 a 2,0%, típicamente v/v. Los conservantes adecuados incluyen aquellos conocidos en la técnica farmacéutica. Alcohol de benzil, fenol, m-cresol, metilparabeno y propilparabeno son los conservantes preferidos. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden incluir un sufactante farmacéuticamente aceptable en una concentración de 0,005 a 0,02%.

La formulación aquí también puede contener más de un compuesto activo según fuere necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan en forma adversa entre sí. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades efectivas para el fin propuesto.

Los ingredientes activos también pueden conservarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de entrega de droga coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se muestran en Remington's Pharmaceutical Sciences, supra.

Se pueden hacer preparaciones de liberación sostenida. Son ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, en matrices con forma, por ejemplo, films o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación

sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilácteos (Patente de los Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etileno vinil acetato no degradable, copolímeros de ácido glicólico y ácido láctico degradable como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli-D-(-)-3-ácido hidroxibutírico. Los polímeros como etileno vinil acetato, ácido láctico y ácido glicólico permiten la liberación de moléculas por más de 100 días, mientras que ciertos hidrogeles liberan proteínas por períodos más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo por un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de su exposición a la humedad a 37°C, lo que resulta en la pérdida de actividad biológica y cambios posibles en la inmunogenética. Pueden pensarse estrategias racionales para la estabilización según el mecanismo involucrado. Por ejemplo, si en el mecanismo de agregación se descubre que aparece una formación de enlace S-S intermolecular en el intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse al modificar los residuos de sulfidril, liofilizando soluciones de ácido, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices de polímeros específicos.

Los agentes terapéuticos de la invención se administran a un paciente humano según métodos conocidos, por ejemplo, administración intravenosa como bolo o por infusión continua en un período de tiempo por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. En el caso de antagonistas de VEGF, la administración local es particularmente deseable si se asocian efectos secundarios extensivos o toxicidad con el antagonismo de VEGF. Una estrategia ex vivo también puede utilizarse para aplicaciones terapéuticas. Las estrategias ex vivo comprenden transfectación o transducción de células obtenidas del sujeto con polinucleótido que codifica un antagonista de c-met o EGFR. Las células transfectadas o transducidas se devuelven luego al sujeto. Puede tratarse de

cualquier célula dentro de un rango variado de tipos incluidos a modo enumerativo células hemopoyéticas (por ejemplo, células de la medula, macrófagos, monocitos células dendríticas, células T o células B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos y células musculares.

Por ejemplo, si el antagonista de c-met o EGFR es un anticuerpo, el anticuerpo se administra por cualquier medio adecuado, incluido el parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y si se desea para el tratamiento local inmusupresor, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra adecuadamente por infusión por pulso, particularmente con dosis decrecientes de anticuerpo. Preferentemente, la dosis se administra con inyecciones, preferentemente intravenosa o subcutánea, dependiendo en parte del tipo de administración, breve o crónica.

En otro ejemplo, el compuesto antagonista de c-met o EGFR se administra localmente, por ejemplo, por inyección directa cuando el trastorno o ubicación del tumor lo permita y puede repetirse la aplicación de inyecciones periódicamente. Este antagonista de c-met o EGFR también puede ser entregado sistémicamente al sujeto o directamente a las células del tumor, por ejemplo, o el lecho de un tumor luego de extracción quirúrgica del tumor a fin de prevenir o reducir recurrencia local o metástasis.

La administración de los agentes terapéuticos en combinación típicamente se realiza en un período de tiempo definido (generalmente minutos, horas, días o semana según la combinación seleccionada). La terapia combinatoria intenta apoyar la administración de estos agentes terapéuticos en forma secuencial, es decir, en donde cada agente terapéutico se administra en un momento diferente así como la administración de dichos agentes terapéuticos o al menos dos de ellos en forma simultánea.

El agente terapéutico puede ser administrado por la misma vía o por vías distintas. Por ejemplo, el antagonista de EGFR o c-met en la combinación puede

ser administrado por inyección intravenosa mientras que el inhibidor de proteína quinasa en la combinación puede administrarse por vía oral. Alternativamente, por ejemplo, ambos agentes terapéuticos pueden administrarse por vía oral o por inyección intravenosa según el agente terapéutico específico. La secuencia en la que los agentes terapéuticos se administran también varía según los agentes específicos.

Según el tipo y severidad de la enfermedad, aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg (por ej., 0,1–20 mg/kg) de cada agente terapéutico es una dosis inicial propuesta para la administración al paciente ya sea que se trate por ejemplo, de una o más administraciones separadas o por infusión continua. Una dosis típica diaria puede variar entre aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg o más, según los factores mencionados anteriormente. Para el caso de administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, según la condición, el tratamiento se sostiene hasta que se trate el cáncer, según mediciones descriptas anteriormente. Sin embargo, otros regímenes de dosis pueden ser útiles. En un ejemplo, si el antagonista de cmet o EGFR es un anticuerpo, el anticuerpo de la invención se administra cada dos a tres semanas, en un rango de dosis que varía entre aproximadamente 5 mg/kg a 15 mg/kg . Si el antagonista de c-met o EGFR es un compuesto molecular oral pequeño, la droga se administra diariamente dentro de un rango de dosis de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg . Además, el compuesto oral de la invención puede ser administrado ya sea por el regimen tradicional intermitente de alta dosis o por dosis más bajas y frecuentes sin descansos programados (esta terapia recibe el nombre de "metronómica"). Cuando se usa un régimen intermitente, por ejemplo, la droga puede administrarse diariamente por dos a tres semanas seguidas de una semana de descanso, o en forma diaria por cuatro semanas seguidas de un descanso de dos semanas, según la dosis diaria y la indicación de cada caso en particular. El progreso de la terapia de la invención se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

La presente solicitud contempla la administración del antagonista de met y/o EGFR por terapia de genes. Ver por ejemplo, WO96/07321 publicada el 14 de marzo de 1996 sobre el uso de terapia de gen para generar anticuerpos intracelulares.

Hay dos grandes enfoques para el acercamiento de ácido nucleico (optionalmente contenidos 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 lugar en el que se necesita el anticuerpo. Para el tratamiento ex vivo, se remueven las células del paciente, se introduce el ácido nucleico en estas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente ya sea por vía directa o por ejemplo, encapsulada en membranas porosas que se implantan en el paciente (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N° 4.892.538 y 5.283.187). Hay una variedad de técnicas disponibles para la introducción de ácido nucleico en células viables. Las técnicas varían según si el ácido nucleico se transfiere a células cultivadas in vitro, o in vivo en las células del huésped objetivo. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células mamarias in vitro incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión de células, DEAE-dextrano, el método de precipitación de fosfato de calcio, etc. Un vector comúnmente utilizado para la entrega ex vivo de un gen es un retrovirus.

Las técnicas de transferencia de ácido nucleico in vivo preferidas actualmente incluyen la transfección con vectores virales (como adenovirus, virus Herpes simplex I, o virus adeno-asociados) y sistemas basados en lípidos (son lípidos útiles para la transferencia por lípidos del gen son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). En algunas situaciones es deseable proporcionar a la fuente de ácido nucleico un agente que llegue a las células objetivo, como un anticuerpo específico para la proteína de la membrana de la superficie de una células o la célula obojetivo, un ligando para un receptor en la célula objetivo, etc. Donde se utilizan liposomas, las proteínas que los unen a la proteína de la membrana de la superficie de una célula asociada con endocitosis puede utilizarse para atacar y/o

facilitar la captación, por ejemplo, proteínas cápside o fragmentos de la misma para un tipo particular de célula, anticuerpos para proteínas que se someten a internalización en círculos, y proteínas que tienen como objetivo la localización intracelular y la optimización de la vida media intracelular. La técnica de endocitosis mediante receptor se describe, por ejemplo, en Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262:4429–4432 (1987); y Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3410–3414 (1990). Para la revisión de protocolos de terapia con gen y marcación de gen actualmente conocidos, ver Anderson *et al.*, *Science* 256:808–813 (1992). Ver también WO 93/25673 y las referencias citadas en el mismo.

Los siguientes son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Se entiende que varias otras realizaciones pueden practicarse dada la descripción general mencionada más arriba.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Análisis de la expresión de c-met y EGFR en líneas de células de NSCLC y muestras de tumores.

Materiales y métodos

Estudios de micromatriz El análisis de expresión de gen básico de las líneas de células de NSCLC y de tumores primarios se llevó adelante con RNA extraído de cultivo de células sub-confluentes o lisatos de tumor congelado de la plataforma de microensayos Affymetrix (Santa Clara, CA) (HGU133Plus_2.0 chips). La preparación de RNA complementario, hibridaciones de matriz, y análisis de datos posterior se llevó adelante con protocolos de fabricación esencialmente como se describen en Hoffman EP *et al.*, *Nat Rev Genet* 5:229–37 (2004).

A fin de evaluar la correlación de una expresión c-met con una expresión de otra tirosina quinasas receptoras (RTKs) expresados en especímenes de NSCLC, se utilizó un filtro de variación para excluir los genes con variación mínima en las muestras a ser analizadas. Los genes con expresión mínima (aquellos para los que la variación absoluta (máx–min) en las muestras fue < 1000) se excluyen de los pasos siguientes del análisis. Además, se eligió una sola sonda para representar un gen. Los coeficientes de correlación de ranking de Spearman (ρ)

fueron determinados para cada gen contra una sonda de *MET* mRNA (ID de la sonda: 203510_at) o proteína c-met (IHC).

PCR cuantitativo. Los niveles de expresión de EGFR y *MET* mRNA fueron evaluados por RT-PCR cuantitativo utilizando técnicas estándar Taqman. Los niveles de transcripción fueron normalizados al gen de mantenimiento de la proteína ribosomal L19 (RPL19) y los resultados fueron expresados en sus valores normales de expresión ($=2^{-\Delta Ct}$) o en expresión normalizada relativa a fuente de reserva de tejido ($=2^{-\Delta\Delta Ct}$). Se utilizaron los siguientes grupos de cebadores/sondas:

RPL19: cebador directo, 5'-ACCCCAATGAGACCAATGAAATC-3' (SEC ID N°: 26), cebador inverso, 5'-ATCTTTGATGAGCTTCCGGATCT-3' (SEC ID N°: 27),

sonda, 5'(VIC)- AATGCCAACTCCCGTCAG-(MGBNFQ)-3' (SEC ID N°: 28);

MET: cebador directo, 5'- CATTAAGGAGACCTCACCATAGCTAAT-3' (SEC ID N°: 29),

cebador inverso, 5'- CCTGATCGAGAAACCACAACCT-3' (SEC ID N°: 30),

sonda, 5'(FAM)- CATGAAGCGACCCTCTGATGTCCCA-(BHQ-1)-3' (SEC ID N°: 31); Los grupos de cebadores/sondas para *EGFR* fueron adquiridos de Applied Biosystems (cat # 4331182, Hs00193306; Foster City, CA).

Immunohistoquímica (IHC). Los especímenes fijados en formalina y embebidos en parafina fueron divididos en secciones de 5 micrones de espesor. Luego de la desparafinación y rehidratación, las secciones fueron procesadas para el análisis de IHC de c-Met y EGFR. La IHC de EGFR fue realizada con el Kit pharmDx™ para EGFR (Dako, Glostrup, Dinamarca) según las instrucciones del fabricante. Para la inmunohistoquímica (IHC) de c-met, se realizó la extracción del antígeno con un buffer precalentado Target Retrieval (Dako, Glostrup, Dinamarca) a 99°C durante 40 minutos para la IHC de c-met. La actividad peroxidasa endógena se neutralizó con KPL Blocking Solution (KPL, Gaithersburg, MD) a temperatura ambiente durante 4 minutos. La avidina/biotina endógena fue

bloqueada con el Kit Vector Avidin Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Luego, las secciones se incubaron con 10 µg/ml anticuerpo monoclonal anti-c-met de ratón (clon DL-21) (Upstate Biotechnology Inc. Lake Placid, NY) en suero bloqueante durante 60 minutos a temperatura ambiente, seguida de la incubación con anticuerpos secundarios biotinilados anti-ratón de caballo durante 30 minutos. Para desarrollar las secciones, se utilizó Vectastain ABC Elite Reagent (Vector Laboratory, Burlingame, CA) con Metal Enhanced DAB (Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL). Los niveles de expresión fueron clasificados como: negativo (–), débil (+), moderado (++) o fuerte (+++). Las líneas de células o espécimen del tumor que contiene más de 10% de las células del tumor con coloración débil, moderada o fuerte se consideró positivo.

Cultivo de células y muestras del tumor Las líneas celular se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo [American Type Culture Collection], del depósito de la División de Tratamiento de Cáncer y Diagnóstico del Instituto Nacional de Cáncer [NCI Division of Cancer Treatment and Diagnosis], y de Recursos Científicos de la Salud Japoneses [Japanese Health Sciences Resources], tal como se muestra en la Tabla 1. Todas las líneas de celulares fueron mantenidas en RPMI 1640 complementado con 10% FBS (Sigma, St. Louis, MO), y 2 mM de L-glutamina. Las muestras de tumores fueron obtenidas de la Universidad de Michigan, Cybrdio, Cooperative Human Tissue Network y de Integrated Laboratory services.

Tabla 1: Líneas de células usadas en Ejemplos.

Línea de célula	Fuente	Taqman	IHC
A427	ATCC*	X	
A549	ATCC	X	X
ABC-1	Científicos de Salud Japoneses**		X
Calu-1	ATCC	X	X

124

	Científicos de Salud Japoneses		
EBC-1			X
EKVX	NCI-DCTD***	X	X
H1155	ATCC	X	
H1299	ATCC	X	X
H1435	ATCC	X	X
H1568	ATCC	X	X
H1650	ATCC	X	X
H1651	ATCC	X	X
H1666	ATCC	X	X
H1703	ATCC	X	X
H1781	ATCC	X	X
H1793	ATCC	X	X
H1838	ATCC	X	X
H1975	ATCC	X	X
H2009	ATCC	X	X
H2030	ATCC	X	X
H2122	ATCC	X	X
H2126	ATCC	X	X
H226	ATCC	X	X
H23	ATCC	X	X
H2405	ATCC	X	X
H292	ATCC	X	X
H322T	ATCC	X	X
H358	ATCC	X	X
H441	ATCC	X	X
H460	ATCC	X	X
H520	ATCC	X	X
H522	ATCC	X	X
H596	ATCC	X	X
H647	ATCC	X	X
H650	ATCC	X	X
H661	ATCC	X	X

H838	ATCC	X	X
HLFα	ATCC	X	
HOP 18	NCI-DCTD	X	X
HOP 62	NCI-DCTD	X	X
HOP 92	NCI-DCTD	X	X
	Científicos de Salud		
KNS-62	Japoneses		X
LXFL 529	NCI-DCTD	X	X
	Científicos de Salud		
RERF- LC-Ad1	Japoneses		X
	Científicos de Salud		
RERF- LC-KJ	Japoneses		X
	Científicos de Salud		
RERF- LC-MS	Japoneses		X
	Científicos de Salud		
RERF- LC-OK	Japoneses		X
SK-MES- 1	ATCC	X	X
SW1573	ATCC	X	X
	Científicos de Salud		
VMRC- LCD	Japoneses		X

* Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés)

** Recursos Científicos de la Salud Japoneses

*** División de Tratamiento de Cáncer y Diagnóstico del Instituto Nacional de Cáncer (NCI-DCTD, por sus siglas en inglés)

Resultados

La expresión de MET mRNA se correlaciona con la expresión EGFR mRNA

en las líneas de células de NSCLC.

A los fines de evaluar si la expresión de c-met se correlaciona con la expresión de EGFR y otra de tirosina quinasas receptora (RTKs) en líneas de células de NSCLC, se determinaron coeficientes de correlación del ranking de spearman a partir de datos de expresión de gen basados en micromatriz generados de 50 líneas de células de NSCLC que se muestran en la Tabla 1. Los niveles de *EGFR* y *MET* mRNA se correlacionaron positivamente en las líneas de células ($p=0,54$, $p<0,0001$) y expresión de *EGFR* fue altamente correlacionada con la expresión MET (Tabla 2).

Tabla 2. Correlación de expresión RTK mRNA con expresión de MET mRNA en líneas de células de NSCLC.

Gen	Spearman ρ	Valor- p (dos colas)
EPHA2	0,5516	$P<0,0001$
EGFR	0,5412	$P<0,0001$
EPHB2	0,5169	0,0001
ROR1	0,5115	0,0001
MST1R	0,4719	0,0005
EPHA1	0,4219	0,0023
EPHA4	0,4217	0,0023
ERBB3	0,3736	0,0075
DDR1	0,2985	0,0352
EPHB4	0,2751	0,0532
ERBB2	0,2533	0,0759
AXL	0,2396	0,0938
STYK1	0,1389	0,336
EPHB6	0,1219	0,3989
KIT	0,08365	0,5636
PDGFRB	0,0557	0,7008
TEK	-0,009277	0,949
PDGFRA	-0,03757	0,7956
EPHA3	-0,04528	0,7548
TYRO3	-0,05786	0,6898

MERTK	−0,07213	0,6187
INSR	−0,1031	0,476
FGFR4	−0,1037	0,4737
RYK	−0,1587	0,271
FGFR2	−0,1653	0,2513
PTK7	−0,1683	0,2427
EPHA5	−0,1693	0,2399
EPHA7	−0,1712	0,2346
IGF1R	−0,1782	0,2157
DDR2	−0,2249	0,1164
FGFR3	−0,2382	0,0957
FGFR1	−0,4131	0,0029

La expresión de proteína cMET se correlaciona con la expresión de EGFR mRNA en las líneas de células de NSCLC

A los fines de evaluar si una expresión de proteína c-met, determinada por inmunoquímica (IHC), se correlaciona con la expresión de EGFR y otra tirosina quinasas receptora (RTKs) en las líneas de células de NSCLC, los coeficientes de correlación del ranking de spearman se determinaron a partir de los datos de expresión de gen basados en micromatriz generados en 50 líneas de células de NSCLC que se muestran en la Tabla 1. Los niveles de proteína de EGFR mRNA y c-met se correlacionaron positivamente en las líneas de células ($p=0,50$, $p=0,002$) y expresión de EGFR estaba altamente correlacionada con la expresión de la proteína de c-met (Tabla 3).

Tabla 3. Correlación de expresión de RTK mRNA con la expresión de proteína c-MET (IHC) en líneas de células de NSCLC.

Parámetro	Spearman ρ	Valor-p (dos colas)
MET	0,789	$P<0,0001$
EPHB2	0,5651	$P<0,0001$
EPHA2	0,5154	0,0002
EGFR	0,5005	0,0002

ROR1	0,4653	0,0008
MST1R	0,4386	0,0016
EPHA1	0,4316	0,002
ERBB2	0,3246	0,0229
AXL	0,3165	0,0267
EPHA4	0,2748	0,0561
ERBB3	0,2628	0,0681
EPHB4	0,2362	0,1023
DDR1	0,2354	0,1034
STYK1	0,1163	0,4263
TYRO3	0,09579	0,5126
KIT	0,04308	0,7688
PDGFRB	0,04063	0,7816
IGF1R	-0,000919	0,995
EPHB6	-0,002974	0,9838
MERTK	-0,02735	0,852
FGFR2	-0,06236	0,6703
TEK	-0,07868	0,591
PDGFRA	-0,1085	0,4579
PTK7	-0,1471	0,3132
EPHA3	-0,1693	0,245
DDR2	-0,1699	0,2432
RYK	-0,1741	0,2316
FGFR4	-0,1801	0,2155
INSR	-0,1891	0,1932
EPHA5	-0,2246	0,1208
EPHA7	-0,2925	0,0414
FGFR3	-0,3264	0,0221
FGFR1	-0,5078	0,0002

La expresión MET mRNA correlaciona con la expresión EGFR mRNA en muestras de tumor de NSCLC.

A los fines de evaluar si una expresión de c-met mRNA se correlaciona con la expresión de EGFR y otra de tirosina quinasas receptora (RTKs) en las líneas

celulares de NSCLC que se muestran en la Tabla 1, los coeficientes de correlación de ranking spearman se determinaron a partir de datos de expresión de gen basados en micromatriz generados de 78 tumores de NSCLC. La expresión de *EGFR* mRNA y *MET* mRNA se correlaciona positivamente en tumores de NSCLC ($\rho=0,26$, $p=0,02$) (Tabla 4).

Tabla 4. Correlación de expresión de RTK mRNA con expresión de MET mRNA en tumores de NSCLC.

Parámetro	Spearman ρ	valor-p (dos colas)
MST1R	0,5856	P<0,0001
EPHA2	0,4247	0,0001
CSF1R	0,3249	0,0037
EPHA1	0,3104	0,0057
ERBB2	0,2952	0,0087
AXL	0,2912	0,0097
EPHB2	0,2572	0,023
EGFR	0,2564	0,0235
KDR	0,1973	0,0833
DDR2	0,1856	0,1037
PDGFRB	0,1827	0,1094
EPHB4	0,1763	0,1227
ERBB3	0,1749	0,1257
TEK	0,1514	0,1858
EPHA4	0,1311	0,2526
DDR1	0,07695	0,5031
ALK	0,03423	0,7661
INSR	-0,07637	0,5063
PTK7	-0,07702	0,5027
MERTK	-0,0794	0,4895
EPHA3	-0,1008	0,38
PDGFRA	-0,1296	0,2581
FGFR1	-0,142	0,2149
FGFR2	-0,1688	0,1397

FGFR3	-0,1812	0,1123
EPHB3	-0,2269	0,0457
IGF1R	-0,2673	0,018
EPHB1	-0,3318	0,003
KIT	-0,3878	0,0005
RYK	-0,3959	0,0003
EPHA7	-0,5231	P<0,0001

La coexpresión de EGFR y MET en líneas de células de NSCLC y tumores primarios.

A los fines de evaluar si c-met y EGFR se coexpresan en las líneas de células de NSCLC y muestras de tumores primarios, la expresión de *EGFR* y *MET* mRNA se determinó mediante RT-PCR cuantitativa en un panel de líneas de células de NSCLC (como se indica en la Tabla 1) o lisatos de tumores de NSCLC primarios congelados. Los niveles de *EGFR* y *MET* mRNA se correlacionaron positivamente en las líneas de células ($\rho=0,59$, $p<0,0001$) (Figura 1, panel izquierdo) y especímenes de NSCLC primarios ($\rho=0,48$, $p=0,0003$) (Figura 1, panel derecho). Estos datos demuestran que hay una superposición en la expresión de *MET* y *EGFR* en las líneas de células NSCLC y muestras de tumores primarios.

Confirmación de coexpresión EGFR y MET mediante IHC en líneas de células de NSCLC y tumores primarios.

Cuarenta y siete líneas de células de cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC) (como se indica en la Tabla 1) y ciento treinta y ocho muestra de NSCLC primario (colección Genentech) se examinaron por su expresión c-met y EGFR IHC mediante IHC. Los niveles de expresión se clasificaron como negativo (-), débil (+), moderado (++) o fuerte (+++), y una línea de célula o espécimen de tumor que contenía más de 10% células de tumor con coloración débil, moderada o fuerte se clasificó como positiva.

79% (37/47) de las líneas de células y 68% (94/138) de los tumores de NSCLC marcaron positivos para EGFR (Tabla 5). Las muestras positivas de

EGFR (79% de las líneas de células y 68% de tumores primarios) se siguieron estratificando en base a los niveles de expresión de c-met (Tabla 5). Las líneas de células positivas de EGFR exhibieron expresión de c-met débil (22%), moderada (57%) y fuerte (19%), y las muestras de tumor primario de EGFR positivas fueron positivas de una manera débil o moderada. El subtipo de adenocarcinoma fue comúnmente positivo para la coloración de c-met que el subtipo de célula escamoso (70% versus 40%), con más casos de coloración moderada (30% versus 7%). Estos datos demuestran una superposición significativa entre la expresión c-met y EGFR en líneas de células de NSCLC y muestras de tumores, particularmente en el subtipo de tumor de adenocarcinoma.

Tabla 5. Coexpresión de proteínas de EGFR y MET en las líneas de células de NSCLC y tumores primarios.

Fuente de tejido	Subtipo histopatológico	Calificación de c-met IHC en especímenes EGFR+			
		-	+	++	+++
Líneas de células*		3% (n=1)	22% (n=8)	57% (n=21)	19% (n=7)
Tumores**	Adenocarcinoma	30% (n=14)	40% (n=19)	30% (n=14)	0%
	Célula escamosa	61% (n=28)	33% (n=15)	7% (n=3)	0%

*79% (37/47) de líneas de células de NSCLC con coloración positiva para EGFR

**68% (94/138) de tumores de NSCLC con coloración positiva para EGFR

Ejemplo 2: La reducción de la expresión de la proteína c-met en las células de NSCLC aumenta la activación inducida por ligando de EGFR, Her2 y Her3.

Materiales y métodos

Construcciones Retrovirales shRNA. Las secuencias codificadas shRNA de oligonucleótidos contra c-met (5'-GATCCCC**GAA**CAGAA**TCACTGACATATTCAAGAGATATGTCAGTGATTCTGT**TCTTTTTTGGAAA-3' (SEC ID N°: 32) (shMet 3) y

5'-GATCCCC**GAA**ACTGTATGCTGGATGATTCAAGAGAT**TCATCCAGCATACAGTTTCTTTTTTGGAAA** (SEC ID N°: 33) (shMet 4)) se clonaron en ubicaciones BglII/HindIII del vector corriente abajo pShuttle-H1 del promotor H1 (David Davis, GNE). El texto en NEGRITA simboliza la secuencia objetivo de hibridación. Estas construcciones se recombinaron con el vector retroviral pHUSH-GW (Gray D et al *BMC Biotechnology*. 2007; 7:61) y se utilizó la enzima Clonasa II (gen invitro), y se generó una construcción en la que la expresión shRNA se encuentra bajo el control de un promotor inducible. El tratamiento con la tetraciclina análoga doxíciclina resulta en la expresión shRNA. David Davis, Genentech, Inc proveyó la construcción retroviral de control shGFP2 que contiene a shRNA dirigido contra GFP (Hoeflich et al. *Cancer Res.* (2006) 66(2):999-1006) shGFP2 contiene el siguiente oligonucleótido:

(EGFP) shRNA

(sentido) 5'-

GATCCCCAGATCCGCCACAACATCGATTCAAGAGATCGATGTTGTGGCGGATC
TTGTTTTTTGGAAA-3 (SEC ID N°:34).

Cultivo de células. Las células empaquetadoras (Clontech) se mantuvieron en HGD MEM (GNE) complementado con 10% de Tet-Free FBS (Clontech), 2mM L-Glutamina (GNE) y 100U/ml penicilina y 100U/ml estreptomicina (Gibco). Las células H441 (ATCC No. HTB-174) se mantuvieron en un medio 50:50 (DMEM:F12, MediaTech) complementado con 10% Tet-Free FBS (Clontech), 2mM L-Glutamina (GNE), y 100U/ml penicilina y 100U/ml estreptomicina (Gibco). Las células EBC-1 (Japanese Health Sciences Resources; ver *Cancer Res.* (2005) 65(16):7276-82) se mantuvieron en RPMI 1640 (GNE) complementado con 10% Tet-Free FBS (Clontech), 2mM L-Glutamina (GNE), y 100U/ml penicilina y 100U/ml estreptomicina (Gibco). Las células se mantuvieron a 37°C con 5%

CO2.

Desarrollo del retrovirus recombinado y líneas estables. Las células empaquetadoras GP-293 se cotransfectaron con FuGene 6 (Roche) y CalPhos Mammalian Transfection kit (Clontech) con pVSV-G (Clontech) y las construcciones retrovirales recombinadas mencionadas. El medio que contenía el virus recombinado luego se agregó a células EBC-1 y H441 y se seleccionaron las células en Puromicina (Clontech). Las células que expresaban en forma estable las construcciones retrovirales luego se autoclonaron por medio de FACS en placas de 96 pocillos.

Western Blot. Para resolver las proteínas, se colocaron 20 ug de lisato de célula completa en gel 4-12% Bis-Tris NuPAGE con buffer MOPS (Invitrogen). Los geles se equilibraron en 2X NUPAGE buffer de transferencia con buffer antioxidante y luego se los transfirió a 0,2 um PVDF de membrana por iBlot. Las membranas se bloquearon en TBST (10mM TRIS, pH 8,0, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20) con 5% BSA por una hora a temperatura ambiente y luego incubaron toda la noche en un anticuerpo primario diluido en buffer bloqueador a 4°C. Las membranas se lavaron con TBST y luego se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado HRP (GE Healthcare) en TBST con 5% de leche descremada durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos se detectaron mediante quimoluminiscencia (GE Healthcare, ECL Plus).

Seguimiento de las líneas celulares estables. Los clones a los que se les transfirieron las construcciones retrovirales se cultivaron en un medio apropiado +/- 1µg/ml doxiciclina (Clontech) para inducir la expresión del shRNA, y se los monitoreó mediante el método western blot para el knockdown de c-met y se utilizó el anticuerpo anti-c-met C-12 (Santa Cruz Biotech). Fosfo-c-met se transfirió para utilizar anti-fosfo-c-met Y1003 (Biosource) y anticuerpos anti-fosfo-c-met Y1234/1234 (señalización de células). Como un control, se transfirió actina para utilizar el anticuerpo anti-Actin I-19 (Santa Cruz Biotech). El clon EBC 3,15 y el clon EBC 4,12 mostró una fuerte reducción de la expresión met y los niveles fosfo c-met, el clon H441 3,11 y el clon H441 3,1 mostraron una reducción

inmediata de la expresión c-met y la expresión fosfo-met y el clon EBC 4,5 mostró una menor reducción de la expresión c-met y la expresión fosfo-c-met.

Las líneas celulares EBC clon 4,5, el clon EBC 4,12 contenían construcciones shMet4 y las líneas celulares H441 clon 3,1, el clon H441 3,11, y el clon EBC 3,15 contenían construcciones shMet 3.

Experimentos de reacción a ligando. Las células a las que se las trató con/sin doxiciclina durante 48 horas (EBC shmet) o 6 días (H441 shMet) fueron colocadas en las placas a 1×10^6 células/pocillos en una placa de 6 pocillos con/sin Dox (0,1 ug/ml) en 10% FBS-RPMI y luego se las incubó durante la noche a 37C. Las células se enjuagaron con PBS, y se cambió el medio a 0,5% BSA-RPMI (con/sin doxiciclina) a células privadas de suero durante 2 horas a 37C. El medio con ligando (20 nM TGF α o 2nM HRG) se agregó a los pocillos y se incubó durante 20 minutos a 37C. Se enjuagó los platillos con TBS frío y luego se los disolvió por la acción de lisinas con TBS, 1% NP-40, coctel de inhibidor proteasa completa (Roche) y coctel de inhibidor fosfatasa 1 y 2 (Sigma). La monocapa y el supernatante se desecharon del pocillo y se transfirieron a tubos de microfuga donde se incubó el lisato en hielo durante 10-30 minutos. Los restos de las células se comprimieron mediante microfuga y se transfirió al supernatante a un tubo fresco. La concentración de proteína se cuantificó mediante el ensayo BCA (Pierce), y los lisatos se alojaron a -20C hasta que se los descongeló para la electroforesis. Se colocaron 20ug (EBC1) o 15ug (H441) lisato de célula completa en geles y se transfirieron para fosfo-c-met (YY1234/35, 3126 de Cell Signaling Technology), c-met total (C12, sc-10 de San Cruz Biotechnology), b-actina (I-19, sc-1616 de Santa Cruz Biotechnology), fosfo-EGFR (Y1173, 04-341 de Upstate), EGFR total (MI-12-1, de MBL), fosfo-Her2 (YY1121/22, 2243 de Cell Signaling Technology), Her3 total (C18, sc-284, de San Cruz Biotechnology), fosfo-Her3 (Y1289, 4791, de Cell Signaling Technology), o Her3 total (C17, sc-285, de Santa Cruz Biotechnology) como se describe arriba.

Resultados

Los retrovirus portadores de tetraciclina inducible RNA horquillado corto

(shRNA) que atacaban a c-met se utilizaron para generar clones de líneas celulares estables NSCLC que pudieran inducirse a expresar shRNA para el knockdown de la expresión c-met. Para examinar el efecto del knockdown de c-met en la expresión y la fosforilación de los miembros de la familia EGFR en NSCLC línea celular EBC1, se cultivó en un medio de control o un medio con 0,1ug/ml Dox durante 48 horas células EBC1 shMet 4,12 que contenían shRNA inducible dirigido contra met o shRNA de control dirigido contra GFP. Luego de la privación del suero durante dos horas, las células fueron tratadas o no tratadas con TGF α o Heregulina b1 durante 20 minutos. Los lisatos de células completos se evaluaron para la expresión de las proteínas totales o las fosfo-proteínas como se señaló.

Las células EBC1 tratadas con Dox en las cuales la expresión proteína c-met estuvo sujeta a knockdown con shRNA (Figura 2; EBCshMet 4.12, Dox, panel izquierdo), pero las células de control EBC1 no tratadas con Dox (Figura 2; shGFP2, panel derecho) mostraron un incremento de pEGFR y pHer2 en respuesta al tratamiento TGF α y un aumento de pHer3 en respuesta al tratamiento con Heregulina, así como también un aumento de pAKT tanto con el tratamiento TGF α como Heregulina. Las células EBC shMet 4,12 tratadas con Dox (sin estimulación de ligando) mostraron un aumento en Her2 total y Her3 total, y una disminución en pEGFR y pHer3. Las células EBC1 no mostraron una inducción fuerte de pEGFR, pHer2, pHer3, o pAKT en respuesta al tratamiento TGF α o el tratamiento con Heregulina en ausencia del knockdown de c-met.

Para examinar el efecto del knockdown de c-met en la expresión y la fosforilación de los miembros de la familia EGFR en otra línea de células de NSCLC, se cultivó en un medio de control o un medio con 0,1ug/ml Dox durante 48 horas células NSCLC H441 que contenían shRNA inducible dirigido contra met o shRNA de control dirigido contra GFP. Luego de la privación del suero durante dos horas, las células fueron tratadas o no tratadas con TGF α o Heregulina b1 durante 20 minutos. Los lisatos de células completas se evaluaron para la expresión de las proteínas totales o las fosfo-proteínas como se señaló.

Las células H441 en las que c-met estuvo sujeto a knockdown con shRNA (Figura 3; shMet 3,1 tratado con Dox, panel izquierdo y shMet 3,11 tratado con Dox, panel del medio), pero las células de control H441 no tratadas con Dox (Figura 3; shGFP1, panel derecho) mostraron un aumento de pHer2 y pHer3 en respuesta al tratamiento Heregulina. Las células shMet 3,1 y shMet 3,11 tratadas con Dox también mostraron un aumento de Her3 total y una disminución de pEGFR. A diferencia de las células EBC1, las células H441 tienen una leve respuesta a TGF α (pEGFR) y Heregulina (pHer2 y pHer3) sin el knockdown c-met. Las células EBC1 poseen niveles más altos de c-met que las células H441.

Estos experimentos demostraron que la reducción de la expresión c-met en las líneas de células NSCLC lleva a la disminución de la activación de base de EGFR (pEGFR) y al aumento de la activación del ligando inducible de Her 2 y Her3, por lo tanto se sugiere que la inhibición Met aumenta la sensibilidad al ligando de la familia EGF.

Ejemplo 3: La combinación del knockdown de met y el tratamiento con el inhibidor EGFR erlotinib inhibió en forma significativa el crecimiento del tumor en un modelo de xenotransplante.

A los fines de evaluar si EGFR desempeña un papel para mantener la supervivencia del tumor en las células en donde la función se encuentra inhibida parcialmente, se trataron animales con tumores EBC-1 shMet-4,5 con combinaciones de erlotinib (Tarceva™) y Dox.

Materiales y métodos

Material de la prueba. OSI Pharmaceuticals proveyó el Erlotinib (Tarceva™) al Departamento de Fórmulas de Genentech y se pesó junto con una suficiente cantidad de vehículo (metilcelulosa tween (MCT)). Se almacenó a los materiales en un refrigerador configurado para mantener una temperatura de entre 4°C a 8°C. El Departamento de Ingeniería de Anticuerpos en Genentech Inc. proveyó el anticuerpo monoclonal monovalente anti-c-met Met Mab (rhu OA5D5v2) (WO2007/063816) en una forma líquida clara. La línea celular EBC-1 se obtuvo de Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB).

Especies. Cuarenta ratones sin pelo (nu/nu) se obtuvieron de los laboratorios Charles River Laboratories (CRL) y se los aclimató por al menos una semana en forma previa a someterlos a estudio. Se alojó a los animales en sistemas de jaulas ventiladas en cuartos con filtros que suministraban Aire de Partículas de Alta Eficiencia (HEPA). Sólo se utilizaron para el estudio animales que lucían saludables y se encontraban libres de anormalidades obvias.

Diseño del estudio. Las células EBC-1 se cultivaron en un medio de crecimiento compuesto por el medio RPMI 1640 (Invitrogen), 2 mM L-glutamina y 10% de suero fetal bovino. Para preparar a las células para su inoculación en los ratones se las transfectó, se las lavó con diez mililitros de PBS buffer 1X estéril. Un subgrupo de células se contó mediante el método de exclusión con azul de tripano y el restante de las células se resuspendió en 100 μ l de PBS 1X estéril con una concentración de 5×10^7 células por mililitro. Se inoculó a los ratones en forma subcutánea en la región derecha sub-escapular con 5×10^6 de células EBC-1. Se monitoreó los tumores hasta que alcanzaron un volumen medio de 300 mm^3 . Se separó al azar, en cuatro grupos de diez ratones cada uno, a los ratones implantados con células tumorales, y se inició el tratamiento en cada uno (resumen en Tabla 6). Los ratones en el Grupo 1 (grupo de control) se trataron con 100 μ L de vehículo de control, metilcelulosa tween (MCT), todos los días (QD) mediante gavage oral (PO) y se los hacía ingerir agua potable con 5% de sacarosa. Los ratones en el Grupo 2 (grupo de knockdown de c-met) se trataron con 100 μ L MCT, QD, PO, pero se los hizo ingerir agua potable con 0,5 mg/mL de doxiciclina (Dox) en 5% sacarosa. Los ratones en el Grupo 3 (grupo tratado con erlotinib) se trataron con 100 mg/kg de erlotinib en un volumen de 100 μ L formulado en MCT, QD, PO y se los hizo ingerir agua potable con 5% de sacarosa. Los ratones en el Grupo 4 (grupo de silenciamiento c-met más erlotinib) se trataron con 100 mg/kg de erlotinib en un volumen de 100 μ L formulado en MCT, QD, PO y se los hizo ingerir agua potable con 1 mg/mL de doxiciclina (Dox) en 5% sacarosa. La Dox y el agua sacarosa se cambiaba cada dos o tres días. Se aplicaron dosis de Erlotinib y MCT por 14 días, se retiró por 6 días y se reanudó

por el tiempo restante del estudio (20 días). Se retiraba a los animales del estudio si los tumores crecían más de 1000 mm³ o si los tumores mostraban signos de lesiones necróticas. Si debía retirarse a más de 3 animales de un grupo, el tratamiento en ese grupo se detenía y todos los animales se retiraban del estudio. Todos los estudios y tratamientos en los ratones cumplieron con las pautas del Comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)).

Tabla 6
Diseño del Estudio

Grupo	Nro./Sexo	Material de la Prueba	Ruta	Frecuencia de la Dosis	Dosis. (mg/kg)	Conc. De Dosis (mg/ml)	Volumen de Dosis (µl)
1	10/F	MCT, 5% agua sacarosa	PO; agua potable	Todos los días (QD) por 2 semanas, se detuvo por 6 días y se reanudó hasta el final del estudio; mediante agua potable	0	0	100
2	10/F	MCT, 1 mg/mL Dox en 5% agua sacarosa	PO; agua potable	Todos los días (QD) por 2 semanas, se detuvo por 6 días y se reanudó hasta el final del estudio; mediante agua potable	0.5mg/mL en agua potable	0.5 (Dox)*	100
3	10/F	Erlotinib, 5% agua sacarosa	PO; Agua potable	Todos los días (QD) por 2 semanas, se detuvo por 6 días y se reanudó hasta el final del estudio; mediante agua potable	100	25 (erlotinib)	100
4	10/F	Erlotinib, 1 mg/mL Dox in 5% agua sacarosa	PO; agua potable	Todos los días (QD) por 2 semanas, se detuvo por 6 días y se reanudó hasta el final del estudio; mediante agua potable	100; 1 mg/mL en agua potable	25 (erlotinib); 1 (Dox)	100

*en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 61/034.446, se estableció en

forma incorrecta que la dosis de Dox era 1 mg/ml. La dosis correcta es 0,5 mg/ml, como se indica arriba.

Medición del Tumor y Peso Corporal. Los volúmenes de los tumores se midieron en dos dimensiones (largo y ancho) y se utilizaron calibradores UltraCal-IV (Modelo 54-10-111, Fred V. Fowler Company, Inc.; Newton, MA). La siguiente fórmula se utilizó con Excel v11.2 (Microsoft Corporation; Redmond, WA) para calcular el volumen del tumor:

$$\text{Volumen del tumor (mm}^3\text{)} = (\text{largo} \cdot \text{ancho}^2) \cdot 0,5$$

Análisis de la Eficacia de los Datos. La inhibición del tumor se representó mediante KaleidaGraph 3.6 (Synergy Software; Reading, PA). El porcentaje del crecimiento de la inhibición (%Inh) al día 17 se calculó de la siguiente manera:

$$\%Inh = 100X [\text{Tamaño del tumor (Vehículo)} - \{\text{Tamaño del tumor (MetMAb)/Tamaño del tumor (Vehículo)}\}]$$

La incidencia del tumor (IT) se determinó por un número de tumores susceptibles de medición al Día 17. La regresión parcial (RP) se define como regresión de tumor de > 50% pero < 100% desde el volumen inicial del tumor en cualquier día en el transcurso del estudio. La regresión completa (RC) se define como regresión del tumor del 100% desde el volumen inicial del tumor en cualquier día durante el transcurso del estudio.

El volumen promedio del tumor y el error estándar de la media (SEM) se calcularon con software JMP, versión 5.1.2 (SAS Institute; Cary, NC). El análisis de los datos y la generación de los valores p, ya sea mediante la prueba-t de Student o de Dunnett, también se realizó con software JMP, versión 5.1.2.

Resultados

La combinación del tratamiento de knockdown c-met y erlotinib inhibió el crecimiento del tumor de forma significativa en un modelo de xenotransplante.

A fin de investigar el papel de c-met en el crecimiento del tumor en el modelo EBC-1, se generaron clones EBC-1 estables que pudieran inducirse a expresar shRNAs para sujetar la expresión c-met a knockdown mediante retrovirus portadores de RNA horquillado corto (shRNA) tetraciclina inducible y c-

met objetivo. La línea de células del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) EBC-1 se amplifica altamente por c-met y expresa altas cantidades del receptor c-met, el cual actúa en forma independiente de ligando para conducir al crecimiento de la célula y del pulmón. El gen EGFR es un gen tipo salvaje en la línea celular EBC-1.

Luego de la inducción de la expresión shRNA con la tetraciclina análoga doxyciclina, el clon EBC-1 demostró su eficacia, y completó ampliamente el knockdown de la expresión c-met. La inducción de shRNA también bloqueó la proliferación de estas células como se analizó en los exámenes de viabilidad de células en Cell Titer Glo o Alamar Blue. Se observó que el crecimiento se detuvo, seguido de apoptosis en 15 células EBC 1 shMet3 luego de 24 a 72 después de la inducción de shRNA. El mismo clon de línea celular se implantó en un modelo animal, como se describe arriba (con la excepción de que los animales no se trataron con erlotinib) y permitió formar tumores. La inducción de la expresión shRNA luego de la formación del tumor en estos animales dio como resultado la regresión del tumor in vivo. Estos resultados demostraron que la expresión c-met es esencial para el crecimiento y supervivencia de las células EBC-1 in vitro e in vivo.

El clon EBC-1 shMet-4,5 mostró un knockdown parcial de la expresión c-met luego de la inducción de la expresión shRNA con Dox. La reducción en la expresión c-met también dio como resultado efectos sobre el crecimiento y supervivencia de las células en este clon: la inducción de la expresión shRNA redujo el número de células cuando se realizaron los exámenes in vitro de viabilidad de las células, y la inducción de la expresión shRNA luego de la formación del tumor en un modelo de xenotransplante inhibió el crecimiento del tumor pero no provocó la regresión.

El clon Ahmet-4,5 se seleccionó para su uso en experimentos que evalúan el efecto de la combinación del knockdown de la expresión c-met con el tratamiento erlotinib, como se describe abajo.

La línea celular EBC sh Met-4,5 se inoculó en ratones sin pelo y luego se

monitoreó a los animales para controlar el crecimiento del tumor hasta que las células injertadas produjeran tumores de aproximadamente 300 mm³. Luego se agrupó a los ratones en cuatro ramas de tratamiento. Grupo 1: Vehículos, Grupo 2: Doxiciclina (Dox), Grupo 3: erlotinib (100 mg/kg), y Grupo 4: erlotinib + Dox (Ver Tabla 6).

El tratamiento de ratones con erlotinib no tuvo efectos sobre el crecimiento del tumor (−6% de inhibición de tumor; Figura 4), mientras que el tratamiento con Dox (expresión inhibidora met) dio como resultado un 38% de reducción en el crecimiento del tumor comparado con el control de vehículo el día 19 (Figura 4; prueba t de Student, $p=0,084$), sin relevancia estadística. Sin embargo, la reducción del crecimiento del tumor fue estadísticamente significativa cuando se la comparó con el grupo que sólo utilizó erlotinib (prueba t de Student, $p=0,004$ Figura 4). La combinación de erlotinib y Dox dio como resultado una gran mejora en eficacia, y resultó en un 68% de reducción en el crecimiento del tumor comparado con el control de vehículo el día 19 (prueba-t de Student $p = 0,001$; Figura 4). El tratamiento con la combinación de erlotinib y Dox también tuvo como resultado una reducción estadística significativa en el crecimiento del tumor en comparación con el tratamiento en donde se utilizó sólo Dox (prueba-t de Student, $p = 0,03$) o el tratamiento en donde se utilizó sólo erlotinib (t-test de Student, $p < 0,0001$).

El tratamiento con Dox y erlotinib dio como resultado un mayor número de respuestas parciales (RP; definidas como regresión del tumor de $> 50\%$ pero $< 100\%$ del volumen inicial del tumor en cualquier día durante el estudio) y respuestas totales (RT; definidas como regresión del tumor del 100% desde el volumen inicial del tumor en cualquier día durante el estudio). Específicamente, la combinación de erlotinib más Dox dio como resultado 1RP y 3 RT, mientras que el tratamiento con erlotinib dio como resultado ninguna RP y ninguna RT y el tratamiento con Dox (knockdown de c-Met) dio como resultado 2 RP y 1RT. Esta información demuestra que la combinación de la inhibición met (tratamiento Dox) y la inhibición EGFR (tratamiento erlotinib) tienen más probabilidades de inducir a

las regresiones de tumor que la inhibición de c-met o EGFR solas, a pesar de que el análisis de la información individual de los tumores de los animales reveló que no todos los tumores respondieron rigurosamente a la combinación de la inhibición c-met y erlotinib.

Estos resultados muestran que la inhibición de c-met y EGFR en modelo de xenotransplante EBC-1 shMet-4,5 dio como resultado una significativa reducción del crecimiento del tumor. Por lo tanto, los tumores en los que la expresión y la actividad c-met se inhibieron parcialmente utilizan la vía EGFR para asegurar el crecimiento del tumor y su supervivencia. Esto indica que EGFR desempeña un papel en la supervivencia y crecimiento del tumor en aquellos tumores en los que c-met se inhibe.

Ejemplo 4: El tratamiento con un anticuerpo anti-c-met y el inhibidor EGFR erlotinib mostró una gran mejora en eficacia en contraposición con el tratamiento con el anticuerpo anti-c-met o erlotinib por separado.

Materiales y Métodos

Material de la prueba. El Departamento de Ingeniería de Anticuerpos en Genentech Inc. proveyó el anticuerpo monoclonal monovalente anti-c-met Met Mab (rhu OA5D5v2) en una forma líquida clara a 10,6 mg/ml. El vehículo fue 10 mM histidina succinato, 4% trehalosa dihidratada, 0,02% polisorbato 20, pH 5,7. OSI Pharmaceuticals proveyó Erlotinib (TARCEVA™) al Departamento de Farmacéutica de Genentech y se lo pesó junto con una suficiente cantidad de vehículo (metilcelulosa tween (MCT)). Todos los materiales se enviaron desde Genentech, Inc. al instituto Van Andel Research Institute (VARI; Grand Rapids, MI) y se formuló en forma previa a los tratamientos de animales.

Se almacenó a los materiales en un refrigerador configurado para mantener una temperatura de entre 4°C a 8°C. La línea celular NCI-H596 se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA).

Especies. Se obtuvieron 40 ratones transgénicos C3H-SCID con HGF humano (hu-HGF-Tg-C3H-SCID) de la colonia que posee el Van Andel Research Institute (VARI; Grand Rapids, MI). Se obtuvieron cinco ratones C3H-

SCID de los laboratorios Jackson Laboratories. Los animales tenían entre 4 y 6 semanas y pesaban entre 21 y 22 gramos cada uno. Se aclimató a los ratones a las condiciones de estudio por lo menos durante tres días previos a las inoculaciones de células tumorales. Los ratones se alojaron en instalaciones aisladas con duchas. Se alojó a los animales en sistemas de jaulas ventiladas en cuartos con filtros que suministraban Aire de Partículas de Alta Eficiencia (HEPA). Sólo se utilizaron para el estudio animales que lucían saludables y se encontraban libres de anormalidades obvias.

Diseño del estudio. Debido a que los tumores HGF se conducidos en forma paracrina, se seleccionó un modelo de xenotrasplante que modela el crecimiento por mecanismos paracrinós. El ratón HGF es un ligando débil para el c-met humano, lo que lleva a una baja respuesta biológica de las líneas celulares humanas c-met al ratón HGF (Bhargava, M., *et al.*, 1992; Rong, S., *et al.*, 1992). Por lo tanto, para imitar los tumores humanos conducidos por HGF, se generaron ratones transgénicos (hu-HGF-Tg-SCID) desde el promotor metaloteioneina que expresan el HGF humano de forma ubicua (Zhang, Y., *et al.*, 2005). Los niveles de suero HGF en los ratones hu-HGF-Tg-SCID son ~5-10 veces más altos que los niveles fisiológicos (1-5 ng/mL vs. 0,2-0,5 ng/mL) y las líneas celulares que respondieron a HGF mediante la proliferación in vitro, mostraron un gran aumento del crecimiento del tumor cuando se los cultivó como tumores xenotrasplantados en los ratones hu-HGF-Tg-SCID.

La línea celular del cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC) NCI-H596 se seleccionó para estudios de eficacia in vivo en ratones hu-HGF-Tg-SCID ya que esta línea celular responde altamente a HGF y un anticuerpo anti-c-met, MetMat, bloquea la proliferación con vías de HGF de esta línea celular in vitro (Kong-Beltran, M., *et al.*, 2006). La línea celular NCI-H596 posee una forma mutante del gen c-met que no posee exón 14, que codifica una posición de unión para la ubiquitina ligasa E3 Cbl (Kong-Beltran, M., 2006). La posición de unión Cbl se fosforiliza en tirosina 1003 (Y1003) luego de la unión HGF, y permite así que Cbl pueda unirse y ubiquitinar a c-met, por lo tanto, atacando así para la

degradación proteosomal (Peschard, P., *et al.*, 2001). La capacidad de respuesta de NCI-H596 también puede verse *in vivo*, ya que la línea celular forma tumores en ratones HGF-Tg-SCID (que expresan el HGF humano, como se detalla arriba), pero no formará tumores en ratones inmunocomprometidos que no posean el HGF humano (ratones sin pelo *nu/nu* o ratones SCID). Se considera que las células NCI-H596 forman tumores conducidos por *c-met*. Las células NCI-H596 poseen un gen de EGFR tipo salvaje y son sensibles al inhibidor erlotinib (TARCEVA™) EGFR cuando se las cultiva en presencia de TGF α , como se demostró mediante la viabilidad de célula reducida cuando se la cultivó en presencia de erlotinib y TGF α .

Las células NCI-H596 se cultivaron en un medio de crecimiento que consistía en un medio RPMI 1640 (Invitrogen), 2nM L-glutamina, y 10% de suero fetal bovino. Para preparar las células para la inoculación en los ratones, se transfectó y lavó las células con diez mililitros de PBS buffer 1X estéril. Un subgrupo de células se contó mediante el método de exclusión con azul de tripano y el restante de las células se suspendió en 100 μ l de PBS 1X estéril con una concentración de 5×10^7 células por mililitro.

Se preparó a los ratones para la inoculación y se los afeitó en el área dorsal con una máquina de afeitar. Al día siguiente cada ratón se inoculó en forma subcutánea en la región derecha sub-escapular con 5×10^6 de células NCI-H596. Se monitoreó los tumores hasta que alcanzaron un volumen medio de 100 mm³.

Los ratones HGF-Tg-C3H-SCID se separaron al azar en dos grupos de once ratones cada uno y se les dio una inyección intraperitoneal de material de prueba dos veces a la semana durante cuatro semanas. Los animales en el Grupo 1 recibieron 100 μ l de vehículo y los animales del Grupo 2 recibieron 30 mg/kg de anticuerpo monoclonal monovalente anti-*c-met* Met Mab. El diseño del estudio se presenta en la Tabla 7. Los tumores se midieron 3 veces a la semana durante cinco semanas y se comenzó el día del tratamiento. Se sacrificó a los animales luego de cinco semanas, a pesar de que se sacrificó a algunos animales antes de ese tiempo debido a grandes volúmenes de tumores (> 1500 mm³). Asimismo se inoculó a los ratones de control C3H-SCID para servir como un control negativo

para el crecimiento tumoral y se monitoreó su crecimiento tumoral durante cinco semanas.

Todos los estudios y tratamientos en los ratones cumplieron con las pautas del Comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Tabla 7
Diseño del Estudio

Grupo	Nro./Sexo	Material de la Prueba	Ruta	Frecuencia de la Dosis	Dosis. (mg/kg)	Conc. Dosis (mg/ml)	Volumen de Dosis (µl)
1	10/F	Vehículos: Captisol; MetMAb buffer	PO; IP	Todos los días (QD) por 2 semanas; Una vez	0	0	100 (ea.)
2	10/F	Erlotinib	PO	Todos los días(QD) por 2 semanas	150	30	100
3	10/F	MetMAb	IP	Una vez	30	6	100
4	10/F	Erlotinib + MetMAb	PO; IP	Todos los días(QD) por 2 semanas; una vez	150; 30	30; 6	100 (ea.)

Medición del Tumor y del Peso Corporal. Los volúmenes de los tumores se midieron en dos dimensiones (largo y ancho) y se utilizaron calibradores UltraCal–IV (Modelo 54–10–111, Fred V. Fowler Company, Inc.; Newton, MA). La siguiente fórmula se utilizó con Excel v11.2 (Microsoft Corporation; Redmond, WA) para calcular el volumen del tumor:

$$\text{Volumen del tumor (mm}^3\text{)} = (\text{largo} \cdot \text{ancho}^2) \cdot 0,5$$

Análisis de la Eficacia de los Datos. La inhibición del tumor se representó mediante KaleidaGraph 3.6 (Synergy Software; Reading, PA). El porcentaje de inhibición del crecimiento (%Inh) al día 17 se calculó de la siguiente manera:

$$\%Inh = 100X \left[\frac{\text{Tamaño del tumor (Vehículo)} - \{\text{Tamaño del tumor (MetMAb)}\}}{\text{Tamaño del tumor (Vehículo)}} \right]$$

La incidencia del tumor (IT) se determinó por un número de tumores susceptibles de medición al Día 17. La regresión parcial (RP) se define como regresión de tumor de $> 50\%$ pero $< 100\%$ desde volumen inicial del tumor en cualquier día en el transcurso del estudio. La regresión completa (RC) se define como regresión del tumor del 100% desde el volumen inicial del tumor en cualquier día durante el transcurso del estudio.

El volumen medio del tumor y el error estándar de la media (SEM) se calcularon con software JMP, versión 5.1.2 (SAS Institute; Cary, NC). El análisis de los datos y la generación de los valores p, ya sea mediante la prueba-t de Student o de Dunnett, también se realizó con software JMP, versión 5.1.2.

Las estimaciones de la curva de supervivencia de Kaplan–Meier se realizaron por el tiempo en que el tumor doblaba su volumen para cada grupo. Se realizaron comparaciones por pares entre los grupos. Se realizaron comparaciones estadísticas con la prueba log–rank. El análisis de la información se realizó con software JMP.

Resultados

La línea de células de NSCLC NCI–H596 se inoculó en animales hu–HGF–Tg–C3H–SCID y se monitoreó el crecimiento de su tumor hasta que las células injertadas formaron tumores de aproximadamente 100 mm^3 . Luego se agrupó a los ratones en cuatro ramas de tratamiento; grupo 1: Vehículo, grupo 2: Erlotinib, grupo 3: MetMAb, y grupo 4: Erlotinib + MetMAb (Ver Tabla 7). Los grupos tratados con MeMAb recibieron la dosis sólo una vez mientras que los grupos tratados con Erlotinib recibieron la dosis todos los días durante dos semanas y luego se detuvo el tratamiento y el crecimiento del tumor se monitoreó dos o tres veces por semana. Los ratones de control C3H–SCID también se inocularon y se monitoreó el crecimiento de tumores NCI–H596 que no estaban expuestos a HGF humano.

El crecimiento de los tumores NCI–H596 mejoró ampliamente en el contexto de los ratones hu–HGF–Tg–C3H–SCID comparado con los ratones de control C3H–SCID (Figura 5; comparar grupo de control de vehículo con C3H–

SCID). El tratamiento de los ratones con el anticuerpo monoclonal monovalente anti-c-met Met Mab dio como resultado una reducción del 67% en el crecimiento del tumor comparado con el control de vehículo el día 20 (Figura 5; prueba t de Student, $p=0,0044$), en forma consistente con los estudios anteriores de Met Mab en los modelos NCI-H596. El tratamiento de ratones con tumores NCI-H596 resultó en una reducción estadísticamente insignificante del crecimiento del tumor comparado con el control de vehículo en el día 20 (figura 5; prueba t de Student, $p=0,0165$). El tratamiento con la combinación de MetMab y erlotinib mostró una gran mejora en la eficacia, y dio como resultado una reducción del 89% en el crecimiento del tumor comparado con el control de vehículo el día 20 (Figura 5; prueba-t de Student, $p=0,0035$).

El tratamiento de los ratones con MetMab dio como resultado una reducción del tumor de un 67% comparado con el control de vehículo el día 20 (Figura 5; prueba t de Student, $p=0,0044$), lo que coincidió con los estudios previos de MetMab en los modelos NCI-H596. El tratamiento de los ratones con tumores NCI-H596 con erlotinib dio como resultado una reducción estadísticamente insignificante en el crecimiento del tumor comparado con el control de vehículo el día 20 (Figura 5; prueba-t de Student, $p=0,165$). El tratamiento con la combinación de MetMab y erlotinib mostró una gran mejora en la eficacia comparado con cualquiera de los agentes solos, y dio como resultado un 89% de reducción en el crecimiento del tumor comparado con el control de vehículo el día 20 (Figura 5; pruebas-t de Student; MetMab + erlotinib contrapuesto con vehículo día 20 – $p=0,0035$; MetMab + erlotinib contrapuesto con erlotinib solo, día 26 – $p=0,0009$; MetMab + erlotinib contrapuesto con MetMab solo, día 48 $p=0,0149$).

Se recaudó información sobre el volumen de los tumores durante 9 semanas luego de que se finalizó con las dosis para analizar si la combinación de MetMab más erlotinib daba como resultado mejoras con el paso del tiempo en la progresión del tumor. Para tratar este tema, las mediciones de tiempo TTD (Time to Tumor Doubling), que se define como el tiempo que le lleva a los tumores doblar su tamaño, se calcularon para cada grupo y se utilizaron para generar

curvas de supervivencia Kaplan–Meier. La combinación de MetMAb más erlotinib demostró una gran mejora en el tiempo de progresión del tumor con un TTD medio de 49,5 ($\pm$ 2,6) días, contrapuesto con 17,8 ($\pm$ 2,2) días para el grupo que se trató con MetMAb, 9,5 ($\pm$ 1,2) días para el grupo que se trató con erlotinib, y 9,5 ($\pm$ 1,2) días para el grupo de control de vehículo (Figura 6). Esta información demuestra que la combinación de MetMAb más erlotinib mejora en forma significativa el tiempo de progresión del tumor en contraposición con cada agente por separado (prueba log–rank; vehículo en contraposición con MetMAb – $p < 0,0001$; vehículo en contraposición con MetMAb + erlotinib – $p < 0,0001$; erlotinib en contraposición con MetMAb + erlotinib $p < 0,0001$ y MetMAb en contraposición con MetMAb + erlotinib – $p = 0,0009$).

Esta información demuestra que el tratamiento con la combinación de MetMAb y erlotinib da como resultado mejoras altamente significativas en la inhibición del crecimiento del tumor y la progresión del tumor relativa al tratamiento con MetMAb o erlotinib por separado.

Ejemplo 5: La señalización de c–met regula la señalización de EGFR

Materiales y métodos

Análisis de Micromatriz: Se realizaron tres experimentos de micromatriz con matrices Affymetrix HGU133 Plus 2,0. En cada caso, se llevo a cabo la preparación de RNA complementario, la hibridación de matrices, y el análisis subsiguiente de la información con los protocolos del fabricante, esencialmente los descritos en Hoffman EP et al., Nat Rev Genet 5:229–37 (2004). Se normalizaron datos de expresión crudos, en la forma de archivos Affymetrix CEL, como un grupo para eliminar fuentes de variación no biológicas entre información para muestras individuales mediante el método de normalización de RMA (Irizarry, Biostatistics, 2003, PubMed ID 12925520) tal como fue implementado en el paquete de software Partek GS 6.3b (Partek, Saint Louis, MO). Los valores de expresión a escala log2 normalizados resultantes se analizaron de la siguiente manera y se transformaron a escala lineal a los fines de ploteo.

En el primer experimento, no se trataron o se estimularon las células

receptivas a ligando NSCLC HOP92 y H596 con 50 ng/ml de HGF durante 6 horas antes del perfil de expresión mRNA. Brevemente, se colocaron las células en placas de 6 pocillos a aproximadamente 5×10^5 células/pocillo. Luego de un día, se lavaron las células, y luego se transfirieron a RPMI medio + 0,1% BSA. El día 3, se estimularon las células durante 6 horas con HGF a 50ng/ml en el medio RPMI + 0,1% BSA. Las células se lavaron una vez con PBS frío, se lisaron con RNAeasy buffer lisis y con RNA preparado conforme al protocolo del fabricante. Se analizaron muestras de HOP92 y H596 en forma separada mediante una prueba-t para medir la importancia (valores P) de la diferencia en niveles de expresión para cada gen en las condiciones + HGF y - HGF. Estos valores P se convirtieron en valores Q mediante la corrección para múltiples pruebas con el método Benjamini y Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995). Luego se clasificaron los genes conforme a la importancia estadística (valor Q) de la diferencia de nivel de expresión en cada línea celular.

En el segundo experimento se estudiaron los niveles de expresión mRNA de clones EBCshMet3-15 y EBCshMet4-12 luego de 24 y 48 horas de incubación con o sin 50 ng/ml de doxiciclina. Se analizó el patrón de expresión de cada set de sonda Affymetrix (gen) con un modelo estadístico lineal (ANOVA) que estima el efecto del clon (3-15 o 4-12), el tratamiento (control o doxiciclina), y momento (24 o 48 horas) así como también la interacción del momento y los efectos del tratamiento. El procedimiento ANOVA produce medidas de importancia (valores P) para cada uno de estos cuatro efectos. Se convirtieron estos valores P en valores Q mediante la corrección para múltiples pruebas usando el método Benjamini y Hochberg. Luego se clasificaron los genes conforme a la importancia estadística (valores Q) de la diferencia de nivel de expresión entre doxiciclina y las muestras de control.

En el tercer experimento se incubaron células EBCMet shRNA 4-12 o células de control EBCGFP shRNA en un medio solo o en un medio con 50 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas. Luego de más tratamientos (+/- HGF 100 ng/ml durante 2 horas), se estudió la expresión mRNA por medio de micromatrices. Se

analizó el patrón de expresión de cada set de sondas Affymetrix (gen) mediante un modelo estadístico lineal (ANOVA) que estimó el efecto del objetivo shRNA (Met o GFP), la inducción shRNA (doxíciclinas o control) y el tratamiento HGF así como también la interacción de estas tres variables. Estos valores P se convirtieron luego en valores Q de la diferencia del nivel de expresión entre las condiciones más -HGF y menos-HGF en muestras EBCMetshRNA4-12 tratadas con doxíciclinas. Se seleccionaron 188 sets de sondas usando un tope del valor Q de 0,05 (5% Índice de Descubrimiento Falso) y un doble cambio de expresión de los grupos +/- HGF.

TGF α ELISA: Se generaron tumores xenotrasplantados EBC-1-shMet y se aplicaron dosis de Dox de la manera descripta en el Ejemplo 3, excepto que se usó Dox a 1 mg/ml en 5% sacarosa y se le permitió a los tumores crecer a 300-400 mm³ con anterioridad a la iniciación del tratamiento. Se aplicaron dosis a los animales durante 3 días y luego se los sacrificó. Se colocaron muestras de tumores xenotrasplantados EBC-1-shMet-4.12 rápidamente congelados en buffer de lisis frío de 2mls (PBS + 1% TritonX-100 + Cóctel de fosfatasa 2 (Sigma cat# P5726)) e inhibidores de proteasa "Complete Mini EDTA-Free" (Roche #11 836 170 001) (1 comprimido por cada 10mls de solución). Los tumores se homogeneizaron con un homogeneizador manual y los lisatos se incubaron en hielo durante 1 hora con giros ocasionales. Los lisatos se giraron hacia abajo a 10000xG durante 10 minutos a 4°C, se transfirieron a un nuevo tubo y se cuantificó la proteína Her 3 mediante un ensayo BCA (Pierce cat# 23225).

El anticuerpo policlonal Anti-TGF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN) se diluyó a 1 μ g/ml en solución salina sujeta a buffer por fosfatos (PBS) y se cubrió con placas ELISA (25 μ L/pocillo, placas de 384 pocillos con superficie MaxiSorp, Nunc, Neptune, NJ) durante una incubación de una noche a 4°C. Luego de lavarlo 6 veces con buffer (PBS / 0,05% Tween-20), las placas se bloquearon con PBS / 0,5% albumina sérica bovina (BSA) durante 1 o 2 horas. Esta y todas las subsiguientes incubaciones se realizaron a temperatura ambiente en un agitador orbital. Las muestras se diluyeron usando buffer de muestra (PBS / 0,5% BSA /

0,5% Tween-20/ 0,2% gama globulina bovina / 0,25% CHAPS / 5 mM EDTA / 10 ppm Proclin). Con el uso del mismo buffer, las disoluciones en serie se prepararon a partir de TGF-alfa humano recombinado (R&D Systems), con una escala de curva estándar de 400 – 12,5 pg/ml. Las muestras de control congeladas pre-disueltas para cuantificar en las regiones altas, medias y bajas de la curva estándar se descongelaron. Las placas se lavaron seis veces, se agregaron las muestras, los estándares y los controles (25 µL/pocillo) y se incubaron durante 2 horas. Luego de lavar las placas doce veces, se agregó un anticuerpo policlonal biotinizado de cabra anti-TGFalfa (R&D Systems) disuelto a 1 µg/ml en un buffer de muestra (25 µL/pocillo). Luego de una hora de incubación, las placas se lavaron doce veces. Luego se agregó perixodasa Streptavidin-horse Radish (GE Healthcare, Piscataway, NJ) disuelta 1/4,000 en el buffer de muestra (25 µL/pocillo). Luego de una incubación final de 30 minutos, las placas se lavaron doce veces y se agregó tetrametil bencidina (TMB, Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Se permitió el desarrollo de color durante 6 a 8 minutos a temperatura ambiente, y la reacción se detuvo por el agregado de 1 M de ácido fosfórico. Los valores de absorbancia se obtuvieron mediante el uso de un lector de microplacas (450 nm, referencia 620) y las concentraciones de las muestras se calcularon a partir de ajustes de 4 parámetros de las curvas estándar.

Resultados

La activación de c-met por medio de un tratamiento HGF aumentó la expresión mRNA de ligando EGFR (HB-EGF, Epiregulina, Anfiregulina, TGFα) en las líneas celulares de NSCLC Hop-92 y NCI-H596 (Figura 9A) de reactivas a ligandos. En cambio, la inhibición de la expresión c-met usando shRNA en células EBC1 de la línea celular NSCLC de ligandos independientes redujo la expresión mRNA de los ligandos EGFR (Figura 9B). El tratamiento HGF de la línea celular 4-12 EBC1shMet tratadas con dox restituyó la expresión de los ligandos EGFR (Figura 9C). La reducción de ligandos EGFR no ocurrió en células de control EBC-1 que expresó un siRNA dirigido contra GFP (Figura 9D). La reducción de la expresión c-met en tumores xenotrasplantados EBC-1shMet dio como resultado

en una disminución en los niveles de proteína TGF α en el tumor, al tercer día posterior al tratamiento. (Figura 9E).

Esta información demuestra que la actividad c-met puede regular la señalización EGFR en células independientes HGF c-met (EBC1) amplificadas, así como también en células dependientes HGF (Hop92 y NCI-H596). Más específicamente, la señalización c-met aumentó y mantuvo la expresión de la familia de ligandos EGFR, los cuales luego podían estimular su propia familia de receptores EGFR de manera autocrina. En cambio, la inhibición de la señalización c-met dio como resultado una reducción de la expresión de ligandos EGFR. La interferencia con este bucle autocrino es una causa probable de la reducción de pEGFR que se observa en las células EBC1 luego del knockdown de c-met (Figura 10) y del aumento de la sensibilidad a la activación de ligandos inducidos EGFR luego del knockdown de c-met descrito en el Ejemplo 2. Estos resultados sugieren que la actividad EGFR puede compensar la pérdida de actividad de señalización c-met en tumores HGF dependientes y HGF independientes y concuerdan con el gran aumento de la eficacia del tumor xenotrasplantado observado cuando los tumores se tratan con la combinación de inhibidores EGFR y c-met (Ejemplo 4).

Ejemplo 6: La actividad C-met regula la expresión HER3

Materiales y métodos

Análisis Western blot de proteínas pEGFR y Her3: Se colocaron las células a una densidad de 1×10^6 y se incubaron durante 18 horas a 37°C en 10% Tet-approved FBS en RPMI 1640. El día siguiente, se removió el medio y se reemplazó con medio fresco normal, con o sin 0,1 μ g/ml Dox. 24, 48 y 72 horas luego de cambiar el medio, se extrajeron las proteínas con 1% NP-40/TBS/ el coctel inhibidor de proteasa completo de Roche/cócteles 1 y 2 inhibidores de fosfatasa de Sigma luego de un enjuague con TBS frío. Se cargaron 15 μ g de proteína total en gel Invitrogen's 4–12% Bis-Tris NUPAGE con buffer MOPS y se transfirió a PVDF mediante Invitrogen's iBlot. Las membranas fueron inmunotransferidas para proteínas fosforiladas (pEGFR (Y1173) Upstate 04–341

en una disolución de 1:1000 en 5% BSA/TBST), se removieron con el stripping buffer de Pierce's Restore, y luego se las resondeó para proteínas totales (c-met: SCBT sc-10 en una disolución 1:10,000; Her3: SCBT sc-285 en una disolución 1:2000 en 5% de leche en polvo descremada y TBST). Se detectaron las proteínas con HRP Amersham –junto con anticuerpos secundarios (Amersham anti-conejo-HRP, #NA934V; Amersham anti-ratón-HRP) usando el kit Amersham's ECL Plus químicoluminiscente conforme a las instrucciones del fabricante.

Her3 FACS: Se sembraron células EBC-1 shMet 4-12 a 10^6 células por cada placa de 10 cm en RPMI 1640 (como antes) y se incubaron placas toda la noche. Se agregó dox a las placas hasta alcanzar una concentración final de 100ng/ml. Se incubaron placas durante 48 horas. Luego de la incubación las células se transfectaron, centrifugaron, luego se resuspendieron en 200µL PBS + 2%FBS (FACS Buffer) frío y se transfirieron a placas de 96 pocillos. Se giraron las células y se volvieron a suspender en buffer FACS más 10µg/ml de anticuerpos Her3:1638 (3E9.2G6) de Genentech. Se incubaron las células en hielo durante 1 hora, luego se lavaron con Buffer FACS fríos y se volvieron a suspender en Buffer FACS + 1:200 RPE conjugados F(ab')₂ Cabra anti-ratón IgG + IgM (H+L) (Jackson Immuno cat# 115-116-068). Se incubaron las células en hielo durante 30 minutos, luego se lavaron una vez con buffer FACS fríos y se volvieron a suspender en buffer FACS más 7AAD (BD Pharmingen cat#559925). El análisis de FACS se realizó conforme a las instrucciones del fabricante.

Lisatos de tumores: Se generaron los tumores xenotransportados EBC-1-shMet y se aplicaron dosis esencialmente de la manera descrita en el Ejemplo 3, excepto que se utilizó Dox a 1 mg/ml en sacarosa 5% y los tumores pudieron crecer entre 300-400 mm³ con anterioridad al inicio del tratamiento. Se aplicaron dosis a animales durante tres días, luego se los sacrificó. Se colocaron muestras de tumores xenotransplantados EBC-1-shMet-4.12 rápidamente congelados en buffers de lisis frío de 2mls (PBS + 1%TritonX-100 + (3X) Cóctel de fosfatasa 2 (Sigma cat# P5726)) e inhibidores de proteasa "Complete Mini EDTA-Free"

(Roche #11 836 170 001). Los tumores se homogeneizaron con un homogeneizador manual y los lisatos se incubaron en hielo durante 1 hora con giros ocasionales. Los lisatos se giraron hacia abajo a 10000xG durante 10 minutos a 4°C, se transfirieron a un nuevo tubo y se cuantificó la proteína Her 3 mediante el uso de un ensayo BCA (Pierce cat# 23225).

Resultados

El knockdown mediado de shRNA de la expresión c-met redujo los niveles pEGFR y aumentó significativamente los niveles de proteína HER 3 (Figura 10A). El análisis de FACS reveló un aumento de los niveles de superficie HER 3 luego del knockdown de c-met (Figura 10B). El knockdown de c-met en los tumores xenotransplantados EBC-1shMet-4,12 dio como resultado un aumento de los niveles de proteína HER3 (Figura 10C).

Esta información demuestra que la actividad c-met puede regular el nivel de expresión HER 3. Específicamente, la inhibición c-met dio como resultado un aumento de los niveles de la proteína HER3 y en una disminución de los niveles pEGFR. La disminución de pEGFR luego de la inhibición c-met es probable debido a la reducción de la señalización autocrina por los ligandos EGFR (ver Figura 9) y el aumento de los niveles HER3 podría aumentar la sensibilidad erlotinib, tal como otros han demostrado (por ejemplo, Yauch et al. Clin Cancer Res (2005) 11:8686-98). Estos resultados sugieren que la actividad HER3 (por ejemplo, señalización mediante HER2) puede aumentar subsiguiente inhibición de señalización c-met, y apoyar el uso de terapias de combinación con c-met e inhibidores HER3 para el tratamiento del cáncer.

Ejemplo 7: La activación de vía EGFR puede restaurar la proliferación de la célula y la viabilidad de la célula en la que la actividad c-met esta inhibida.

Materiales y métodos

Se sembraron células EBC-1 shMet a 5000/pocillos en RPMI 1640 medio (que contiene 10% Tet-Free FBS de Clontech cat# 631107) en una placa de 96 pocillos con pared negra, y se incubaron las placas durante la noche. Se reemplazó el medio con medio más fresco +/- 100ng/ml dox, y se incubaron las

placas durante 48 horas. Los ligandos EGFR se agregaron luego a la concentraciones finales descriptas a continuación, y se incubaron las placas otras 48 horas y luego se determinó la cantidad de células con Cell TiterGlo (Promega #G7570) tal como se describe en el mismo: Dox + 100ng/ml HGF; Dox + 50nM TGF α ; Dox + 5ng/ml HGF; y Dox + 1nM TGF α .

Resultados

El knockdown de la expresión c-met por shRNA dio como resultado una reducción significativa en el número de células, lo que implica una reducción en la viabilidad y proliferación de las células. Los ligandos EGFR, HGF y TGF α tuvieron la habilidad de rescatar un número de células de un modo dosis-dependiente, aunque el HGF apareció para rescatar un número de células de mejor manera que el TGF α . Estos resultados demostraron que la activación de vía EGFR puede restaurar la proliferación de células y la viabilidad de células en las células en las que la actividad de señalización c-met está inhibida. Por lo tanto, la señalización EGFR (y/u otros miembros de la familia HER) compensó la pérdida de actividad de señalización c-met. Estos resultados apoyan el uso de una terapia combinada con inhibidores c-met y EGFR, y concuerdan con la eficacia del gran aumento del tumor xenotransplantado observado cuando los tumores se trataron con la combinación de inhibidores EGFR y c-met (Ejemplo 4).

Ejemplo 8: La activación de c-met dio como resultado la activación de EGFR, c-met interactúa con EGFR independientemente de la activación de la vía c-met o EGFR, y la respuesta atenuada de la activación de c-met al inhibidor EGFR.

Materiales y métodos

Células: Las células NCI-H596 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y se mantuvieron en RPMI 1640 complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS; Sigma, St. Louis, MO), y 2 mM L-glutamina. El medio de ensayo de las células fue cambiado de la manera descripta a continuación, dependiendo del experimento.

Factores terapéuticos y de Crecimiento: Erltonib y MetMAb eran de Genentech, Inc., tal como se describió anteriormente. HGF y TGF α se generaron

en Genentech.

Immunoprecipitaciones e Immunotransferencia: Se privó de suero a las células durante una noche en 0,1% BSA/RPMI con anterioridad a la estimulación con ligando y/o aplicaciones de dosis con compuesto, tal como se describe en el texto. Los ligandos HGF y TGF- α se generaron internamente. Al momento del cultivo, las células se lavaron una vez de manera inmediata en PBS helado seguido por lisatos en buffer lysis (CST #9803) complementado con 1 mM de cada uno de los siguientes: inhibidores de proteasa (Sigma Cat #P3840), inhibidores de fosfatasa (Sigma Cat # P2850 y P3726), NaF, Na₃VO₄ y PMSF. Se colocaron las muestras a 4°C en un rotor de 180°, seguido por una limpieza a 14,000 rpm, 20 min 4°C. La concentración de proteína se estimó mediante el uso del Estudio Bradford.

Los lisatos de células fueron cargados en los geles de manera directa (Figura 12, concentración de lisatos equivalente a 40 μ g/calle) o de manera inmunoprecipitada (Figura 13, concentración de lisatos equivalente a of 1,6 mg/muestra). La inmunoprecipitación se realizó con cada uno de los siguientes anticuerpos; agarosa conjugada con cMET:(Santa Cruz Biotechnology Cat #SC-161AC), EGFR (Neomarkers MS-609-P) + Proteína A Sefarosa Fast Flow Beads. Las muestras se colocaron a 4°C toda la noche, en un rotor de 180°, seguido por tres lavados con buffer lisis y consiguiente desnaturalización en muestras buffer SDS que contienen beta-mecaptoetanol. Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 95°C seguidos por una carga de geles gradientes 4-12% y por una transferencia a membranas nitrocelulosas usando procedimientos western blotting estándar. Las membranas se bloquearon en 5% de leche/TBST durante 1 hora, RT y luego se examinaron con los siguientes fosfo- anticuerpos durante toda la noche a 4°C, tal como lo indica el texto: p-c-met: pTyr 4G10 (Upstate Cat# 05-777); pEGFR (Cell Signaling Technologies Cat # 2264). Las membranas se eliminaron con el Restore Stripping Buffer (Pierce Cat # 21059) y se volvieron a examinar con anticuerpos a proteína total: cMET DL-21 (Upstate Biotech Cat #05-238); EGFR (MBL Cat # MI-12-1); beta actina (Santa Cruz Biotechnologies

Cat #SC-1616). Anticuerpos secundarios se obtuvieron de Jackson Laboratories. Se detectaron inmunotrasferencias mediante el uso del Método ECL, conforme a las recomendaciones del fabricante.

Ensayos de viabilidad de la Célula: Para los ensayos de viabilidad de células, éstas se colocaron en cuadruplicado a 1×10^3 células por pocillo en placas de 384 pocillos en RPMI conteniendo 0,5% FBS (ensayo medio) durante toda la noche, con anterioridad a la estimulación con ensayo medio con 3 nM TGF- α +/- HGF. Se agregó erlotinib a concentraciones múltiples y, 72 horas después, se midió la viabilidad de la célula con Celltiter-Glo Luminescent Ensayo de Viabilidad de la Célula (Promega, Madison, WI).

Resultados

La activación de c-met con HGF da como resultado la activación de EGFR.

Dado que la activación de c-met dio como resultado la regulación por incremento de numerosos ligandos EGFR en células NCI-H596, suponemos que la activación de c-met resulta en la transactivación de vía EGFR. Para probar esta hipótesis, las células de NSCLC NCI-H596 se trataron con o sin HGF in vitro, y los lisados de células se analizaron a los 10 minutos, 24, 48 y 72 horas para examinar la activación de vía EGFR. La activación de la señalización c-met resultó en la activación de la señalización EGFR (Figura 12). La inducción del nivel de pEGFR se observó a los diez minutos, siguiendo la estimulación HGF, lo que sugiere que la activación c-met transactiva directamente la señalización EGFR (Figura 12). Se observaron niveles aumentados de pEGFR en los últimos puntos de tiempo (24, 48, y 72 horas siguientes a la estimulación con HGF) (Figura 12). La activación cinética demorada de pEGFR concuerda con la información que muestra que la actividad c-met resulta en una expresión aumentada de los ligandos EGFR, que podrían ser responsables de la activación de vía demorado EGFR (>24 horas). En este modelo, se predecirá que la activación de EGFR aumentará en un punto posterior en el tiempo y permanecerá relativamente alta, de acuerdo con la información aquí presentada.

C-met interactúa con EGFR independiente de c-met o el estado de

activación de vía EGFR.

Los experimentos de co-immunoprecipitación (co-IPs) se realizaron para determinar si la actividad c-met y/o EGFR pudiera resultar en una asociación física de c-met con EGFR. Las células NCI-H596 se trataron sin ligandos, con TGF α sólo, HGF sólo, o TGF- α más HGF durante 10 minutos o 24 horas. Siguiendo este tratamiento, se inmunoprecipitó el c-met seguido por transferencia tanto para la fosfo-tirosina (4G10), EGFR o c-met.

La inmunoprecipitación c-met bajó la EGFR ante la ausencia de algún ligando y en puntos de tiempo posteriores cuando los niveles pc-met y pEGFR habían disminuido, indicando que c-met interactuó con EGFR a pesar del estado de activación de vía c-met o EGFR (Figura 13). El c-met IPs trasferido por fosfo-tirosina reveló que la activación EGFR y c-met era ligando-dependiente y atenuada luego de 24 horas. La activación de c-met por medio de HGF resultó en la co-immunoprecipitación de pEGFR; sin embargo, los niveles pEGFR eran mucho más bajos que los niveles pEGFR observados cuando se estimularon las células sólo con TGF α o en combinación con HGF. La activación de c-met o EGFR por sus respectivos ligandos demostró que cada vía podría ser activada independientemente una de la otra.

La activación de c-met atenuó la respuesta de células NCI-H596 a inhibidores EGFR y el tratamiento con anticuerpos anti.c-met MetMAb rescató la respuesta al inhibidor EGFR.

Las células NCI-H596 son sensibles al inhibidor EGFR erlotinib (TARCEVA™) cuando crecieron en presencia de TGF α , tal como se demuestra mediante la viabilidad reducida de células cuando crecieron en presencia de erlotinib y TGF α . Para determinar si la activación de vía c-met pudiera cambiar la respuesta de las células NCI-N596 a la erlotinib, se estimularon las células con TGF α , se trataron con erlotinib y/o HGF, y luego se estudió la viabilidad de la célula.

Bajos niveles de HGF mostraron efectos modestos en la sensibilidad de la célula a la erlotinib; sin embargo la sensibilidad a la erlotinib se redujo

dramáticamente en un modo dosis-dependiente a medida que aumentaron las concentraciones de HGF (Figura 14), tal como lo revela el aumento de viabilidad de la célula en estas condiciones. Esta información indica que la activación HGF de vía Met es suficiente para atenuar la respuesta de células NCI-H596 a erlotinib.

Para determinar si la combinación de inhibidores c-met e inhibidores EGFR redujeron la viabilidad de las células de líneas celulares que están co-activadas con HGF y TGF α , se realizaron ensayos de viabilidad de células NCI-H596 en presencia de HGF, TGF α , y variando las dosis de erlotinib y/o anticuerpo antagonista c-met MetMAb (1 μ M).

La presencia de HGF atenuó la respuesta de células NCI-H596 a la erlotinib (Figura 15). La inhibición de vía c-met por MetMAb restauró dramáticamente la sensibilidad a la erlotinib (Figura 15), sugiriendo de este modo que el tratamiento con inhibidores c-met y EGFR pueden tener efectos de combinación impactando la viabilidad de la célula en el línea celular NCI-H596.

Considerados juntos, estos estudios apoyan la hipótesis de que la activación de vía c-met activó directamente la vía EGFR, a través de la inducción de expresión de ligandos de EGFR así como también a través de la interacción directa entre c-met y EGFR. Estos resultados concuerdan con la eficacia aumentada del tumor xenotransplantado observado cuando los tumores se trataron con la combinación de EGFR e inhibidores c-met (Ejemplo 4).

Ejemplo 9: El tratamiento de combinación con c-met antagonista y EGFR antagonista dio como resultado una mejor inhibición de la proliferación y vía de señalización de supervivencia en tumores xenotrasplantados NCI-H596.

Materiales y métodos

Tumores xenotransplantados NCI-H596 hu-HGF-Tg-SCID: Se establecieron xenotransplantes NCI-H596 en ratones hu-HGF-Tg-SCID tal como se describe en el Ejemplo 4. Se le permitió a los tumores crecer hasta 200–300 mm³ con anterioridad al tratamiento. La aplicación de la dosis se realizó conforme a lo descrito en la Tabla 8. Brevemente, se aplicó la dosis buffer MetMAb (30 mg/kg) o MetMAb a las cero horas (0 hs) y se aplicó la dosis de vehículo

metilcelulosa tween (MCT) o erlotinib (150 mg/kg) a las 18 horas (18 hs). Se sacrificó a los ratones y se recolectaron tumores y plasma a las 24 horas (24 hs). Se congelaron los tumores en contacto con el nitrógeno y se dejaron a -70°C hasta que se procesaron para inmunoprecipitación e inmunotransferencia.

Tabla 9
Diseño del Estudio

Grupo	No./Sexo	Material de Prueba	Ruta	Frecuencia de la dosis	Dosis. (mg/kg)	Dosis Conc. (mg/ml)	Dosis Volumen (µl)
1	5/F	Vehiculos: MCT; MetMAb buffer	PO; IP	Una vez (MCT 6 horas antes de la ablación del tumor, buffer MetMAb 24 horas antes	0	0	100 (ea.)
2	5/F	MetMAb	PO; IP	Una vez (MCT 6 horas antes de la ablación del tumor, MetMAb 24 horas antes	30	6	100 (ea.)
3	5/F	Erlotinib	PO; IP	Una vez (erlotinib 6 horas antes de la ablación del tumor, buffer MetMAb 24 horas antes	150	37,5	100 (ea.)
4	5/F	Erlotinib + MetMAb	PO; IP	Una vez (erlotinib 6 horas antes de la ablación del tumor, MetMAb 24 horas antes	150; 30	37,5; 6	100 (ea.)

Inmunoprecipitaciones e Inmunotransferencia: Para procesar tumores para análisis de proteínas, primero se homogeneizaron los tumores con homogeneizador de cristal dounce con buffer lisis (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA), complementado con 1 mM PMSF, coctel inhibidor de proteasa adicional, y coctel I y II inhibidores de fosfatasa (Sigma, Inc., St. Louis, MO). Los lisatos se incubaron en hielo durante una hora y luego se centrifugaron a 14,000 x g durante cinco minutos y se recolecto el sobrenadante. Se determinaron

concentraciones de proteínas usando el Kit. de Estudio de Proteína BCA™ (Pierce, Inc., Rockford, IL) y se inmunotransfirieron las muestras. Para inmunoprecipitaciones, se usó 1,5 mg de lisatos del tumor para arrastrar Met, usando el anticuerpo policlonal c-Met anti-humano C-28 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) junto con perlas de agarosa, o EGFR, usando el anticuerpo MI-12-1 (MBL, Inc., Woburn, MA) a 4°C durante toda la noche con rotación. Se lavaron las perlas tres veces con buffer lisis a 4°C seguido de una resuspensión en 1X Novex Tris-Glycine SDS Running Buffer (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) que contiene 2,5% (w/v) beta-mercaptoetanol. Para transferencias Western directas, se cargaron 50 µg de lisatos de tumor por cada calle. Luego se analizaron las muestras con SDS-PAGE e inmunotransferencias. Los anticuerpos usados incluyen el c-met DL-21 anti-humano de ratón, anti-fosfotirosina mAB 4G10 de ratón (ambos de Upstate Biotechnology/Millipore, Inc., Charlottesville, VA), anti-Akt, anti-p44/42 MAP kinase (ERK-1/2), anti-fosfo-Akt (Ser473), anti-fosfo-p44/42 MAP kinase (ERK-1/2) (Thr202/Tyr204), todos usados conforme a las recomendaciones del fabricante. (Todos de Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA)). Se usó Cabra-anti-ratón-IRdye800 (Rockland Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, PA) y cabra-anti-conejo-AlexaFluor680 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) como anticuerpos secundarios. Se reflejaron inmunotransferencias y se cuantificaron y normalizaron los niveles de fosfo-proteínas a niveles totales de proteínas (por ejemplo pEGFR sobre el total de EGFR) mediante el uso de un reproductor de imágenes Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

Resultados

Se examinó la activación de vía C-met y EGFR en tumores xenotransplantados generados en el modelo de ratón xenotransplantado NCI-H596 hu-HGF-Tg-SCID y tratado con el inhibidor EGFR, el inhibidor c-met y la combinación de inhibidores EGFR y c-met. Se inoculó a veinte ratones hu-HGF-Tg-SCID con células y tumores establecidos NCI-H596, tal como se describió anteriormente. Una vez que los tumores alcanzaron el tamaño de 200–300 mm³,

se los agrupó de manera pareja en cuatro grupos basados en el volumen del tumor y se comenzó a aplicar la dosis (Tabla 8). Se aplicó la dosis de MetMAb24 horas antes de la ablución del tumor, mientras que el erlotinib se aplicó 6 horas antes de la ablución. Los tiempos de dosificación se seleccionaron basados en el promedio de vida de cada agente terapéutico. A las 24 horas. Se sacrificó a los ratones, se recolectaron los tumores y se procesaron para inmunoprecipitaciones (IPs) y/o inmunotransferencias contra fosforilados y el total de Met, EGFR, Akt and ERK-1/2.

El tratamiento solo con MetMAb dio como resultado en la inhibición de c-met fosforilación a 12% (+/- 3.6%) de control de vehículo (Figura 16), y el tratamiento combinado con MetMAb y erlotinib dio como resultado en la inhibición de c-met fosforilación al 6% (+/- 3.5%) de control de vehículo (Figura 16) ($p = 0.039$). El tratamiento sólo con erlotinib (Figura 16) no redujo el c-met fosforilación. El tratamiento sólo con erlotinib inhibió la fosforilación de EGFR a 16% (+/- 7.9%) de control de vehículo y el tratamiento combinado con erlotinib y MetMAb inhibió la fosforilación de EGFR a 19% (+/- 15%) de control de vehículo (Figura 16). El tratamiento con MetMAb solo también inhibió modestamente el pEGFR a 62% (+/- 21.6%) de control de vehículo ($p = 0.006$).

Estos resultados demostraron que la MetMAb y la erlotinib, cada una, inhibe de manera eficiente la activación de sus objetivos respectivos y que el bloqueo de c-met puede inhibir la respuesta pEGFR en el modelo NCI-H596 hu-HGF-Tg-SCID.

El tratamiento combinado con MetMAb y erlotinib dio como resultado también una inhibición más efectiva de PI-3K/Akt y las vías Ras-RAF-MEK-ERK1/2 que se activan corriente abajo de la Met y EGFR activadas, donde actúan las vías para activar la supervivencia y proliferación de la célula del tumor, respectivamente, y ayudar a conducir la oncogénesis. Se examinaron Fosfo-Akt y phospho-ERK-1/2 en tumores xenotransplantados de animales tratados con MetMAb, erlotinib o MetMAb más erlotinib.

El tratamiento con MetMAb solo dio como resultado la inhibición de pAkt a

72% (+/- 27.9%) de control de vehículo y en la inhibición de pERK-1/2 a 72% (+/- 40.3%) de control de vehículo (Figura 15, Tabla 9). El tratamiento con Erlotinib dio como resultado una inhibición más robusta de pAkt a 45% (+/- 25.7%) y ERK-1/2 en un 39% (+/- 8.9%) de controles de vehículos, respectivamente (Figura 16, Tabla 9). El tratamiento con una combinación de MetMAB y erlotinib mostró una inhibición mejorada de pAkt y pERK-1/2 a 24% (+/- 13.8%) o de control de vehículo y 29% (+/- 2.9%) de control de vehículo, respectivamente (Figura 15, Tabla 9). Estos resultados demostraron que el tratamiento combinado con MetMAB y erlotinib inhibió el recorrido de señalización río abajo de manera más efectiva que el tratamiento con MetMAB o erlotinib solos.

Tabla 9. Resumen de los niveles cuantificados de fosfo-proteínas*, como porcentaje de control de vehículo, siguiendo el tratamiento del tumor NCI-H596 llevando ratones con MetMAB, erlotinib o la combinación de MetMAB y erlotinib. Los niveles de fosfo-proteína se determinaron mediante la cuantificación de bandas de intensidad de señal por Li-Cor normalizándolo luego a niveles de proteína total (menos fondo). La información está representada como un porcentaje del control de vehículo (los valores representan un promedio de tumores de 5 animales tratados de diferente manera, tal como se muestra en la Figura 16).

Proteína \ Tratamiento	Vehículo	MetMAB	Erlotinib	MetMAB + Erlotinib
pMet/ Met total	100 (±50,8)	12 (±3,5)	157 (±103,4)	6 (±3,5)
pEGFR/ EGFR total	100 (±26,6)	62 (±21,6)	16 (±7,9)	19 (±15)
pAkt/ Akt total	100 (±13,8)	72 (±27,9)	45 (±25,7)	24 (±13,9)
pERK1/2/ ERK1/2 total	100 (±25,3)	72 (±40,3)	39 (±8,9)	29 (±2,4)

La figura 17 resume diagramáticamente algunos de los descubrimientos revelados en la presente, de la siguiente manera:

- (1) c-met y EGFR estaban co-expresados en líneas celulares y tumores

NSCLC;

(2) expresión regulada positivamente de la actividad c-met de ligandos EGFR y pEGFR;

(3) expresión negativamente controlada de actividad c-met de of HER3;

(4) El tratamiento TGF α rescató las células c-met activadas de ligandos independientes de pérdida de viabilidad mediada por el inhibidor c-met; y

(5) La activación c-met redujo la respuesta a erlotinib in vitro e in vivo.

Lista Parcial de Referencias

Bhargava, M, Joseph, A, Knesel, J, Halaban, R, Li, Y, Pang, S, Goldberg, I, Setter, E, Donovan, MA, Zarnegar, R, Michalopoulos, GA, Nakamura, T, Faletto, D. and Rosen, E. (1992). Scatter factor and hepatocyte growth factor: activities, properties, and mechanism. *Cell Growth Differ.*, **3**(1); 11–20.

Kong–Beltran, M., Seshagiri, S., Zha, J., Zhu, W., Bhawe, K., Mendoza, N., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Fu, L., Severin, C., Rangell, L., Schwall, R., Amler, L., Wickramasinghe, D., Yauch, R. (2006). Somatic Mutations Lead to an Oncogenic Deletion of Met in Lung Cancer. *Cancer Res*, **66** (1); 283–289.

Peschard, P., Fournier, T.M., Lamorte, L, Naujokas, M.A., Band, H., Langton, W.Y., Park, M. (2001). Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell.*, **8**(5); 995–1004.

Ridgeway, J.B.B., Presta, L.G., Carter, P. (1996). ‘Knobs–into–holes’engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Engin.* **9** (7): 617–621.

Rong, S., Bodescot, M., Blair, D., Dunn, J., Nakamura, T., Mizuno, K., Park, M., Chan, A., Aaronson, S., Vande Woude, G.F. (1992). Tumorigenicity of the met proto–oncogene and the gene for the hepatocyte growth factor. *Mol Cell Biol.*, **12**(11); 5152–5158.

Zhang, Y–W., Su, Y., Lanning, N., Gustafson, M., Shinomiya, N., Zhao, P., Cao, B., Tsarfaty, G., Wang, L–M, Hay, R., Vande Woude, G.F. (2005). Enhanced

growth of human met-expressing xenografts in a new strain of immunocompromised mice transgenic for human hepatocyte growth factor/scatter factor. *Oncogene*, **24**; 101–106.

A pesar de que la invención que antecede ha sido descrita en detalle mediante ilustraciones y ejemplos con el fin de aclarar la comprensión, las descripciones y ejemplos no deben ser considerados como limitadores del alcance de la invención.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.

<120> TERAPIA DE COMBINACIÓN CON ANTAGONISTAS DE C-MET Y EGFR

<130> P4168R1

<140>

<141>

<150> 61/044,438

<151> 2008-04-11

<150> 61/034,446

<151> 2008-03-06

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 1

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 2

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 3

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido sintético

<400> 3

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	

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

20 25 30

<210> 4

<211> 11

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

```
<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
```

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

<400> 5
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

```
<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
```

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

<400> 6
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

```
<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
```

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

<400> 7
Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr
1 5

```
<210> 8
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
```

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido sintético

<400> 8
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 9
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

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

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

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

<400> 10
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 11
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido sintético

<400> 11
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 12

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 13

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

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 14

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

Lys Asp

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 15

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

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido sintético

<400> 16

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

Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		

Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
100 105

<210> 17
<211> 222
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido sintético

<400> 17
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18
<211> 222
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido sintético

<400> 18
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

hs

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

<210> 19
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido sintético

<400> 19
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Asn Val Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ala Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido sintético

<400> 20
Asp Ile Met Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

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

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

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

Lys

$\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
<400> 25	
Asn Val Arg Cys Leu Gln His Phe	
1 5	
<210> 26	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador sintético	
<400> 26	
acccaatga gaccaatgaa atc	23
<210> 27	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador sintético	
<400> 27	
atctttgatg agcttccgga tct	23
<210> 28	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sonda sintética	
<400> 28	
aatgccaact cccgtcag	18
<210> 29	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador sintético	
<400> 29	
cattaaagga gacctcacca tagcta	28
<210> 30	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador sintético	
<400> 30	
cctgatcgag aaaccacaac ct	22
<210> 31	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	

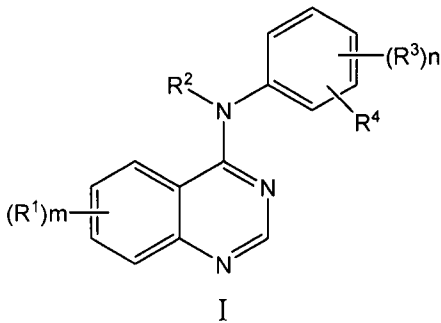
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sonda sintética	
<400> 31 catgaagcga ccctctgatg tccca	25
<210> 32 <211> 65 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleotido sintético	
<400> 32 gatccccgaa cagaatcact gacatattca agagatatgt cagtgattct gttctttttt	60
ggaaa	65
<210> 33 <211> 65 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleotido sintético	
<400> 33 gatccccgaa actgtatgct ggatgattca agagatcatc cagcatacag tttctttttt	60
ggaaa	65
<210> 34 <211> 67 <212> DNA <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleotido sintético	
<400> 34 gatccccaga tccgccacaa catcgattca agagatcgat gttgtggcgg atcttgtttt	60
ttggaaa	67

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descripto y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

1. Un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de c-met y un antagonista de EGFR.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el antagonista de EGFR tiene una fórmula general I:



de acuerdo con US 5.757.498, se incorpora a la presente a modo de referencia, en donde:

m es 1, 2, o 3;

cada R¹ es independientemente seleccionado de un grupo que consiste de hidrógeno, halo, hidroxilo, hidroxiamino, carboxi, nitro, guanidino, ureido, ciano, trifluorometil, y -(alquileo C₁-C₄)-W-(fenilo) en donde W es un enlace simple, O, S o NH;

o cada R¹ es independientemente seleccionado de R⁹ y alquilo C₁-C₄ sustituido con ciano, en donde R⁹ se selecciona de un grupo que consiste de R⁵, -OR⁶, -NR⁶R⁶, -C(O)R⁷, -NHOR⁵, -OC(O)R⁶, ciano, A y -YR⁵; R⁵ es alquilo C₁-C₄; R⁶ es independientemente hidrógeno o R⁵; R⁷ es R⁵, -OR⁶ o -NR⁶R⁶; A se selecciona de piperidino, morfolino, pirrolidino, 4-R⁶-piperazin-1-ilo, imidazol-1-ilo, 4-piridon-1-ilo, -(alquileo C₁-C₄)(CO₂H), fenoxi, fenilo, fenilsulfanilo,

alqueno C_2-C_4 , y $-(alqueno\ C_1-C_4)C(O)NR^6R^6$; y Y es S, SO, o SO_2 ; en donde las porciones de alquilo en R^5 , $-OR^6$ y $-NR^6R^6$ están opcionalmente sustituidas con uno a tres sustituyentes halo y las porciones de alquilo en R^5 , $-OR^6$ y $-NR^6R^6$ están opcionalmente sustituidas con 1 o 2 grupos R^9 , y en donde las porciones de alquilo de dichos sustituyentes opcionales están opcionalmente sustituidas con halo o R^9 , con la condición de que dos heteroátomos no estén unidos al mismo átomo de carbono;

o cada R^1 es independientemente seleccionado de $-NHSO_2R^5$, ftalimido-alquilsulfonilamino- (C_1-C_4) , benzamido, bencensulfonilamino, 3-fenilureido, 2-oxopirrolidin-1-ilo, 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, y R^{10} -alcanoilamino- (C_2-C_4) en donde R^{10} se selecciona de halo, $-OR^6$, alcanoiloxi C_2-C_4 , $-C(O)R^7$, y $-NR^6R^6$; y en donde dicho $-NHSO_2R^5$, ftalimido-alquilsulfonilamino- (C_1-C_4) , benzamido, bencensulfonilamino, 3-fenilureido, 2-oxopirrolidin-1-ilo, 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, y grupos R^1R^{10} -alcanoilamino- (C_2-C_4) están opcionalmente sustituidos con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados de halo, alquilo C_1-C_4 , ciano, metansulfonilo y alcoxi C_1-C_4 ;

o dos grupos R^1 se toman junto con los carbonos a los que están unidos para formar un anillo de 5 a 8 miembros que incluye 1 o 2 heteroátomos seleccionados de O, S y N;

R^2 es hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halo, alcoxi C_1-C_4 , $-NR^6R^6$, y $-SO_2R^5$;

n es 1 o 2 y cada R^3 es independientemente seleccionado de hidrógeno, halo, hidroxilo, alquilo C_1-C_6 , $-NR^6R^6$, y alcoxi C_1-C_4 , en donde las porciones de alquilo de dichos grupos R^3 están opcionalmente sustituidas con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados de halo, alcoxi C_1-C_4 , $-NR^6R^6$, y $-SO_2R$; y

R^4 es azido o $-(etinilo)-R^{11}$ en donde R^{11} es hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con hidroxilo, $-OR^6$, o $-NR^6R^6$.

3. El método de la reivindicación 2, en donde el antagonista de EGFR es un compuesto de acuerdo con la fórmula I seleccionado de un grupo que consiste de:

(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-[3-(3'-hidroxipropin-1-il)fenil]-amina; [3-(2'-(aminometil)-etinil)fenil]-(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-amina; (3-etinilfenil)-(6-nitroquinazolin-4-il)-amina; (6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-(4-etinilfenil)-amina; (6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-(3-etinil-2-metilfenil)-amina; (6-aminoquinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (3-etinilfenil)-(6-metansulfonilaminoquinazolin-4-il)-amina; (3-etinilfenil)-(6,7-metilenodioxiquinazolin-4-il)-amina; (6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-(3-etinil-6-metilfenil)-amina; (3-etinilfenil)-(7-nitroquinazolin-4-il)-amina; (3-etinilfenil)-[6-(4'-toluensulfonilamino)quinazolin-4-il]-amina; (3-etinilfenil)-{6-[2'-ftalimido-et-1'-il-sulfonilamino]quinazolin-4-il}-amina; (3-etinilfenil)-(6-guanidinoquinazolin-4-il)-amina; (7-aminoquinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (3-etinilfenil)-(7-metoxiquinazolin-4-il)-amina; (6-carbometoxiquinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (7-carbometoxiquinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; [6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-il]-(3-etinilfenil)-amina; (3-azidofenil)-(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-amina; (3-azido-5-clorofenil)-(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-amina; (4-azidofenil)-(6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)-amina; (3-etinilfenil)-(6-metansulfonil-quinazolin-4-il)-amina; (6-etansulfanil-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-dimetoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinil-4-fluoro-fenil)-amina; (6,7-dimetoxi-quinazolin-4-il)-[3-(propin-1'-il)-fenil]-amina; [6,7-bis-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(5-etinil-2-metil-fenil)-amina; [6,7-bis-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-4-fluoro-fenil)-amina; [6,7-bis-(2-cloro-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; [6-(2-cloro-etoxi)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; [6,7-bis-(2-acetoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; 2-[4-(3-etinil-fenilamino)-7-(2-hidroxi-etoxi)-quinazolin-6-iloxi]-etanol; [6-(2-acetoxi-etoxi)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; [7-(2-cloro-etoxi)-6-(2-metoxi-etoxi)-

quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; [7-(2-acetoxi-etoxi)-6-(2-metoxi-etoxi)-
 quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)-amina; 2-[4-(3-etinil-fenilamino)-6-(2-hidroxi-
 etoxi)-quinazolin-7-iloxi]-etanol; 2-[4-(3-etinil-fenilamino)-7-(2-metoxi-etoxi)-
 quinazolin-6-iloxi]-etanol; 2-[4-(3-etinil-fenilamino)-6-(2-metoxi-etoxi)-
 quinazolin-7-iloxi]-etanol; [6-(2-acetoxi-etoxi)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-
 4-il]-(3- etinil-fenil)-amina; (3-etinil-fenil)-[6-(2-metoxi-etoxi)-7-[2-(4-metil-
 piperazin-1-il)-etoxi]-quinazolin-4-il]-amina; (3-etinil-fenil)-[7-(2-metoxi-
 etoxi)-6-(2-morfolin-4-il)- etoxi]-quinazolin-4-il]-amina; (6,7-dietoxiquinazolin-
 1-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-dibutoxiquinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina;
 (6,7-diisopropoxiquinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; (6,7-dietoxiquinazolin-1-
 il)-(3-etinil-2-metil-fenil)-amina; [6,7-bis-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-1-il]-(3-
 etinil-2-metil- fenil)-amina; (3-etinilfenil)-[6-(2-hidroxi-etoxi)-7-(2-metoxi-
 etoxi)-quinazolin-1-il]-amina; [6,7-bis-(2-hidroxi-etoxi)-quinazolin-1-il]-(3-
 etinilfenil)-amina; 2-[4-(3-etinil-fenilamino)-6-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-7-
 iloxi]-etanol; (6,7-dipropoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinil-fenil)-amina; (6,7-dietoxi-
 quinazolin-4-il)-(3-etinil-5-fluoro-fenil)-amina; (6,7-dietoxi-quinazolin-4-il)-(3-
 etinil-4-fluoro-fenil)-amina; (6,7-dietoxi-quinazolin-4-il)-(5-etinil-2-metil-fenil)-
 amina; (6,7-dietoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinil-4-metil-fenil)-amina; (6-
 aminometil-7-metoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinil-fenil)-amina; (6-aminometil-7-
 metoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina;
 (6-aminocarbonilmetil-7-metoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina;
 (6-aminocarboniletil-7-metoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina;
 (6-aminocarbonilmetil-7-etoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina;
 (6-aminocarboniletil-7-etoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina;
 (6-aminocarbonilmetil-7-isopropoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina;
 (6-aminocarbonilmetil-7-propoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina;
 (6-aminocarbonilmetil-7-metoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina;
 (6-aminocarboniletil-7-isopropoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina; y
 (6-aminocarboniletil-7-propoxi-quinazolin-4-il)-(3-etinilfenil)-amina;

(6,7-dietoxiquinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; (3-etinilfenil)-[6-(2-hidroxi-etoxi)-7-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-1-il]-amina; [6,7-bis-(2-hidroxi-etoxi)-quinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; [6,7-bis-(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)- amina; (6,7-dimetoxiquinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina; (3-etinilfenil)-(6-metansulfonilamino-quinazolin-1-il)-amina; y (6-amino-quinazolin-1-il)-(3-etinilfenil)-amina.

4. El método de la reivindicación 2, en donde el antagonista de EGFR de la fórmula I es N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina.

5. El método de la reivindicación 4, en donde el antagonista de EGFR N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina están en la forma de una sal HCl.

6. El método de la reivindicación 4, en donde el antagonista de EGFR N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-4-quinazolinamina está en una forma polimorfa cristalina substancialmente homogénea que muestra un patrón de difracción de rayos-X de polvo que tienen picos característicos en expresados en grados 2-theta a aproximadamente 6,26, 12,48, 13,39, 16,96, 20,20, 21,10, 22,98, 24,46, 25,14 y 26,91.

7. El método de la reivindicación 1, en donde el antagonista de c-met es un anticuerpo.

8. El método de la reivindicación 7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monovalente.

9. El método de la reivindicación 7, en donde el anticuerpo es monovalente y comprende una región Fc, en donde la región Fc comprende un primer y un segundo polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende la secuencia de

Fc que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 17) y el segundo polipéptido comprende la secuencia que se muestra en la Figura 8 (SEC ID N°: 18).

10. El método de la reivindicación 7, en donde el anticuerpo comprende (a) un primer polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia:

QVQLQQSGPELVRPGASVKMSCRASGYTFTSYWLHWVKQRPGQGLEWIGMIDPS
NSDTRFNPNFKDKATLNVDRSSNTAYMLLSSLTSADSAVYYCATYGSYVSPLDYW
GQGTSVTVSS (SEC ID N°:19), la secuencia CH1 que se muestra en la Figura 7
(SEC ID N°: 16), y la secuencia de Fc que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°:
17); y (b) un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de cadena
pesada que tiene la secuencia:

DIMMSQSPSSLTVSVGEKVTVSCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW
ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTITSVKADDLAVYYCQQYYAYPWTFGGGKLEI
K (SEQ ID NO:20), y secuencia CL1 que se muestra en la Figura 7 (SEC ID N°: 8);
y (c) un tercer polipéptido que comprende la secuencia de Fc que se muestra en la
Figura 8 (SEC ID N°: 18).

11. El método de la reivindicación 1, en donde el cáncer se selecciona de un grupo que consiste de cáncer de mama, cáncer colorectal, cáncer rectal, cáncer de pulmón de célula no pequeña, linfoma de no-Hodgkins, cáncer de célula renal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, sarcoma de tejido blando, sarcoma de kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, melanoma, cáncer de ovario, mesotelioma, y mieloma múltiple

12. El método de la reivindicación 11, en donde el cáncer es cáncer de pulmón de célula no pequeña.

13. El método de la reivindicación 1, en donde el cáncer no es cáncer

resistente a antagonista de EGFR.

14. El método de la reivindicación 1, que además comprende la administración a un sujeto de un agente quimioterapéutico.

15. El método de la reivindicación 1, en donde el antagonista de EGFR es 4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolina.

16. El método de la reivindicación 1, en donde el antagonista de EGFR es N-[3-cloro-4-[(3-fluorofenil)metoxi]fenil]-6-[5-[[[2-(metilsulfonil)etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina.

17. El método de la reivindicación 1, en donde el antagonista de EGFR es 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina.

RESUMEN

La presente invención se refiere, en general, a los campos de la biología molecular y la regulación del factor de crecimiento. Más específicamente, la invención se refiere a una combinación de estas terapias para el tratamiento de afecciones patológicas, como el cáncer.

P4168R1

1 / 19

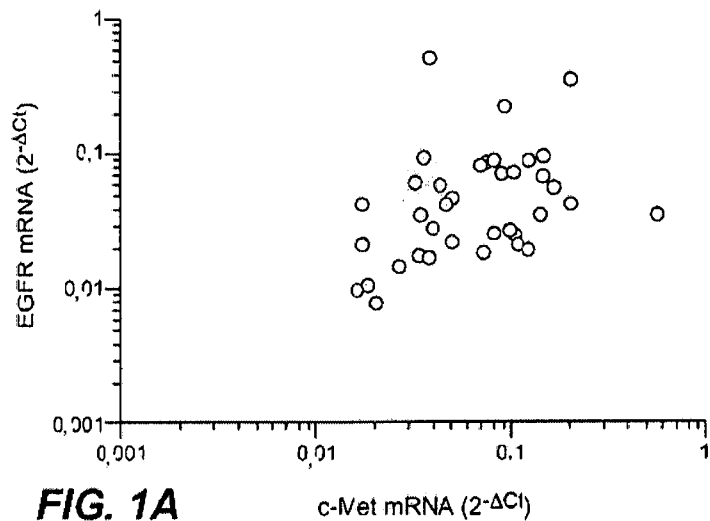


FIG. 1A

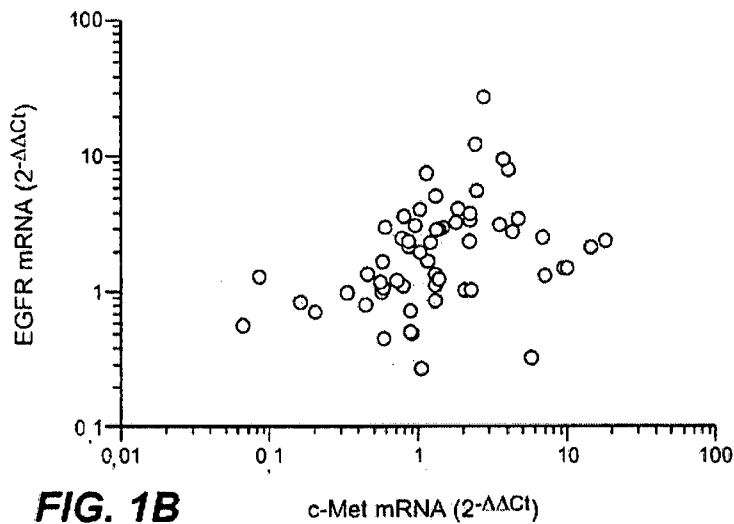


FIG. 1B

P4168R1

2 / 19

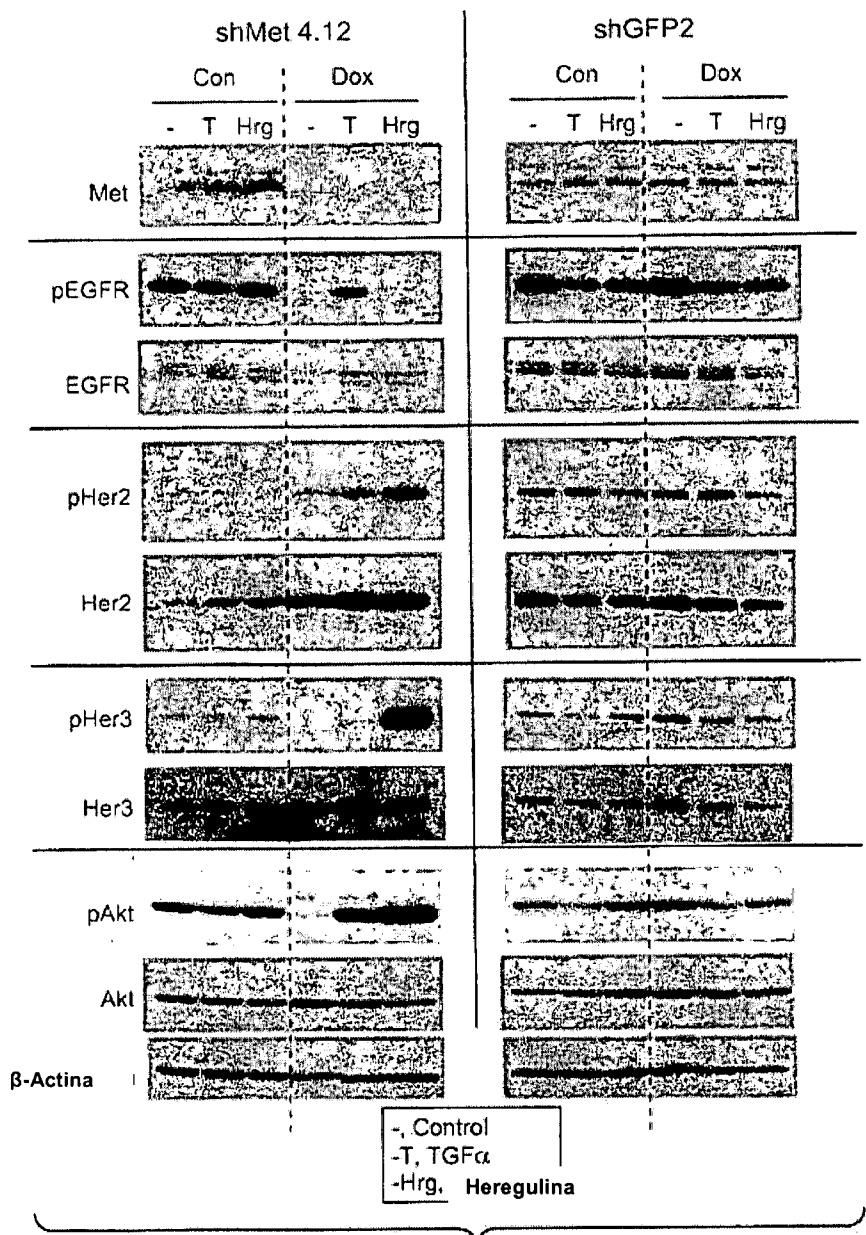


FIG. 2

P4168R1

3 / 19

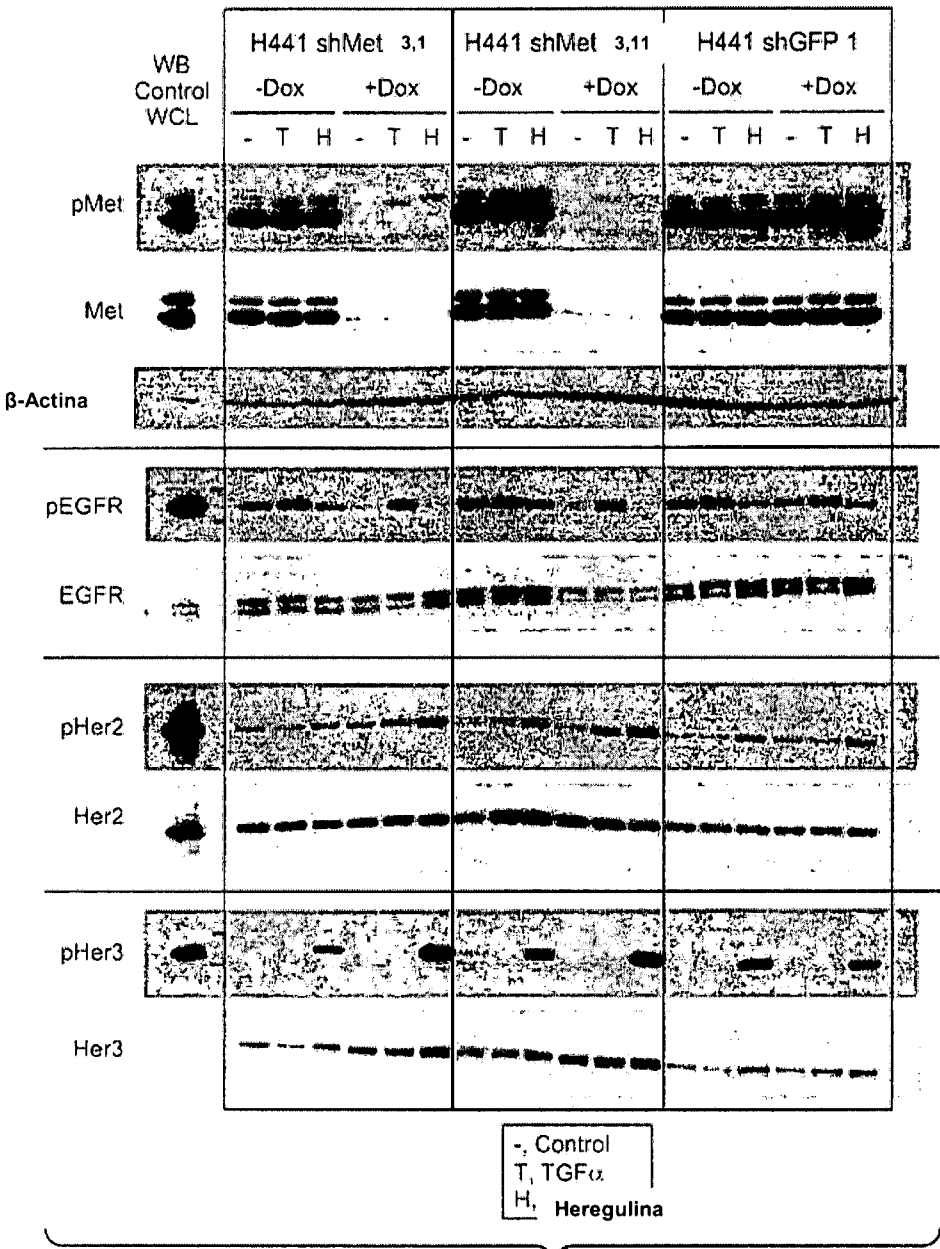


FIG. 3

P4168R1

6 / 19

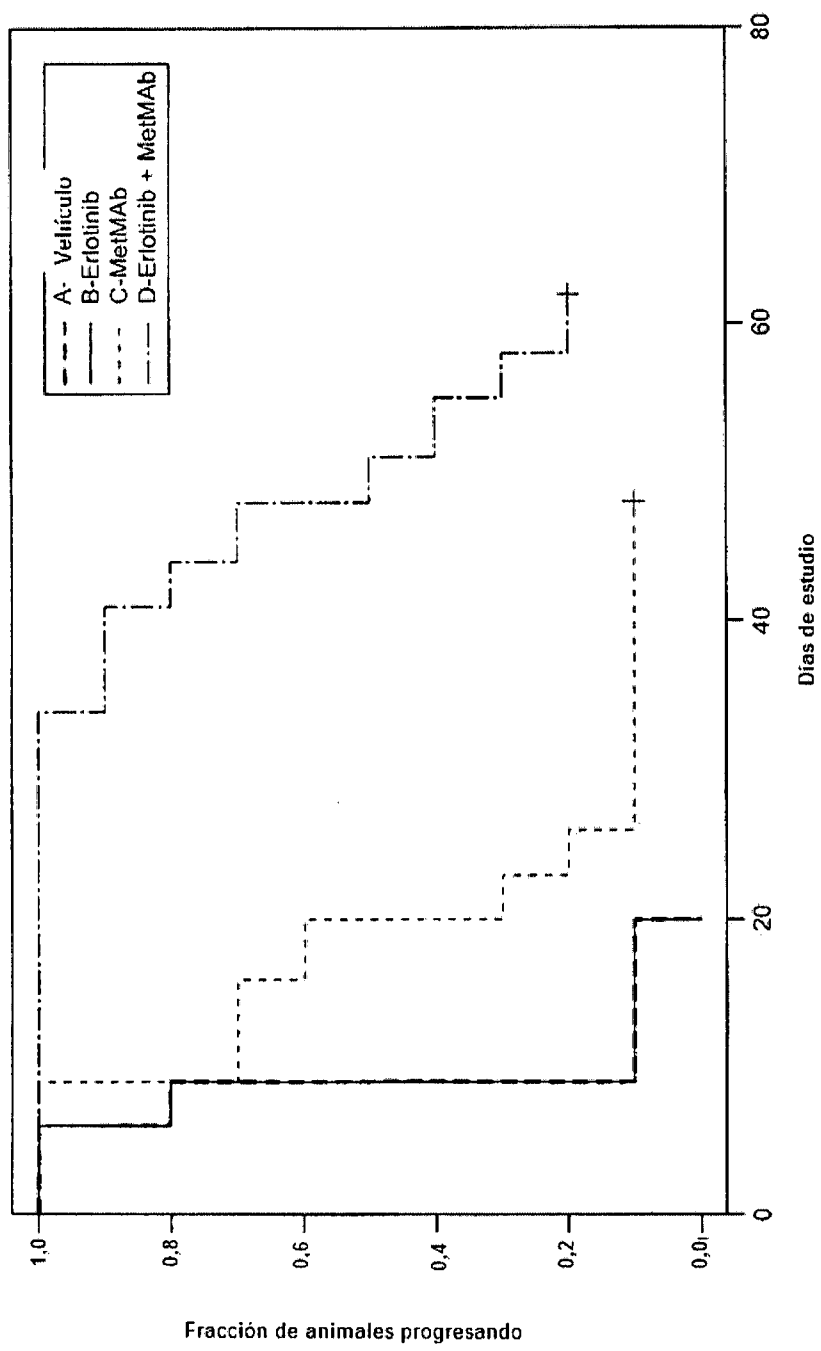


FIG. 6

FIG. 7

5D5.v2 Cadena liviana
FR1-LC: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID N°:1)
FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID N°:2)
FR3-LC: GVPSTRFSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYC (SEC ID N°: 3)
FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEC ID N°: 4)
CDR1-LC: KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEC ID N°: 5)
CDR2-LC: WASTRES (SEC ID N°: 6)
CDR3-LC: QQYYAYPWT (SEC ID N°:7)
CL1: TVAAPSVFIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°: 8).

5D5.v2 Cadena pesada

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEC ID N°: 9)
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWV (SEC ID N°: 10)
FR3-HC: RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEC ID N°: 11)
FR4-HC: WGQGTLLVTVSS (SEC ID N°: 12)
CDR1-HC: GYFTTSYWLH (SEC ID N°: 13)
CDR2-HC: GMIDPSNSDTRFNPWFKD (SEC ID N°: 14)
CDR3-HC: ATYRSYVTPLDY (SEC ID N°: 15)
CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEC ID N°: 16)
Fg: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFL
VSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALNHYTQKSLSPGK (SEC ID N°: 17)

FIG. 8

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLWCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVVFSCSVMHREALNHYTQKSLSPGK (SEC ID N° 18)

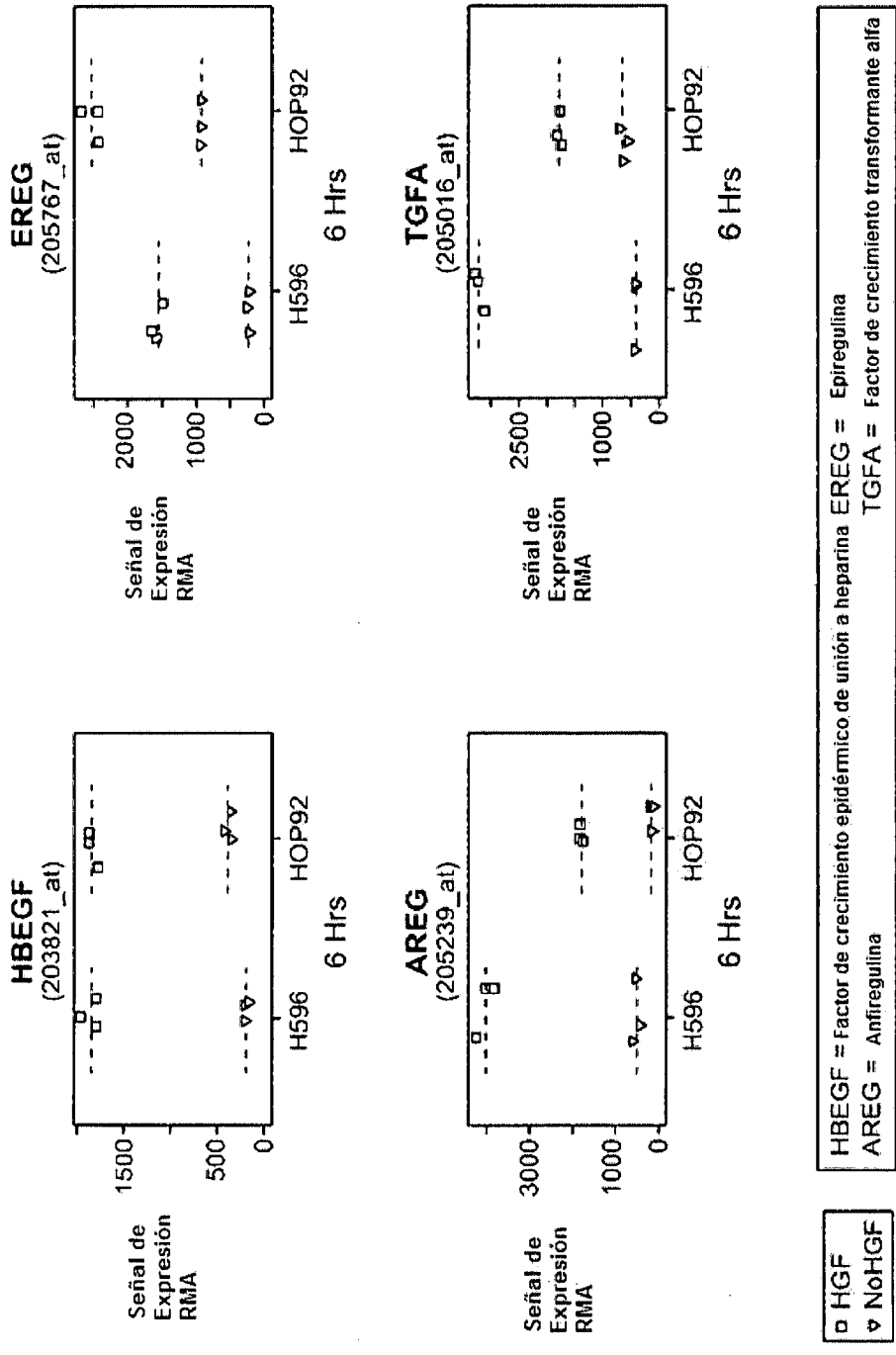


FIG. 9A

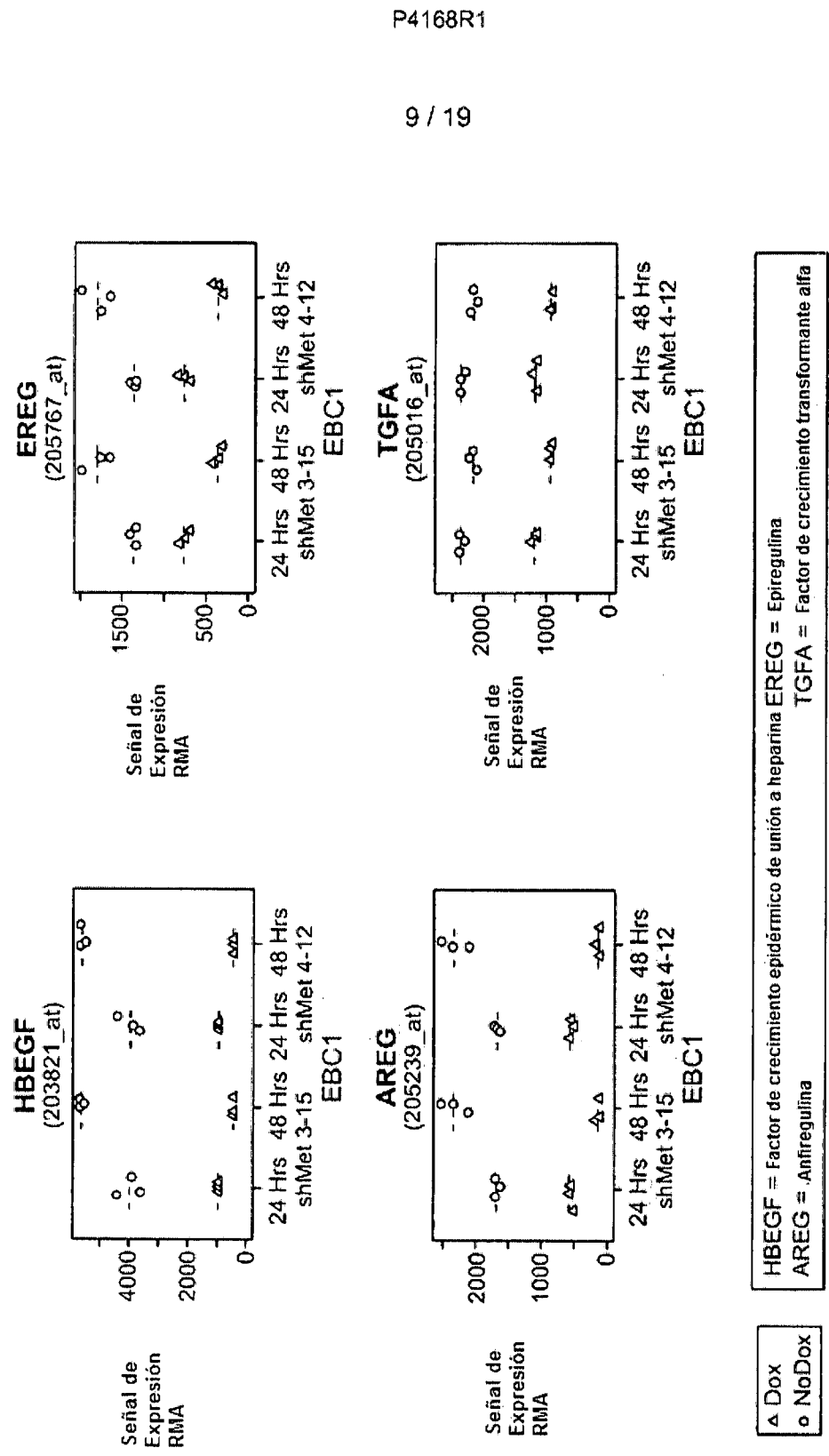


FIG. 9B

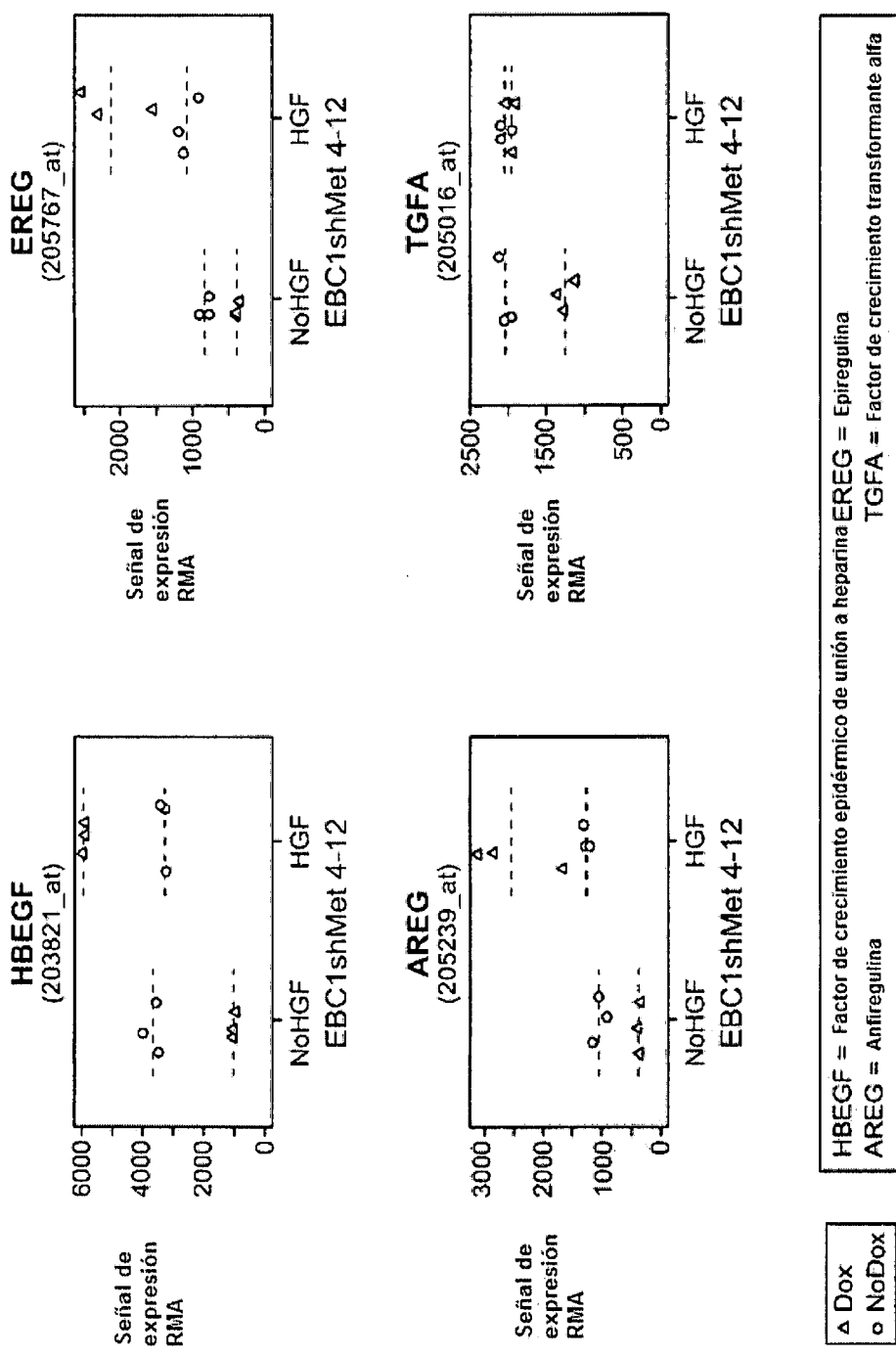


FIG. 9C

P4168R1

P4168R1

12 / 19

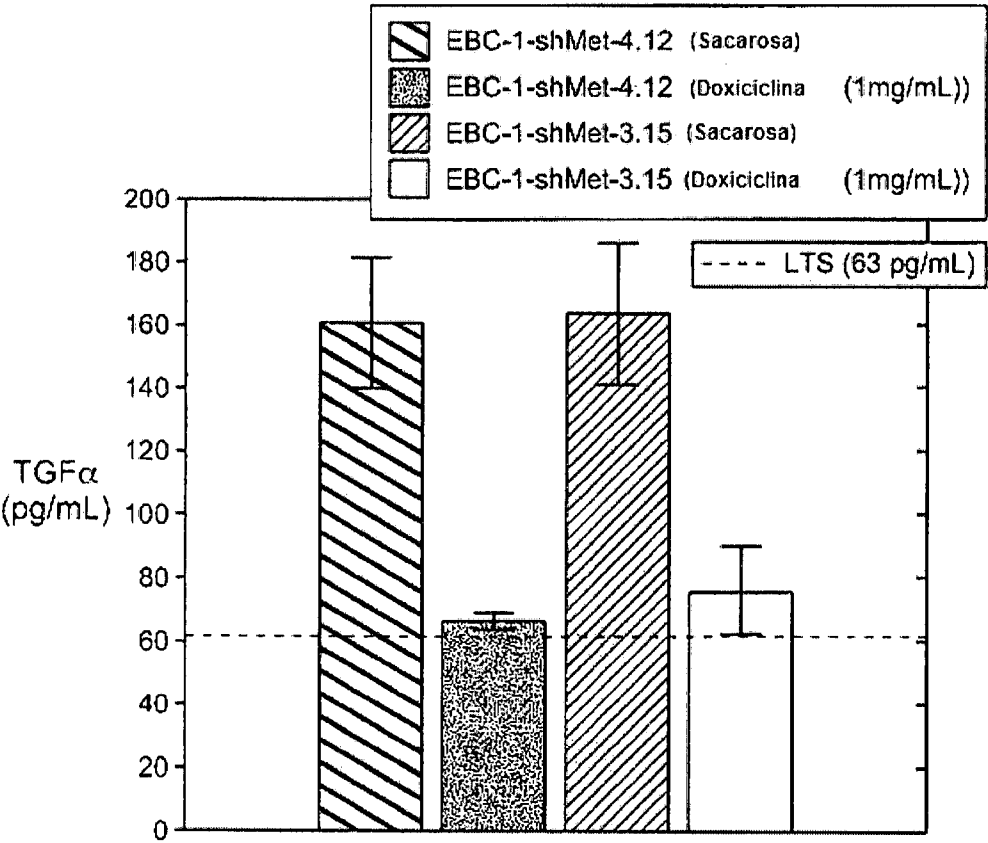


FIG. 9E

P4168R1

13 / 19

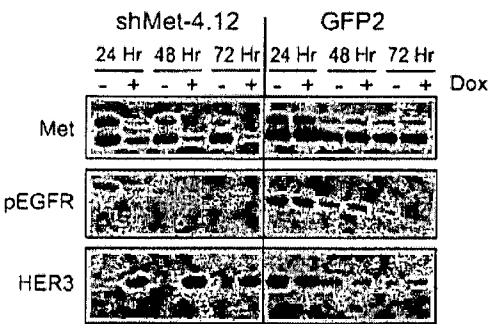


FIG. 10A

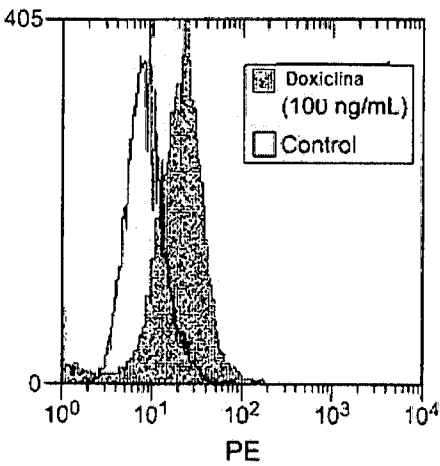


FIG. 10B

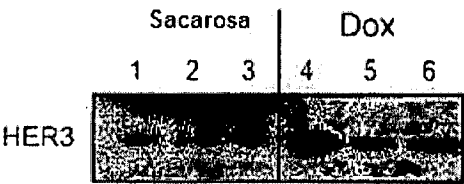


FIG. 10C

P4138R1

14 / 19

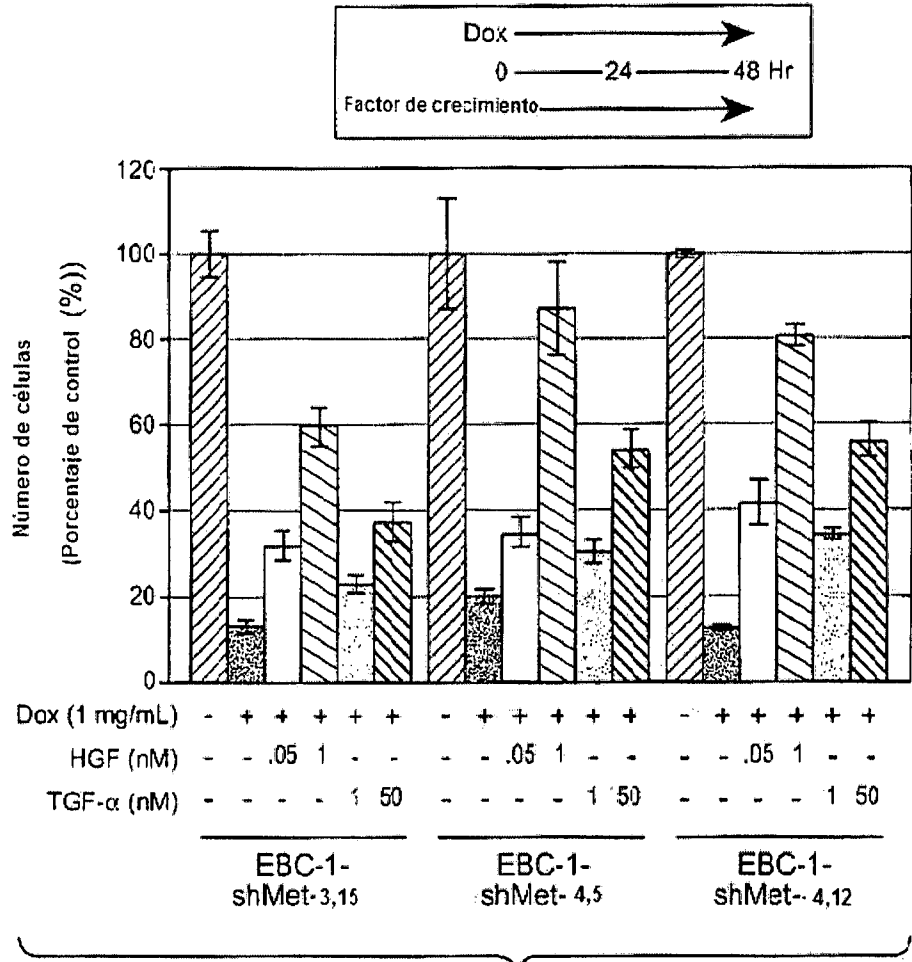


FIG. 11

P4168R1

15 / 19

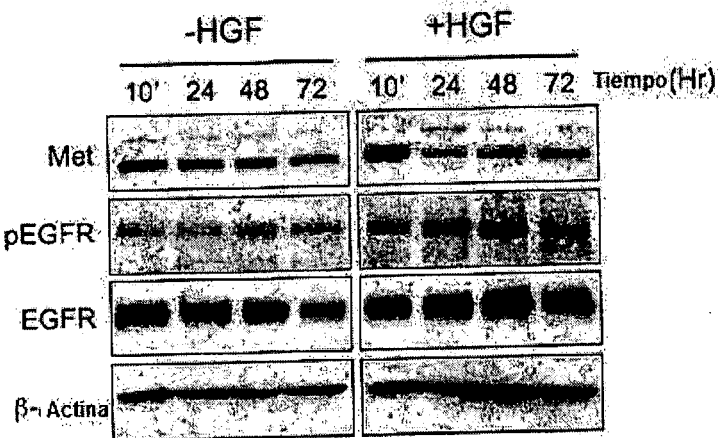


FIG. 12

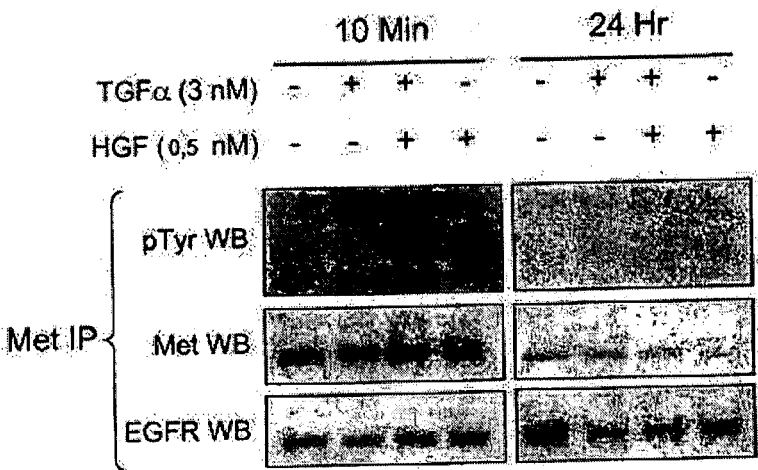


FIG. 13

P4168R1

16 / 19

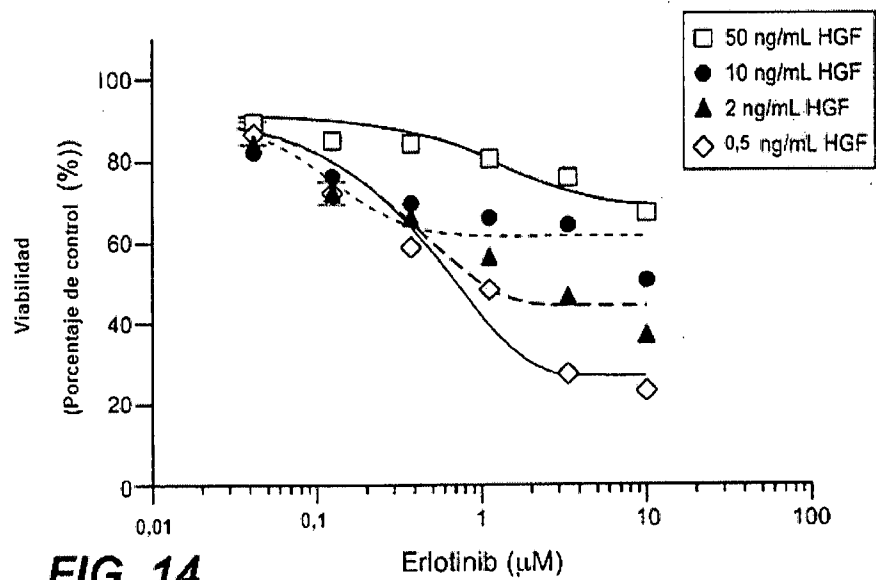


FIG. 14

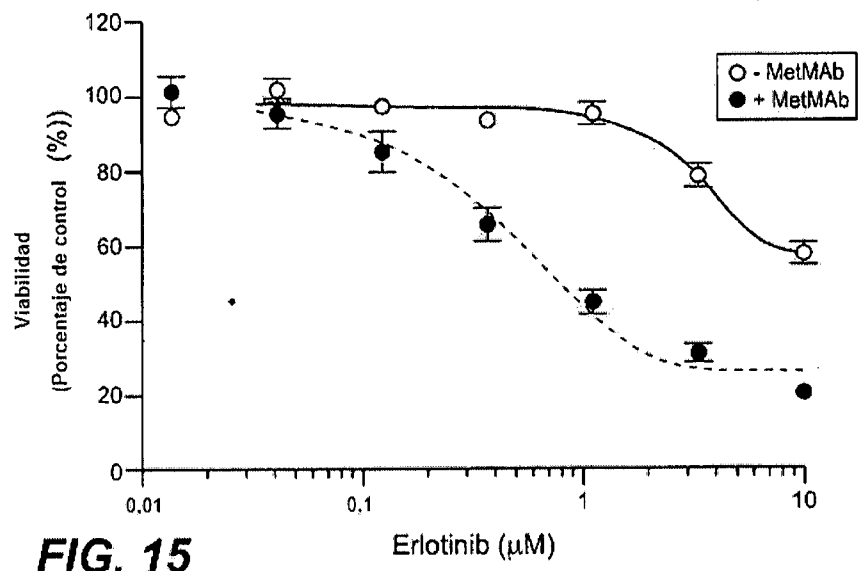


FIG. 15

P4168R1

17 / 19

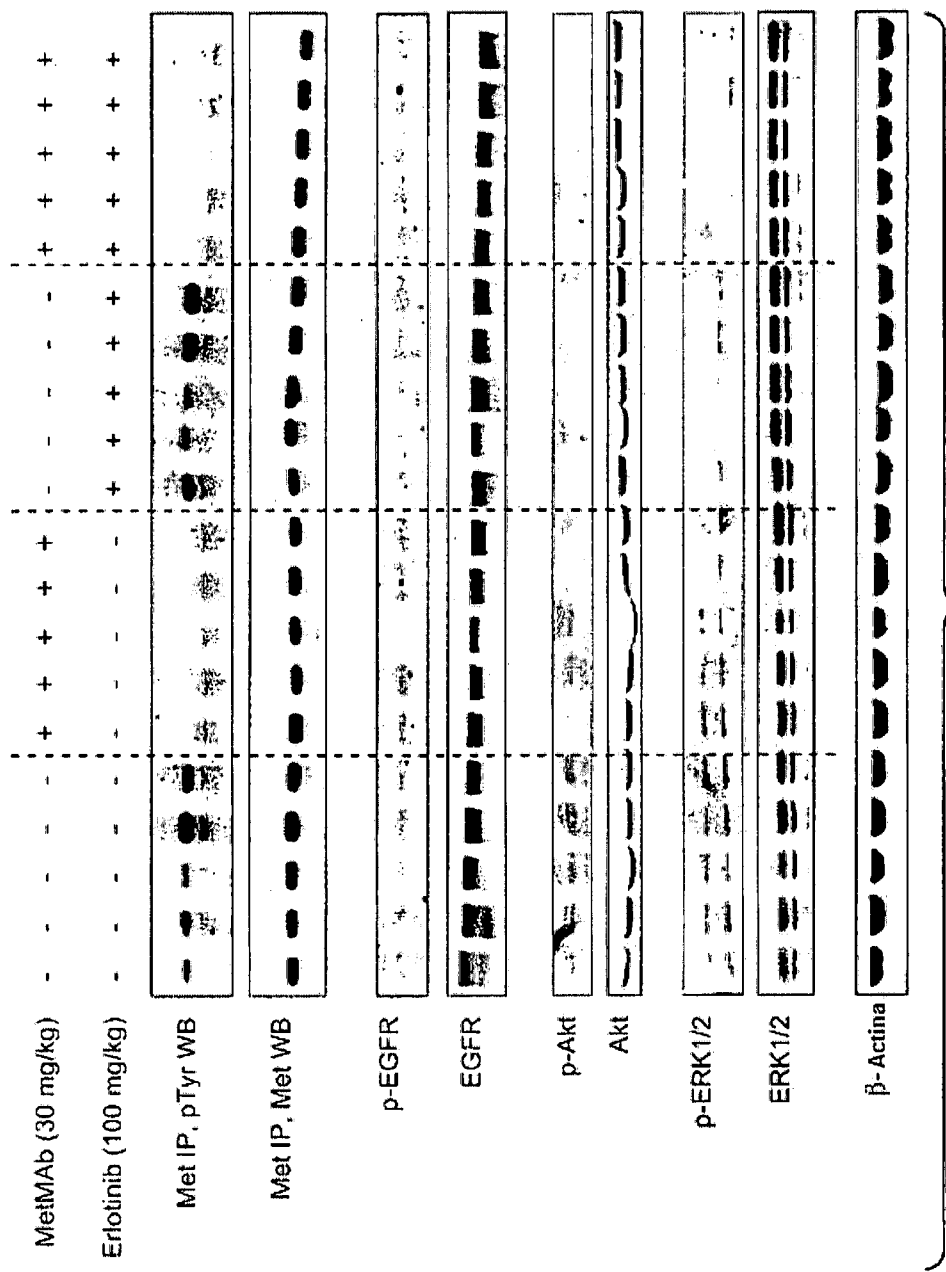


FIG. 16

204

P4168R1

18 / 19

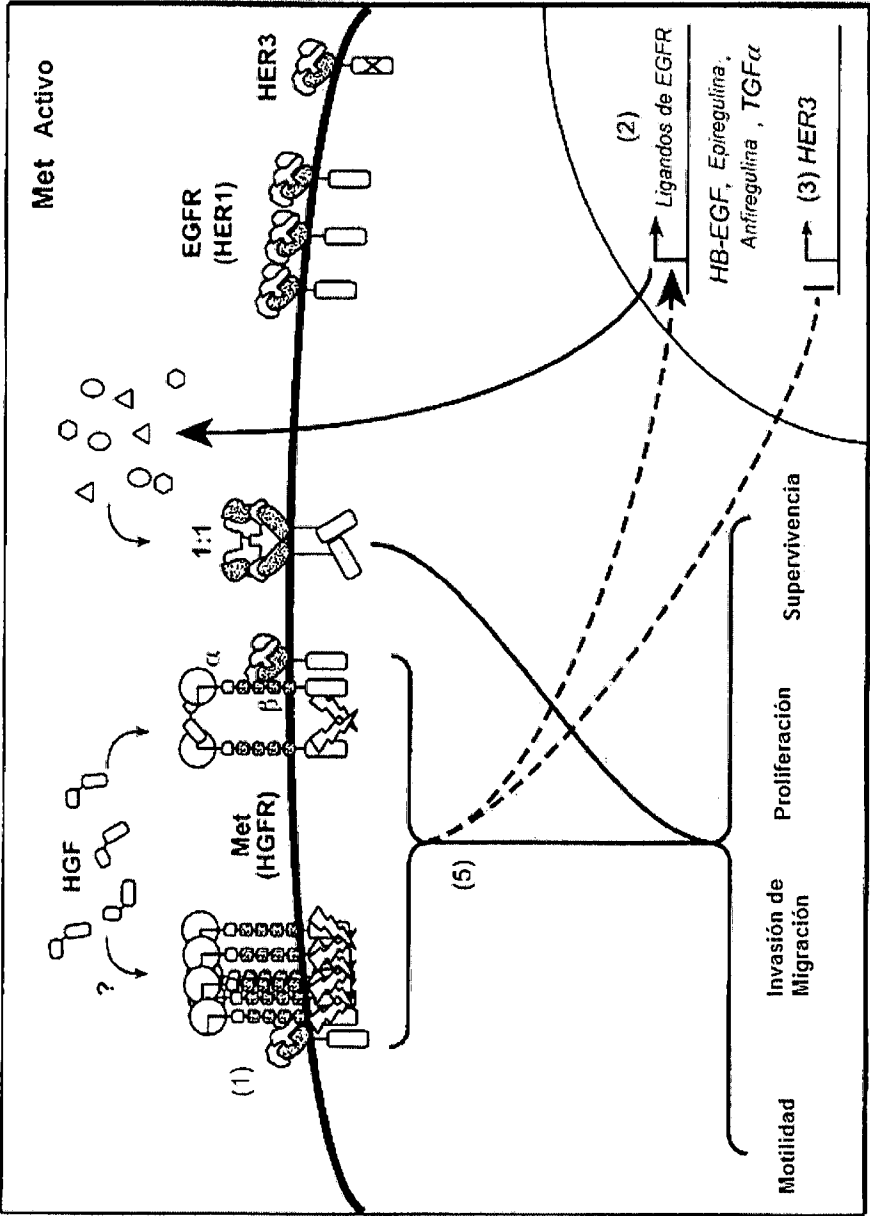


FIG. 17A

205

P4168R1

19 / 19

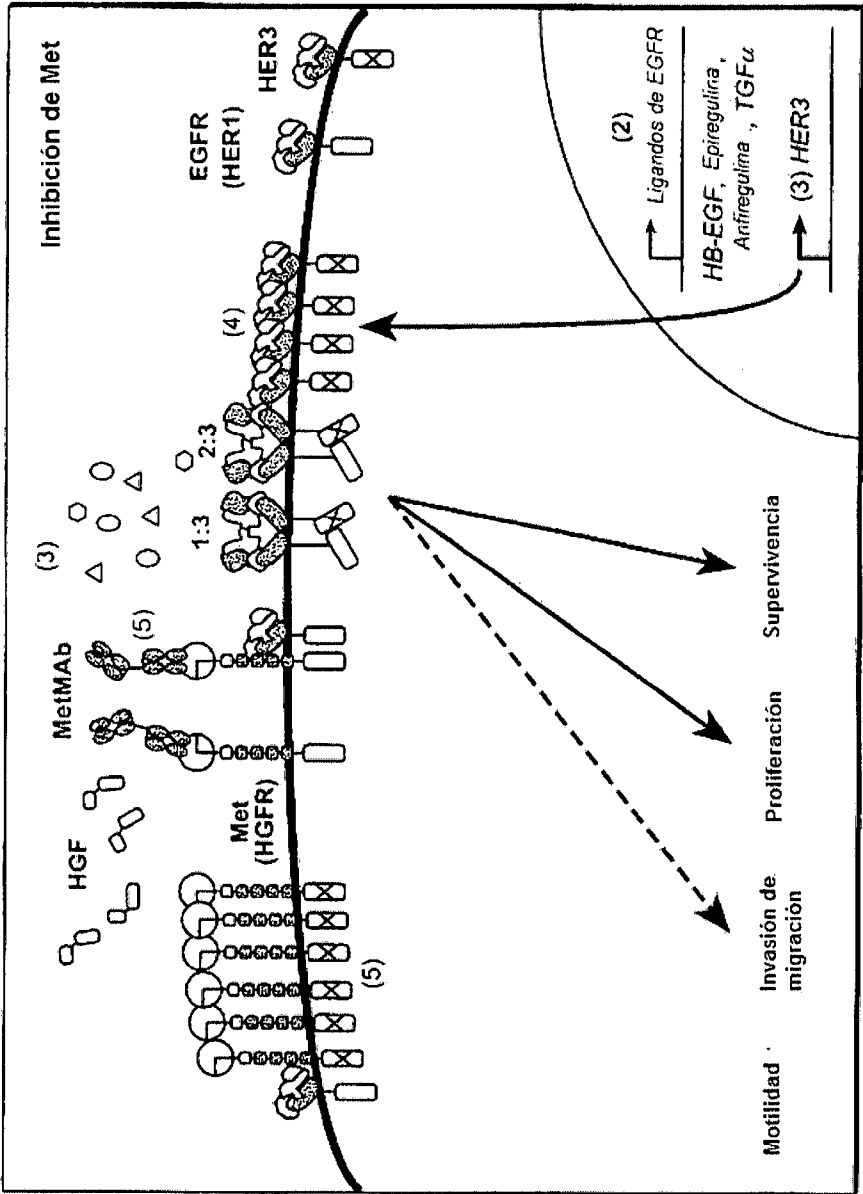


FIG. 17B

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

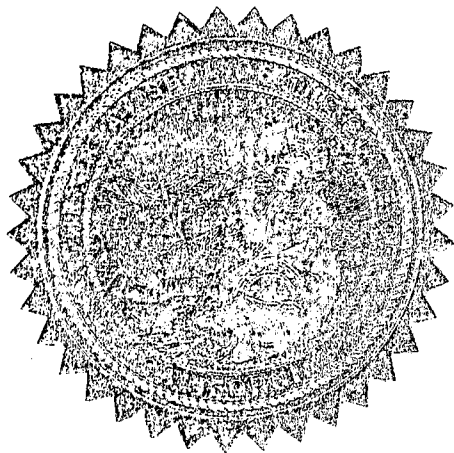
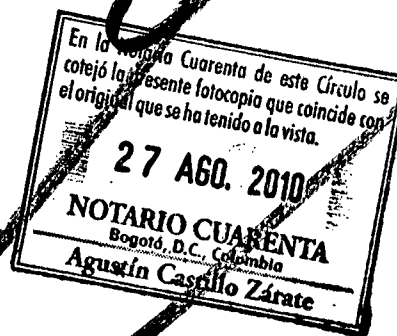
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by AIDA MICLAT GUIAM
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of AIDA MICLAT GUIAM, Notary Public,
State of California

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 15th day of December 2005
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 267083
9. Seal/Stamp:

10. Signature



[Signature]

Secretary of State

BY *[Signature]*

OSP 05 90772

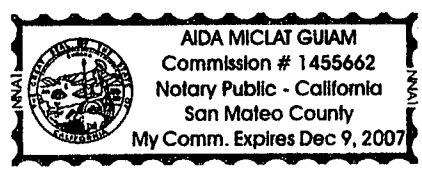
CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California }
County of San Mateo } ss.

On December 6, 2005 before me, Aida Micala Guim
Date Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")
personally appeared Timothy R. Schwartz
Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me
☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.
Aida Micala Guim
Signature of Notary Public

OPTIONAL

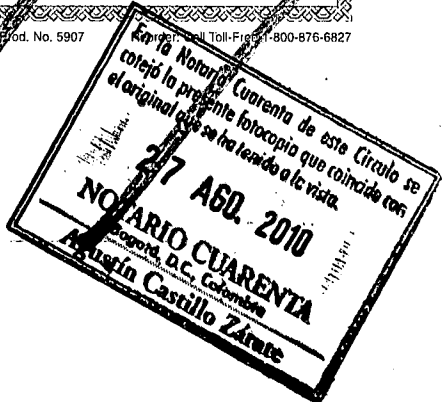
Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____
Document Date: _____ Number of Pages: _____
Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____
☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____
Signer Is Representing: _____



Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseññas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y curso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We)

Genentech, Inc.

1 DNA Way

domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990 USA**

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in

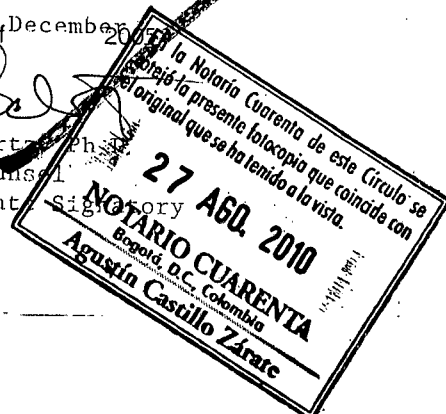
South San Francisco, California USA

this 6th day of December 200_

Signature

Name
Title

Timothy R. Schwartz
Section Patent Counsel
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.



AUTHORIZATION

Genentech, Inc. hereby authorizes any of Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec and Timothy R. Schwartz, for so long as they remain employees of Genentech, Inc., to execute, on its behalf, any submissions associated with the filing, prosecution, granting, and extension and maintenance of grant of patent and trademark applications in the U.S. and foreign countries, contracts relating to biological deposits with the American Type Culture Collection, and assignments to publishers of copyrights covering works authored by Genentech employees.

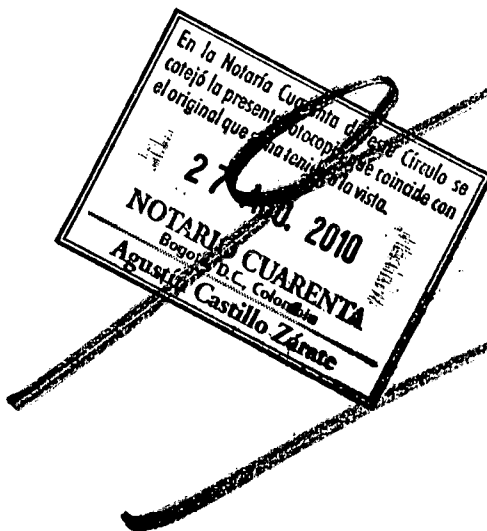
August 27, 2002

Dated

Sean Johnston

Sean A. Johnston

Vice President, Intellectual Property
Genentech, Inc.



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **Genentech, Inc.** domiciliada en **1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, Estados Unidos de América.**

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

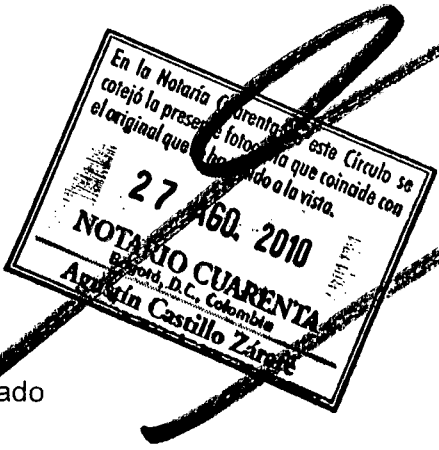
- 1. País: Estados Unidos de América
Esta documento público
- 2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
- 3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
- 4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público
Estado de California

CERTIFICADO

- 5. en Sacramento, California
- 6. el 15 de diciembre de 2005
- 7. por el Secretario de Estado Delegado, Estado de California
- 8. No. 267083
- 9. Sello/Timbre

10. Firma

(Firma)
Secretario de Estado



RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

Estado de California)
) ss.
Condado de San Mateo)

El 6 de diciembre de 2005, ante mi, AIDA MICLAT GUIAM, apareció personalmente
Thimoty R. Schwartz

☐ a quien conozco personalmente

☒ quien demostró ante mi en base a
evidencia satisfactoria ser la persona cuyo
nombre esta suscrito en el instrumento y
quien reconoció ante mi que ejecutó el
mismo en su capacidad autorizada, y que
por su firma en el instrumento la persona o
la entidad a nombre de la cual la persona
actuó, ejecutó el instrumento.

Hay un sello que dice:
AIDA MICLAT GUIAM
COMISIÓN # 14556612
Notario Público-California
Condado de San Mateo
Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

-----OPCIONAL-----

Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y puede
prevenir la remoción y readhesión fraudulenta de esta forma a otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: _____

Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____

Firmante(s) diferente(s) a (los) nombrado(s) arriba: _____

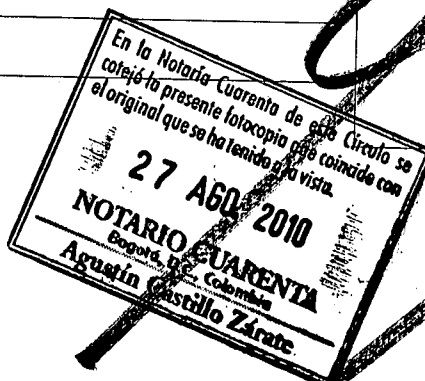
Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante: _____

- ☐ Individuo
☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____
☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de hecho
☐ Fideicomisario
☐ Guardián o conservador
☐ Otro: _____

El firmante representa: _____

Huella Índice derecho del firmante
Parte alta del dedo aquí



AUTORIZACION

Genentech, Inc. por la presente autoriza a cualquiera de Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec y Thomity R. Schwartz, mientras permanezcan como empleados de Genentech, Inc., a ejecutar, a su nombre, cualquier solicitud asociada con presentación, procesamiento, consecución, y extensión y mantenimiento de concesión de solicitudes de patente y marca registrada en los Estados Unidos y países extranjeros, contratos relacionados con depósitos biológicos con la Colección Americana de Tipo de Cultivo, y cesiones a publicistas de derechos de autor que cubran los trabajos de autoría de los empleados de Genentech.

27 de Agosto de 2002

Fechado

(Firma)

Sean A. Johnston

Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

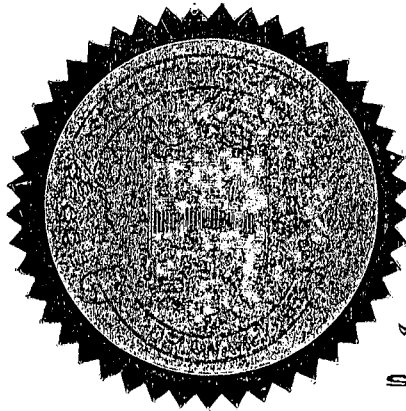
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

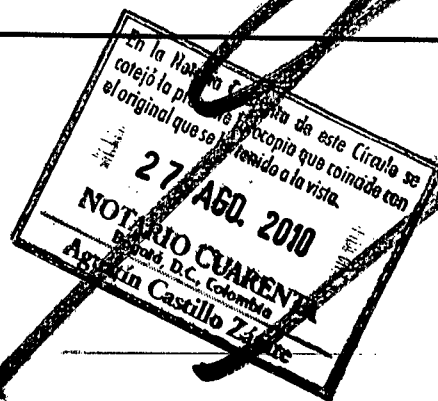
8. No. 0254030

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

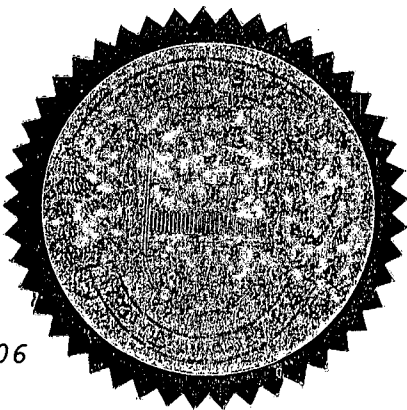


Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor
Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 900384

DATE: 05-24-05

AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "Corporation"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

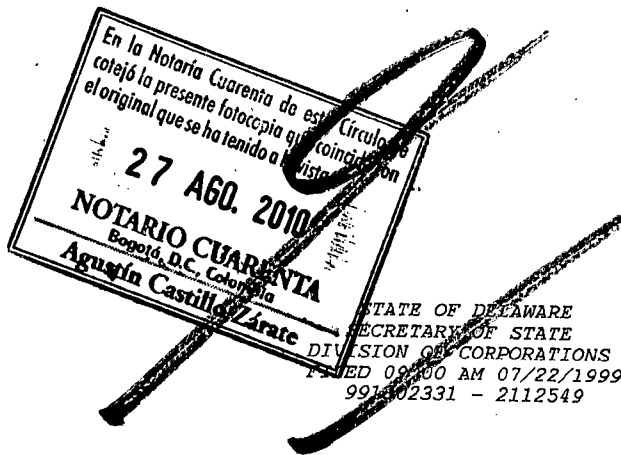
The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("Delaware Law").



ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

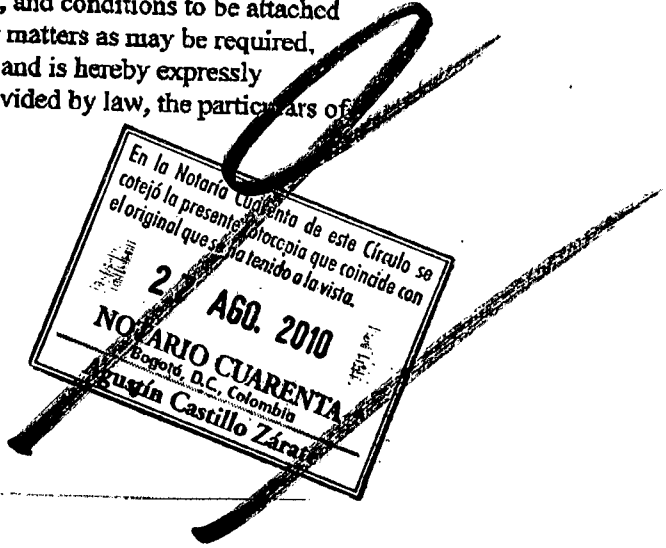
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

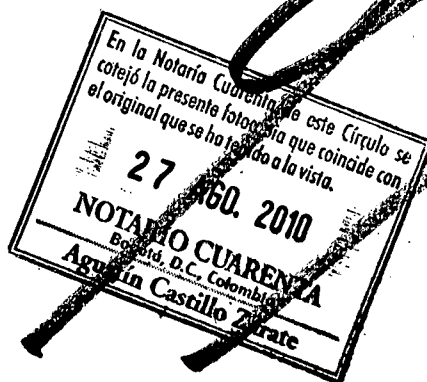
SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of



the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

- (i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;
- (ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;
- (iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;
- (iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;
- (v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;
- (vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;
- (vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and
- (viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.



ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are



divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

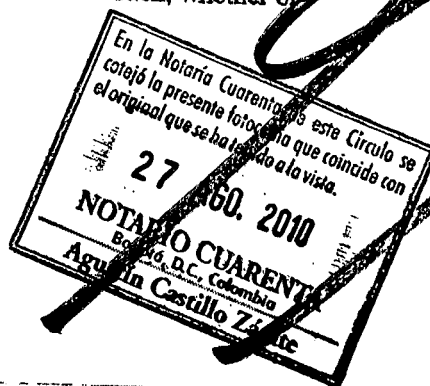
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors.* (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or



not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

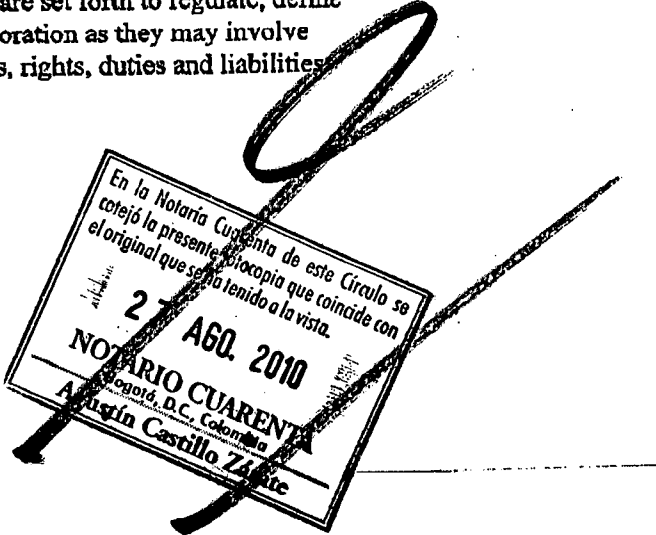
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, rescission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities



of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.

En la Notaría Cuarenta y siete de este Cirulo se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.
27 ABO. 2010
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

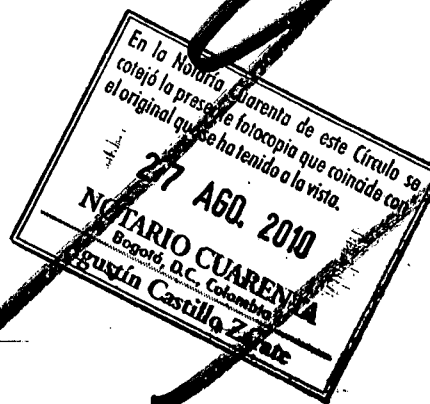
SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term "Roche" shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are "affiliates" (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. *Termination: Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the



meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "Corporation" and "Roche" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer or director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.

En la Notaria Cuarenta de este Circuito se
cotejó la presente fotocopia que coincide con
el original que se ha tenido a la vista.
27 AGO. 2010
NOTARIO CUARENTA
Sociedad A.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.



IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
 Name: Stephen G. Juelsgaard
 Title: Senior Vice President,
 General Counsel and Secretary



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254030
9. Sello/timbre
10. Firma

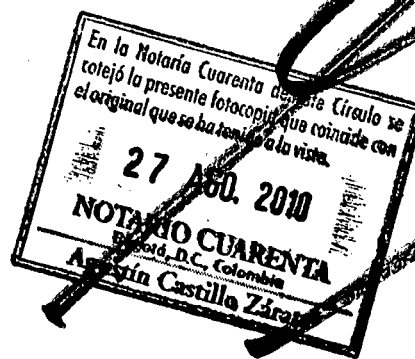
Harriet Smith Windsor (Firma)

Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL VIGÉSIMO SEGUNDO DÍA DE JULIO, A. D. 1999, A LAS 9 EN PUNTO DE LA MAÑANA.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900384

FECHA: 05 - 24 - 05

CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR
 CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
 GENENTECH, INC.

Genentech, Inc (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, por la presente corrige el Certificado de Incorporación, el fue presentado originalmente el 23 de diciembre de 1986, bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y corregido subsiguientemente.

Por la presente se vuelve a redactar el certificado de incorporación de la Corporación y se corrige aun más para que diga en su totalidad lo que sigue:

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de a Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones pueden ser organizadas bajo la Ley General de Corporación del Estado de Delaware como **en la lista o puede se** modificada la misma en adelante ("**Delaware Law**").

ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación esta **autorizada a** emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de cuatrocientos millones (400,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones



preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trecientos millones (300,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la Corporación con derecho a votar por la misma independiente de las consideraciones de la Sección 242(b)(2) de la Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción Común.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquier acción sin emitir o del tesoro del las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

(b) *Dividendos.* Sujeto a los derechos de los accionistas de las Acciones Preferenciales, los accionistas de Acciones Comunes deberán tener el derecho a recibir, cuando y como se declare por la Junta Directiva, de los activos de la Corporación los cuales están disponibles para ello por ley, dividendos pagables ya sea en dinero, propiedad, o acciones y los accionistas de la Acción Preferencial no tendrán derecho a participar en tales dividendos (a menos que la Junta Directiva determine lo contrario en cualquier resolución que condiciona la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

(a) *Series y Límites de Variaciones entre Series.* Cualquier acción emitida o del tesoro de las Acciones Preferenciales puede emitirse cada cierto tiempo en una o más series para tal consideración como pueda ser fijada cada cierto tiempo por la Junta Directiva. Antes de que se emita cualquier acción de las Acciones Preferenciales de cualquier serie particular, se deberá presentar un certificado ante el Secretario de Estado de Delaware estableciendo las designaciones, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones que irán anexas a las Acciones Preferenciales de tal serie y tales otras cuestiones como puedan requerirse, y la Junta Directiva deberá fijar y determinar, y por la presente está expresamente autorizada para fijar y determinar, en la forma provista por la ley, los



particulares de las acciones de tal serie (siempre y cuando no sean inconsistentes con las condiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes:

- (i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, numero que puede incrementarse (excepto cuando lo determine de otro modo la Junta Directiva al crear tal serie) o reducida (pero no por debajo del número de acciones de las mismas que están vigentes) cada cierto tiempo por una acción semejante de la Junta Directiva;
- (ii) la tasa anual de dividendos a pagar sobre las acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales se pagarán tales dividendos y le fecha a partir de la cual los dividendos serán acumulativos en el evento que la Junta Directiva determine que los dividendos serán acumulativos;
- (iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;
- (iv) si tal serie tendrá o no privilegios de conversión y, de ser así, los términos y condiciones de tal conversión, incluyendo, pero sin estar limitado a, la condición para ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y de tal forma como la Junta Directiva lo determine;
- (v) si las acciones de tal serie serán o no redimibles y, de ser así, los términos y condiciones de tal redención, incluyendo la fecha o fechas en las cuales o después de las cuales pueden ser redimibles, y la cantidad a pagar por acción en caso de redención, cantidad que variará en diferentes condiciones y en diferentes fechas de redención;
- (vi) si tal serie tendrá o no un fondo de inversión para la redención o compra de acciones de esa serie y, de ser así, los términos y condiciones de tal fondo de inversión;
- (vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de una liquidación, disolución o cierre voluntaria o involuntaria de la Corporación, y



los derechos relativos de prioridad, de haber, de pago de acciones de esa serie; y

(viii) cualquier otro derecho relativo, preferencia y limitación de tal serie.

ARTICULO 5

SECCION 5.01. *Enmiendas a los estatutos por los Directores.* (a) En adición y no limitando los poderes conferidos por estatutos, la Junta Directiva esta expresamente autorizada para hacer, alterar, enmendar, rechazar y rescindir los estatutos de la Corporación, sujetos a las secciones 5.01(b) y 5.01(c) a continuación.

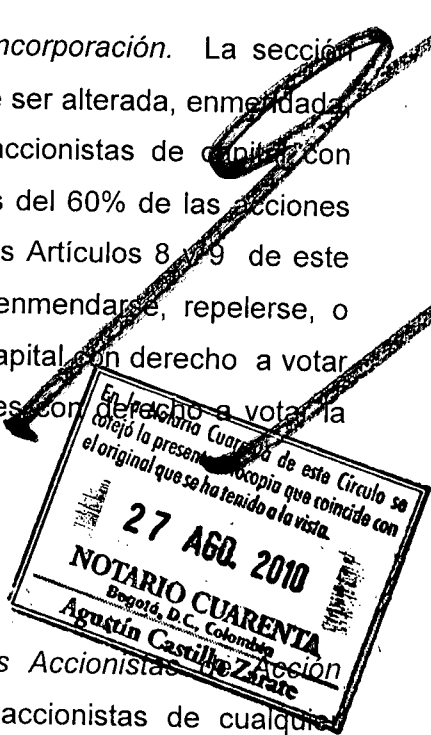
(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden ser alteradas, enmendadas, repelidas, o rescindidas por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar las mismas.

SECCION 5.02. *Enmienda del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación solo puede ser alterada, enmendada, repelida, o rescindida por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a voto sobre la misma que representen a más del 60% de las acciones con derecho a votar la misma. La sección 5.01(c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar la misma que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar la misma.

ARTICULO 6

SECCION 6.01. *Elección del Directorio por los Accionistas Preferencial.* Durante cualquier periodo cuando los accionistas de cualquier

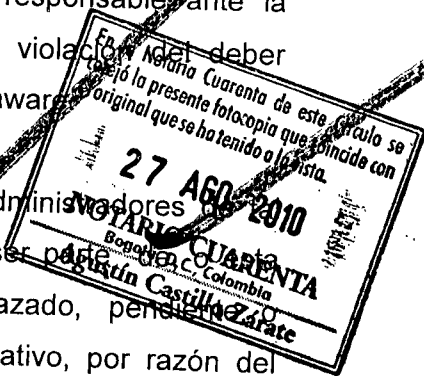


acción preferencial cualquiera de una o más series de las mismas, que voten como una clase, tengan derecho a elegir un número específico de directores, por razón a atrasos en los dividendos u otras condiciones que les dan el derecho a hacerlo, entonces y durante el tiempo que continúe el derecho (i) el número de directores autorizado de otro modo será incrementado por tal número de directores especificado, y los accionistas de tales Acciones Preferenciales o tales series de las mismas, que votan como una clase, tendrán derecho a elegir los directores adicionales para lo que se provee, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones Preferenciales o series; (ii) cada uno de tales directores adicionales servirá durante tal termino, y tendrá tales poderes de voto, como se han de otorgar en las provisiones pertinentes a tales Acciones Preferenciales o series; y (iii) siempre que los accionistas de cualquiera de tales Acciones Preferenciales o series de las mismas están desprovistos de tales derechos a elegir un número específico de directores, votando como clase, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones preferenciales o series, los términos de oficio de todos los directores elegidos por los accionistas de tales Acciones preferenciales o series, que votan como clase, de acuerdo con las condiciones o elegidos para llenar cualquier vacante resultante de la muerte, renuncia o remoción de directores así elegidos por los accionistas de tales Acciones Preferenciales o series, terminarán en adelante y el número autorizado de directores será reducido en concordancia.

SECCION 6.02. *Votaciones.* Las elecciones de directores en una reunión anual o especial de accionistas necesaria no serán por votos escritos a menos que los estatutos de la Corporación digan lo contrario.

SECCION 6.03. *Eliminación de cierta responsabilidad personal de los directores.* (a) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por daños monetarios por violación del deber fiduciario como director hasta donde lo permita la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y sus herederos, ejecutores o administradores o persona) quien fue o es una parte o esta amenazado de ser parte involucrado en cualquier acción, demanda o proceso amenazado, penado o completado, ya sea civil, criminal, administrativo o investigativo, por razón del hecho de que esa persona es o fue un director de la Corporación o es o estaba sirviendo por solicitud de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa, será indemnizado y completamente protegido por la Corporación hasta donde lo



permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión cuna cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta tal punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

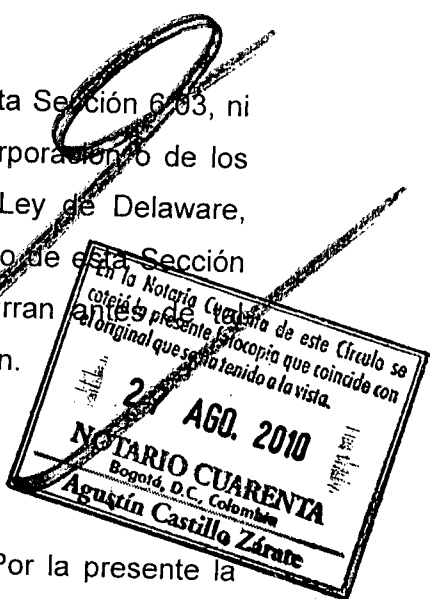
(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurrida por tal persona en cualquier capacidad o que surge de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán exclusivos de ningún otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirir de aquí en adelante.

(f) Ni la alteración, enmienda, rechazo o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de ninguna condición de este Certificado de Incorporación o de los Estatutos de la Corporación, ni, hasta donde lo permite la Ley de Delaware, ninguna modificación de la ley, debe eliminar o reducir el efecto de esta Sección 6.03 respecto a ninguno de los actos u omisiones que ocurran antes de la alteración, enmienda, rechazo, rescisión, adopción o modificación.

ARTICULO 7

SECCION 7.01, Sección 203 de la Ley de Delaware. Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.



ARTICULO 8

SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este artículo 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionarios y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

SECCION 8.02. *Actividades en Negocios Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc. pueda de otra forma acordarlo por escrito,

(a) Roche no tendrá el deber de abstenerse de entrar directamente o indirectamente en actividades de negocios o líneas de negocios semejantes o similares a las de la Corporación, y

(b) ni Roche ni ninguno de sus funcionarios o director de la misma será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar cualquier deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades de Roche o de la participación de la persona en las mismas.

En el evento que Roche adquiera conocimientos de materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hecho



235

que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya se si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiere algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación, ha leído la noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 8.

SECCION 8.05, *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término "**Roche**" debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son "**afiliados**" (como se



define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc.

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante*. Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cese de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que se director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07. *Artículo 9*. Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos no nulos*. Ningún contrato, acuerdo, transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo u anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Cerificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "**Corporación**" y "**Roche**" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

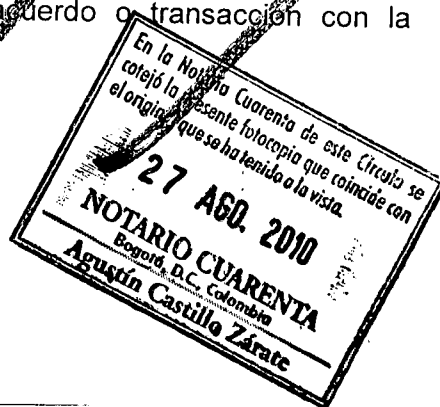


SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo). Las acciones vigentes de las Acciones Comunes de propiedad de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de accionistas que autorice o apruebe tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo).

SECCION 9.03. *No responsabilidad por acciones de buena fe.* Ni Roche ni ningún funcionario o director de la misma será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar cualquiera de los deberes fiduciarios o deberes de lealtad o por fallar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o por derivación de cualquier beneficio personal por razón del hecho que Roche o un funcionario o director de la misma de buena fe tome cualquier acción o ejerza cualquier derecho o de o retenga cualquier consentimiento en conexión con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto dado u otra acción tomada por cualquier persona que es un funcionario, director o representante de Roche, donde el voto o acción es tomado por tal persona en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho o un consentimiento de Roche para los propósitos de cualquiera de tal acuerdo o contrato.

SECCION 9.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 9.

SECCION 9.05. *Contratos cubiertos.* Para propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o cualquier corporación, sociedad, sociedad de riesgo conjunto, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) el cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poderes de voto o intereses de voto similares vigentes se considerará un contrato, acuerdo o transacción con la Corporación.



SECCION 9.06. *Efecto obligante.* Ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 9 ni la adopción de alguna condición inconsistente con cualquier condición de este Artículo 9 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 respecto a cualquier materia que ocurra, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, a no ser por este Artículo 9, pueda acaecer o surgir, antes de tal alteración, enmienda, cambio, rechazo o adopción.

SECCION 9.07. *Artículo 8.* Las condiciones de este Artículo 9 son adicionales a las condiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, el cual ha sido adoptado de acuerdo con las secciones 242 y 245 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware y por consentimiento escrito de el único accionista de la Corporación de acuerdo con la sección 228 de Ley General de Corporación del Estado de Delaware, ha sido ejecutado este 22 de Julio de 1999.

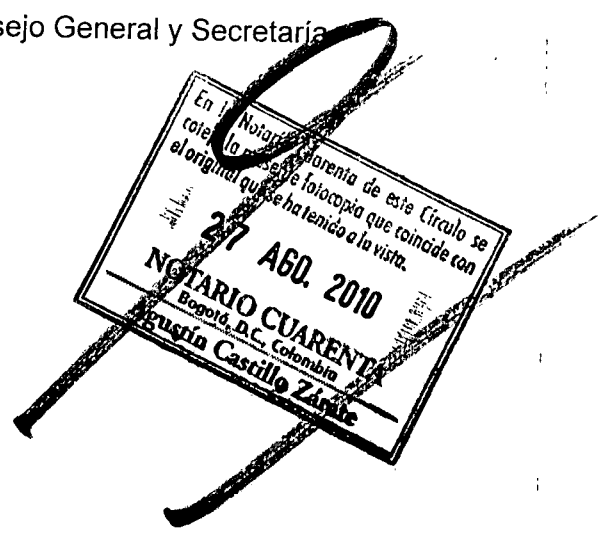
GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

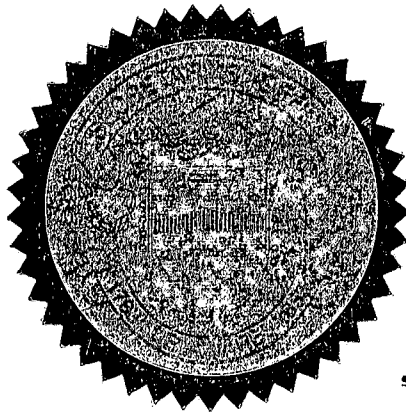
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254031

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State

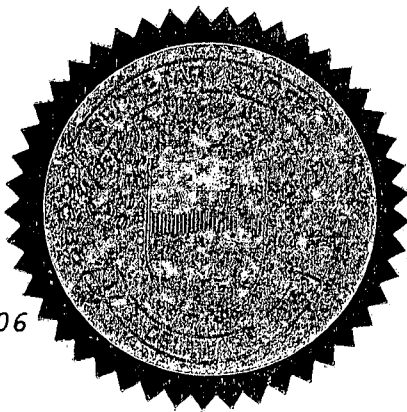


Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-05

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

75841



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

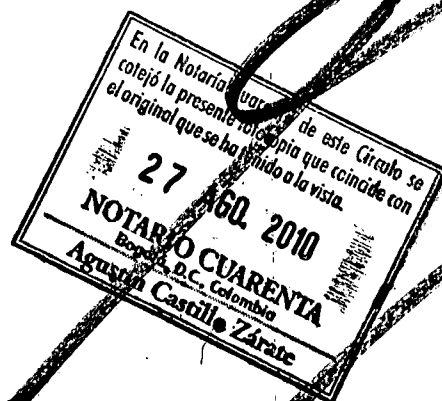
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

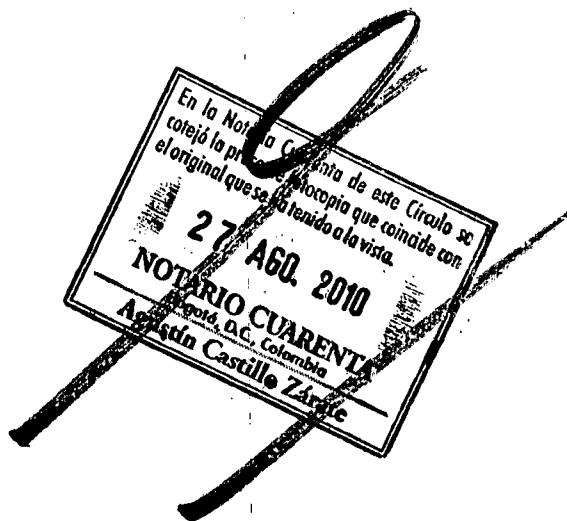
5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254031
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOQUINTO DIA DE MAYO, A. D. 2000, A LAS 5 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385

FECHA: 05 -24 - 05

CERTIFICADO DE ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de setecientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de la Junta Directiva la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se celebró debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

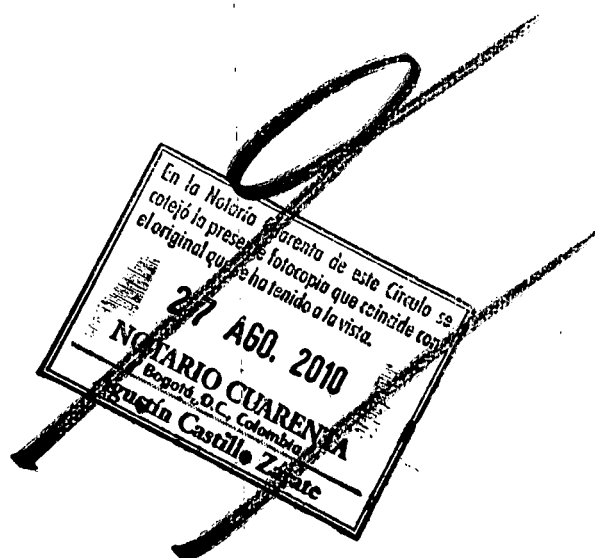
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

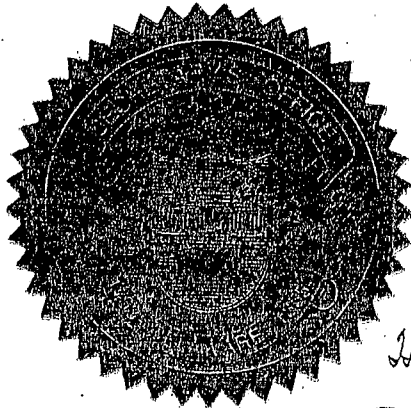
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D.: 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254033

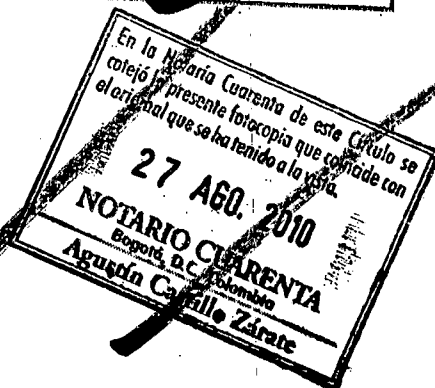
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

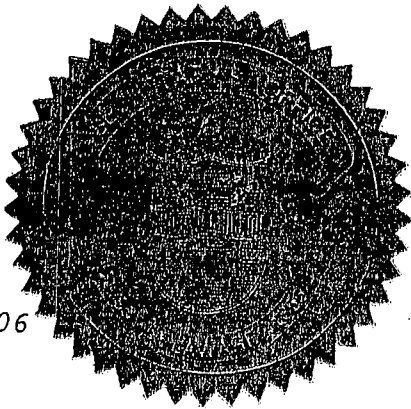


Delaware

The First State

PAGE 1

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506

Harriet Smith Windsor
Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05



CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

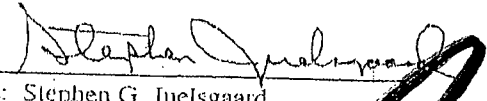
SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

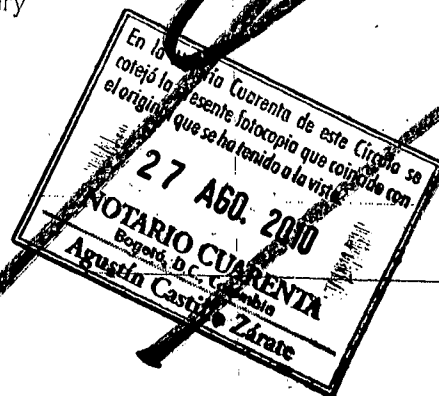
GENENTECH, INC.

By: 

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel
and Secretary

#153087



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

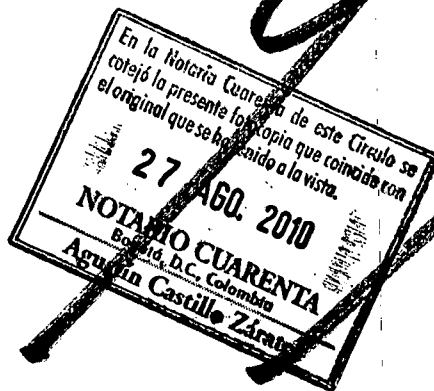
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/timbre
10. Firma

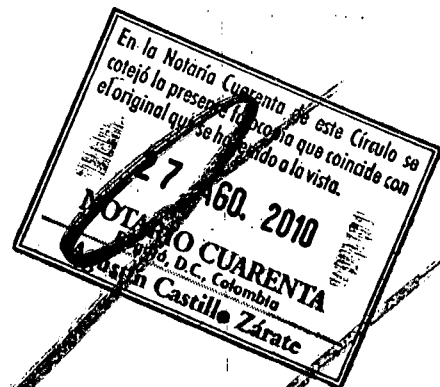
Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



250

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOSEXTO DIA DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor Secretaria de Estado

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente.



252

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

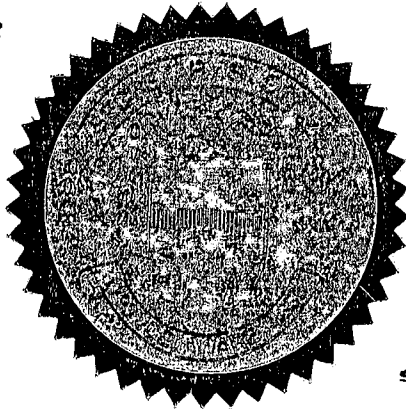
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document:
has been signed by Harriet Smith Windsor
3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware
4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

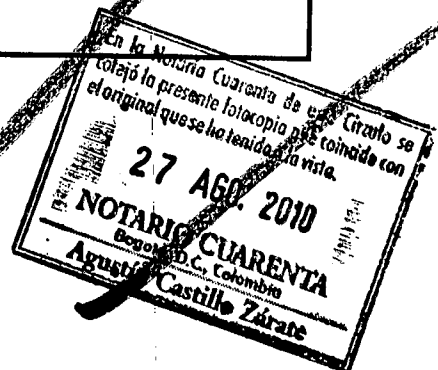
5. at Dover, Delaware
6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005
7. by Secretary of State, Delaware Department of State
8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



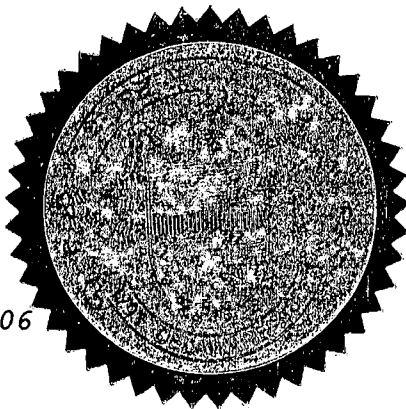
Delaware

PAGE 1

254

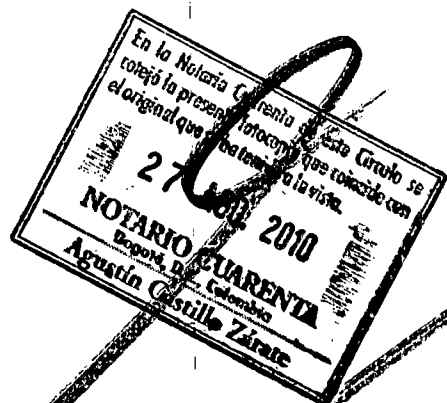
The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.



2112549

050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 380386

DATE: 05-24-05

255

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

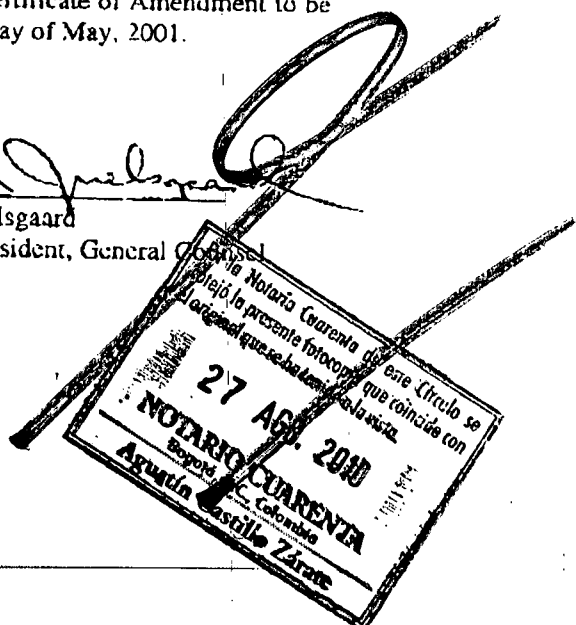
IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By:

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

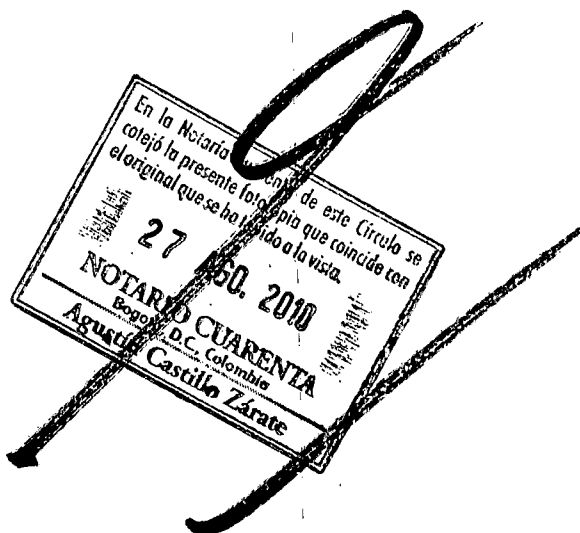
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900386

FECHA: 05 - 24 - 05

258

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

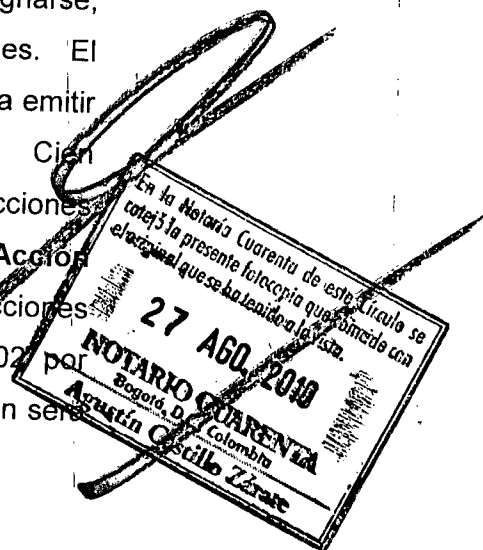
Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.



SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.

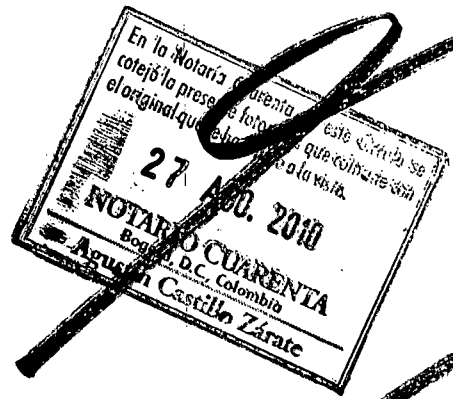
TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.

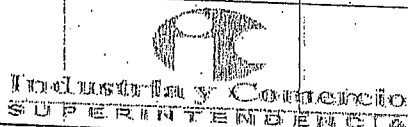


SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-123800-00000-0000

Fecha: 2010-10-06 12:00:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
☐	Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
☐	Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño Industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
☐	Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
☐	Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH, INC.

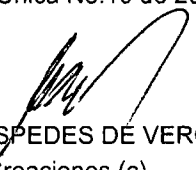
REFERENCIA	Radicación No.	10 123800
	Solicitud internacional	PCT/US2009/036314
	Fecha inicio fase nacional	06/10/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	14091

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e) del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha
adpa11

29 OCT. 2010