



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

07-58594

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO "COMBINACIÓN DE INHIBIDOR DE TIROSINA CINASA Y HER-2/NEU PARA TERAPIA
DE CANCER"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/00 // A61K31/S17 // A61P35/00

71. SOLICITANTE GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

DOMICILIO RIXENSART, BÉLGICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P.53.215

22. BOGOTÁ, D.C. - 8 JUN. 2007

SS

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-058594- -00000-0000
Fecha: 2007-06-08 16:20:55 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE IYI Eve: 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Folios: 177

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. Dirección: Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica. Nacionalidad o Domicilio: Rixensart, Bélgica. Lugar de Constitución: Bélgica. Teléfono: 3264270 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	C.C. _____ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>39.690.713</u> TP <u>53.215</u>
4 INVENTOR(ES) (72)	Nombre: BRUCK, Claudine, Elvire, Marie y GERARD, Catherine, Marie, Ghislaine. Dirección: GlaxoSmithKline, 709 Swedeland Road King of Prussia, PA 19406 y GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institute 89, B-1330 Rixensart. Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América y Bélgica.	

5 PCT (86)
Solicitud Internacional No. <u>PCT/EP2005/013409</u> Fecha: <u>08/12/05</u>
Publicación Internacional No. <u>WO 2006/061253 A3</u> Fecha: <u>15/06/06</u>

6 Título (54) "COMBINACIÓN DE INHIBIDOR DE TIROSINA CINASA Y HER-2/NEU PARA TERAPIA DE CÁNCER"

7 Clasificación Internacional (51) A61K 39/00 // A61K31/517 // A61P35/00

8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	GB	10/12/04	0427131.8

9 Comprobante de Pago No. 07 - 39.408 Fecha: 16-05-07

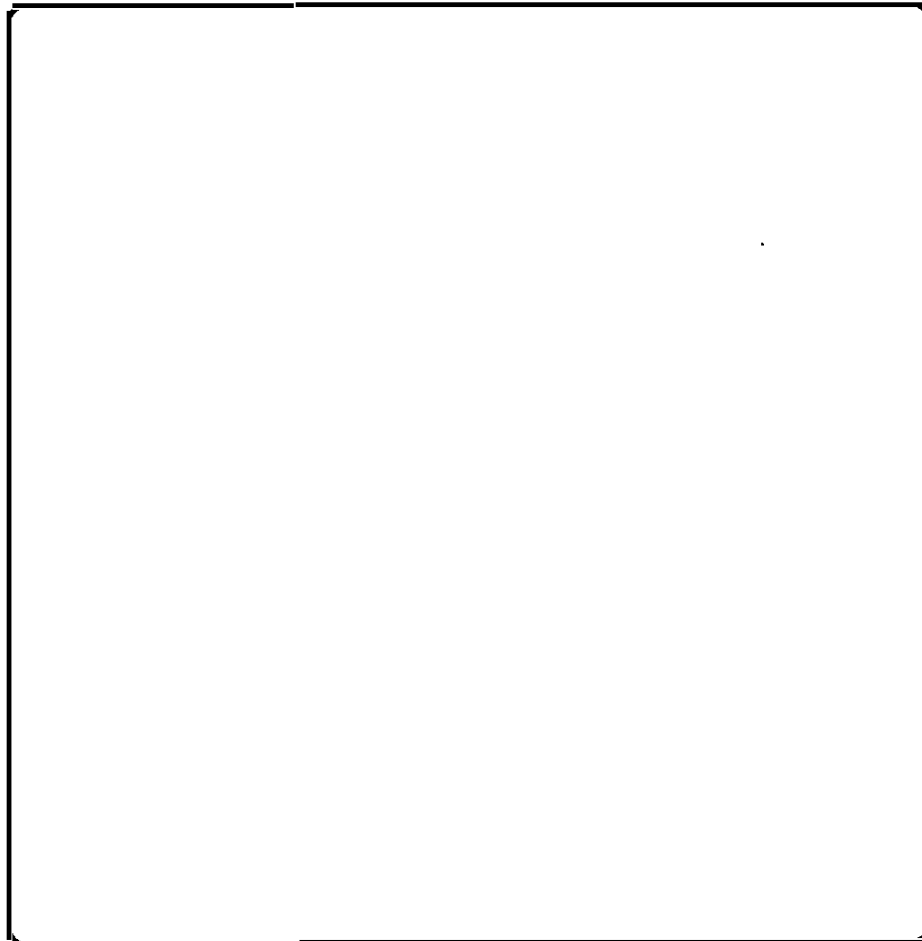
ANEXOS

⑩

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- ☐ 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.
- ☐ 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, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción y Opinión Escrita con su traducción.

⑪

FIGURA CARACTERISTICA:



⑫

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLORÉDA RICAURTE

FIRMA: 

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

HIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 39,408
FECHA : MAYO 16 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-058594- -00000-0000

Fecha: 2007-06-08 16:20:55 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 177

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55092725	16/05/2007	9,461,800.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se esta presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

4

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-09-466
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (Sociedad) documento también escrito en inglés y en español.

Notarización, documento escrito en español.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

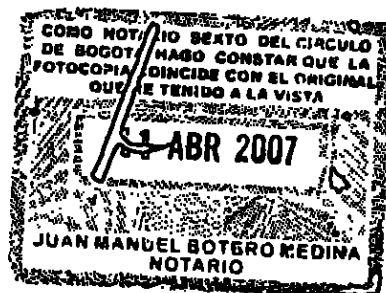
1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

CERTIFICADO

5. en Londres
6. el 01 de septiembre de 2004
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número: **G 749037**
9. Sello/Estampilla:
10. Firma: (ilegible)

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10:47

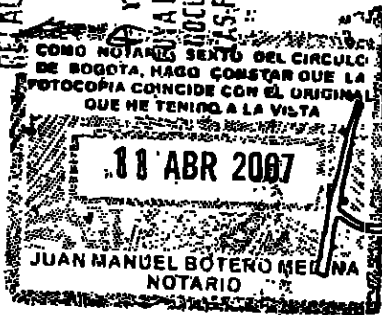
ues
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

260567

Nota Externa

COMO NOTARIA EN LA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPERA
LAS FUNCIONES INDICADAS



Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

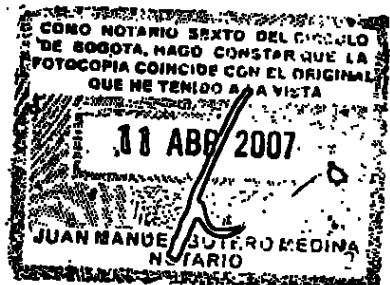
W. Glass
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, **JAMES KERR MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO:

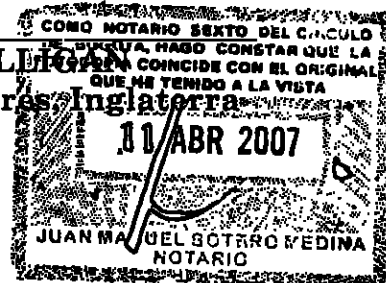
QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada **"GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A."** (anteriormente denominada **"Smithkline Beecham Biologicals s.a."**), Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bélgica, con domicilio social en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica;

QUE el citado Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 12 de junio de 2002, cuyo original he tenido a la vista.

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE y obre los efectos conducentes expido la presente que firmo y sello en Londres, el día de hoy primero de septiembre del año dos mil cuatro.

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



SCRIV
NOTA

7

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961/Convention de La Haye du 5 octob

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document/Le présent acte public

2. has been signed by a été signé par James Keer Milligan
3. acting in the capacity of agissant en qualité de Notary Public
4. bears the seal/stamp of est revêtu du sceau/timbre de Notary Public

Certified/Attesté

5. at London/à Londres 6. the/le 11 APR 2007
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs/
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous NO **G 749037**

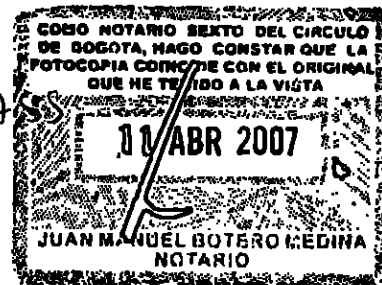
9. Stamp:
timbre:



10. Signature: W G L A S S

W G L A S S

For the Secretary of State/Pour le Secrétaire d'Etat



If this document is to be used in a country which is
not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the
mission representing that country.

7

Los abajo firmados, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica.

con domicilio en **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Bélgica**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a corporation organized and existing under the laws of Belgium.

domiciled at **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Belgium**

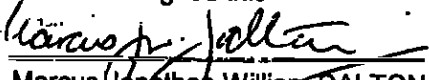
hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments; to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

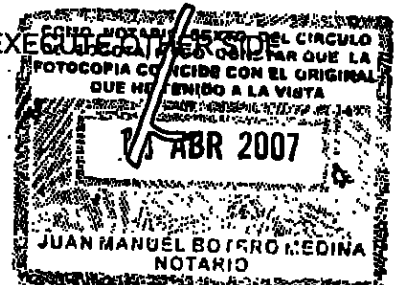
We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

31 AUG 2004

Given and signed this


Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXE



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de **Bélgica**, domiciliada en la ciudad de **Rixensart, Bélgica**, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de .

que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en , con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

On this day of 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the

of **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the **Belgium**, domiciled at the City of **Rixensart, Belgium**, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of

, that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at

, under date of , and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 39/00	
(22) Fecha de solicitud: 08-06-07		(71) Solicitante(s) GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 0427131.8	(32) Fecha 10-12-04	(33) Pais GB
		(72) Inventor(es) BRUCK, Claudine, Elvire, Marie y GERARD, Catherine, Marie, Ghislaine.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 10-07-07		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 15/06/06	
Fecha de presentación de la solicitud: 08/12/05		N° publicación: WO 2006/061253 A3	
No. de solicitud PCT/EP2005/013409			
(54) Titulo: "COMBINACIÓN DE INHIBIDOR DE TIROSINA CINASA Y HER-2/NEU PARA TERAPIA DE CÁNCER"			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 8:

Una combinación farmacéutica, que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de:

(a) un compuesto de fórmula I, II, III ó IV, y/o sales, solvatos o derivados fisiológicamente funcionales de los mismos, en donde R₁ es Cl o Br; X es CH, N, o CF; y Het es tiazol o furan; y

(b) una composición inmunogénica que comprende la proteína aislada que incluye por lo menos un epítopo de la proteína HER-2/neu, o un polinucleótido que codifica tal proteína.

Relato folio 11 y 12
Tijeras

M

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente VJL/VB61173	PARA FUTURAS ACCIONES ver Notificación o Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/EP2005/013409	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 08/12/2005	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 10/12/2004
Solicitante GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante Según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 7 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo sobre las bases de:

☒ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó.

☐ una traducción de la solicitud internacional a _____ el cual es el lenguaje de la traducción proporcionada para los propósitos de la Búsqueda Internacional (Reglas 12.3 (a) y 23.1(b)).

b. ☒ Respecto a una secuencia de ácido nucleótido y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver Casilla No. 1.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla II).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Casilla III).

4. Respecto al título,

☐ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☒ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lea así:

**COMBINACION DE INHIBIDOR DE TIROSINA CINASA Y HER-2/NEU PARA
TERAPIA DE CANCER**

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro III. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos.

a. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. 12E

☐ como lo sugirió el solicitante.

☒ porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☐ Ninguna de las figuras se publicará con el resumen.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL	Solicitud Internacional No. PCT/EP2005/013409
Casilla No. I. Nucleótido y/o secuencia(s) aminoácida(s) (Continuación del ítem 1.b de la primera hoja)	
1. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según: a. tipo de material: ☒ un listado de secuencia ☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia b. formato de material: ☒ en formato escrito ☒ en formato legible por computador c. tiempo de presentación/suministro: ☐ contenido en la solicitud internacional según se registró ☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador ☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda. 2. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas. 3. Comentarios adicionales:	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/013409

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación		Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 0044899 A			BR 0007840 A	22-01-2002
			CA 2361009 A1	03-08-2000
			CN 1345374 A	17-04-2002
			CZ 20012587 A3	15-05-2002
			EP 1147190 A1	24-10-2001
			HK 1044798 A1	30-12-2005
			HU 0105303 A2	29-05-2002
			JP 2002535004 T	22-10-2002
			MX PA01007721 A	14-07-2003
			NO 20013701 A	28-09-2001
			NZ 513062 A	31-10-2003
			TR 200102191 T2	21-12-2001
			ZA 200106179 A	28-10-2002
WO 2005016347 A	24-02-2005		AU 2004264726 A1	24-02-2005
			CA 2536140 A1	24-02-2005
			EP 1658080 A1	24-05-2006
WO 2005011607 A	10-02-2005		EP 1653986 A2	10-05-2006

13

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL		Solicitud Internacional No. PCT/EP2005/013409
A. CLASIFICACION DE MATERIA INV. A61K39/00 A61K31/517 A61P25/00		
Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI		
B. CAMPOS BUSCADOS		
Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)		
A61K A61P		
Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados		
Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)		
EPO-Interno, WPI Dato, PAJ, búsqueda de Secuencia, CHEM ABS Dato, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	WO 99/35146 A (GLAXO GROUP LIMITED; CARTER MALCOLM, CLIVE; COCKERIL, GEORGE, STUART) 15 de Julio de 1999 (1999-07-15) Citado en la solicitud Ver reivindicaciones 1, 20, 24, página 3 líneas 4-12 Y página 50 1 -----	1-25
X	WO 02/056912 A (GLAXO GROUP LIMITED; LACKEY, KAREN, ELIZABETH; SPECTOR, NEIL; WOOD, ED) 25 de Julio de 2002 (2002-07-25) Ver reivindicaciones 24, 27, página 21 -----	1-12, 15
Y	WO 02/02552 A (GLAXO GROUP LIMITED; MCCLURE, MICHAEL SCOTT,; OSTERHOUT, MARTIN HOWARD) 10 DE Enero de 2002 (2002-01-10) Ver reivindicaciones y resumen ----- --/---	1-25
Y		1-25
☒ En el recuadro C se enumeran más documentos. ☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.		
° Categorías especiales de documentos citados:		
'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular		'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención
'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional		'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo
'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)		'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica
'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios		'&' documento miembro de la misma familia de patentes
'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada		
Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 24 de Julio de 2006		Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 31/08/2006
Nombre y dirección de correo de ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Tx 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Funcionario autorizado Merckling-Ruiz, V

16

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/013409

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	WO 00/44899 A (CORIXA CORPORATION; SMITHKLINE BEECHAM; CHEEVER, MARTIN, A; GHEYSEN, D) 3 de Agosto de 2000 (2000-08-03) Citado en la solicitud Ver el documento completo -----	1-25
P, X	WO 2005/016347 A (PFIZER PRODUCTS INC; BHATTACHARYA, SAMIT, KUMAR; CONNELL, RICHARD, DAM) 24 de Febrero de 2005 (2005-02-24) ver reivindicaciones 1-11 -----	1-12, 15
P, X	WO 2005/011607 A (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION; SPECTOR, NEIL, LEE; XIA, WENLE) 10 de Febrero de 2005 (2005-02-10) Ver resumen y reivindicaciones 23-27 -----	1-12, 15
X	HUANG S. ET AL.: "Direccionamiento molecular de agente dual del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) combinando anticuerpo anti-EGFR con inhibidor de tirosina cinasa" CANCER RES., vol. 64, 1 de Agosto de 2004 (2004-08-01), páginas 5355-5362, XP002391763 -----	1-12, 15
Y	ver resumen, fig. 6 y página 5361 anterior -----	1-25
Y	ESTEVA F. J.: "Anticuerpos monoclonales, moléculas pequeñas y vacunas en el tratamiento del cáncer de seno" THE ONCOLOGIST, Vol. 9 no. Suppl. 3, 2004, páginas 4-9, XP002391764 Ver el documento completo -----	1-25
Y	FORMENTO P ET AL: "Direccionamiento de Her 1-2 dual del cáncer de próstata refractario por hormona mediante ZD1839 y trastuzumab" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, Vol. 40, no. 18, Diciembre de 2004 (2004-12), Páginas 2837-2844, XP004661413 ISSN: 0959-8049 Ver resumen -----	1-25
Y	KO B.K. ET AL.: "Estudios clínicos de vacunas dirigidas al cáncer de seno" CLINICAL CANCER RESEARCH, Vol. 9, 15 de Agosto de 2003 (2003-08-15), páginas 3222-3234, XP002391765 ver páginas 3224-3225 -----	1-25

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/013409

Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron Inescrutables (Continuación del Item 2 de la primera hoja)

Este reporte de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:

Aunque las reivindicaciones 1-7, 13-20 y 25 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda se ha llevado a cabo y con base en los efectos supuestos de la composición.
2. ☐ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. ☐ Reivindicaciones No.:
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Norma 6.4(a).

Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta

- ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.
- ☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

16

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/013409

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda		Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9935146	A	15-07-1999	AP 1446 A AT 322491 T AT 270670 T AU 749549 B2 AU 2278399 A BG 104668 A BR 9906904 A CA 2317589 A1 CN 1292788 A DE 69918528 D1 DE 69918528 T2 EA 2455 B1 EE 200000411 A EP 1047694 A1 ES 2221354 T3 HK 1031883 A1 HR 20000469 A2 HU 0100941 A2 JP 3390741 B2 JP 2002500225 T JP 2002326990 A MA 26596 A1 NO 20003561 A NZ 505456 A OA 11444 A PL 341595 A1 PT 1047694 T SK 10502000 A3 TR 200002015 T2 TW 477788 B UA 66827 C2 US 6727256 B1 ZA 9900172 A	30-09-2005 15-04-2006 15-07-2004 27-06-2002 26-07-1999 30-04-2001 17-10-2000 15-07-1999 25-04-2001 12-08-2004 28-07-2005 25-04-2002 17-12-2001 02-11-2000 16-12-2004 04-03-2005 30-06-2001 28-09-2001 31-03-2003 08-01-2002 15-11-2002 20-12-2004 11-09-2000 30-06-2003 29-04-2004 23-04-2001 30-11-2004 06-08-2001 22-01-2001 01-03-2002 15-12-2000 27-04-2004 11-07-2000
WO 02056912	A	25-07-2002	AT 290882 T DE 60203260 D1 DE 60203260 T2 EP 1353693 A2 ES 2236481 T3 JP 2004523522 T US 2004053946 A1	15-04-2005 21-04-2005 02-02-2006 22-10-2003 16-07-2005 05-08-2004 18-03-2004
WO 0202552	A	10-01-2002	AU 7307101 A BR 0111947 A CA 2413134 A1 CN 1440403 A CN 1636992 A CZ 20024223 A3 EP 1294715 A1 HU 0303022 A2 JP 2004502687 T MX PA02012681 A NO 20026196 A NZ 522989 A PL 365637 A1	14-01-2002 06-05-2003 10-01-2002 03-09-2003 13-07-2005 14-05-2003 26-03-2003 29-12-2003 29-01-2004 25-04-2003 24-02-2003 24-06-2005 10-01-2005
WO 0044899	A	03-08-2000	AU 780109 B2 AU 2742600 A	03-03-2005 18-08-2000

18

12

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/013409

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 0044899 A		BR 0007840 A CA 2361009 A1 CN 1345374 A CZ 20012587 A3 EP 1147190 A1 HK 1044798 A1 HU 0105303 A2 JP 2002535004 T MX PA01007721 A NO 20013701 A NZ 513062 A TR 200102191 T2 ZA 200106179 A	22-01-2002 03-08-2000 17-04-2002 15-05-2002 24-10-2001 30-12-2005 29-05-2002 22-10-2002 14-07-2003 28-09-2001 31-10-2003 21-12-2001 28-10-2002
WO 2005016347 A	24-02-2005	AU 2004264726 A1 CA 2536140 A1 EP 1658080 A1	24-02-2005 24-02-2005 24-05-2006
WO 2005011607 A	10-02-2005	EP 1653986 A2	10-05-2006

19

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference VJL/VB61173	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2005/013409	International filing date (day/month/year) 08/12/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 10/12/2004
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

COMBINATION OF TYROSINE KINASE INHIBITOR AND HER-2/NEU FOR CANCER THERAPY

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 12E
☐ as suggested by the applicant
☒ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/013409

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of: a. type of material ☒ a sequence listing ☐ table(s) related to the sequence listing b. format of material ☒ on paper ☒ in electronic form c. time of filing/furnishing ☐ contained in the International application as filed ☐ filed together with the international application in electronic form ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/013409

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00 A61K31/517 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, Sequence Search, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/35146 A (GLAXO GROUP LIMITED; CARTER, MALCOLM, CLIVE; COCKERILL, GEORGE, STUART) 15 July 1999 (1999-07-15) cited in the application see claims 1, 20, 24, page 3 lines 4-12 and page 50 1	1-25
X	WO 02/056912 A (GLAXO GROUP LIMITED; LACEY, KAREN, ELIZABETH; SPECTOR, NEIL; WOOD, ED) 25 July 2002 (2002-07-25) see claims 24,27, page 21	1-12,15
Y		1-25
Y	WO 02/02552 A (GLAXO GROUP LIMITED; MCCLURE, MICHAEL SCOTT,; OSTERHOUT, MARTIN HOWARD) 10 January 2002 (2002-01-10) se claims and asbtract	1-25
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents.

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 July 2006

Date of mailing of the international search report

31/08/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Merckling-Ruiz, V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/013409

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/44899 A (CORIXA CORPORATION; SMITHKLINE BEECHAM; CHEEVER, MARTIN, A; GHEYSEN, D) 3 August 2000 (2000-08-03) cited in the application see the whole document	1-25
P,X	WO 2005/016347 A (PFIZER PRODUCTS INC; BHATTACHARYA, SAMIT, KUMAR; CONNELL, RICHARD, DAM) 24 February 2005 (2005-02-24) see claims 1-11	1-12,15
P,X	WO 2005/011607 A (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION; SPECTOR, NEIL, LEE; XIA, WENLE) 10 February 2005 (2005-02-10) see abstract and claims 23-27	1-12,15
X	HUANG S. ET AL.: "Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR) combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor" CANCER RES., vol. 64, 1 August 2004 (2004-08-01), pages 5355-5362, XP002391763	1-12,15
Y	see abstract, fig.6 and page 5361 last	1-25
Y	ESTEVA F.J.: "Monoclonal antibodies, small molecules and vaccines in the treatment of breast cancer." THE ONCOLOGIST, vol. 9, no. Suppl.3, 2004, pages 4-9, XP002391764 see the whole document	1-25
Y	FORMENTO P ET AL: "Dual HER 1-2 targeting of hormone-refractory prostate cancer by ZD1839 and trastuzumab" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 40, no. 18, December 2004 (2004-12), pages 2837-2844, XP004661413 ISSN: 0959-8049 see abstract	1-25
Y	KØ B.K. ET AL.: "Clinical studies of vaccines targeting breast cancer." CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 9, 15 August 2003 (2003-08-15), pages 3222-3234, XP002391765 see pages 3224-3225	1-25

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2003)

page 2 of 2

22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/013409

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-7,13-20 and 25 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/013409

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9935146	A	15-07-1999	AP 1446 A	30-09-2005
			AT 322491 T	15-04-2006
			AT 270670 T	15-07-2004
			AU 749549 B2	27-06-2002
			AU 2278399 A	26-07-1999
			BG 104668 A	30-04-2001
			BR 9906904 A	17-10-2000
			CA 2317589 A1	15-07-1999
			CN 1292788 A	25-04-2001
			DE 69918528 D1	12-08-2004
			DE 69918528 T2	28-07-2005
			EA 2455 B1	25-04-2002
			EE 200000411 A	17-12-2001
			EP 1047694 A1	02-11-2000
			ES 2221354 T3	16-12-2004
			HK 1031883 A1	04-03-2005
			HR 20000469 A2	30-06-2001
			HU 0100941 A2	28-09-2001
			JP 3390741 B2	31-03-2003
			JP 2002500225 T	08-01-2002
			JP 2002326990 A	15-11-2002
			MA 26596 A1	20-12-2004
			NO 20003561 A	11-09-2000
			NZ 505456 A	30-06-2003
			OA 11444 A	29-04-2004
			PL 341595 A1	23-04-2001
			PT 1047694 T	30-11-2004
			SK 10502000 A3	06-08-2001
			TR 200002015 T2	22-01-2001
			TW 477788 B	01-03-2002
			UA 66827 C2	15-12-2000
			US 6727256 B1	27-04-2004
			ZA 9900172 A	11-07-2000
WO 02056912	A	25-07-2002	AT 290882 T	15-04-2005
			DE 60203260 D1	21-04-2005
			DE 60203260 T2	02-02-2006
			EP 1353693 A2	22-10-2003
			ES 2236481 T3	16-07-2005
			JP 2004523522 T	05-08-2004
			US 2004053946 A1	18-03-2004
WO 0202552	A	10-01-2002	AU 7307101 A	14-01-2002
			BR 0111947 A	06-05-2003
			CA 2413134 A1	10-01-2002
			CN 1440403 A	03-09-2003
			CN 1636992 A	13-07-2005
			CZ 20024223 A3	14-05-2003
			EP 1294715 A1	26-03-2003
			HU 0303022 A2	29-12-2003
			JP 2004502687 T	29-01-2004
			MX PA02012681 A	25-04-2003
			NO 20026196 A	24-02-2003
			NZ 522989 A	24-06-2005
			PL 365637 A1	10-01-2005
WO 0044899	A	03-08-2000	AU 780109 B2	03-03-2005
			AU 2742600 A	18-08-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2005/013409

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0044899	A	BR 0007840 A CA 2361009 A1 CN 1345374 A CZ 20012587 A3 EP 1147190 A1 HK 1044798 A1 HU 0105303 A2 JP 2002535004 T MX PA01007721 A NO 20013701 A NZ 513062 A TR 200102191 T2 ZA 200106179 A	22-01-2002 03-08-2000 17-04-2002 15-05-2002 24-10-2001 30-12-2005 29-05-2002 22-10-2002 14-07-2003 28-09-2001 31-10-2003 21-12-2001 28-10-2002
WO 2005016347	A	24-02-2005 AU 2004264726 A1 CA 2536140 A1 EP 1658080 A1	24-02-2005 24-02-2005 24-05-2006
WO 2005011607	A	10-02-2005 EP 1653986 A2	10-05-2006

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación
15 de Junio de 2006 (15.06.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/061253 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷:

A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2005/013409

(22) Fecha de Registro Internacional: Diciembre 8 de 2005 (08.12.2005)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:

0427131.8 Diciembre 10 de 2004 (10.12.2004) GB

(71) Solicitante: (Para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): GLAXO SMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut, 89, B-1330 Rixensart (BE).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): BRUCK, Claudine, Elvire, Marie [LU/US]; GlaxoSmithKline, 709 Swedeland Road King of Prussia, PA 19406 (US). GERARD, Catherine, Marie, Ghislaine [BE/BE]; GlaxoSmithKline, Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(74) Agente: LOVATT, Victoria, Jayne; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property, (CN925.1), 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario para cada tipo de protección nacional 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiatica (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).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- en cuanto a la facultad del solicitante para aplicar y obtener una patente (Regla 4.17 (ii))
- relativo al derecho del solicitante de reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17 (iii))
- de la calidad de inventor (Regla 4.17 (iv))

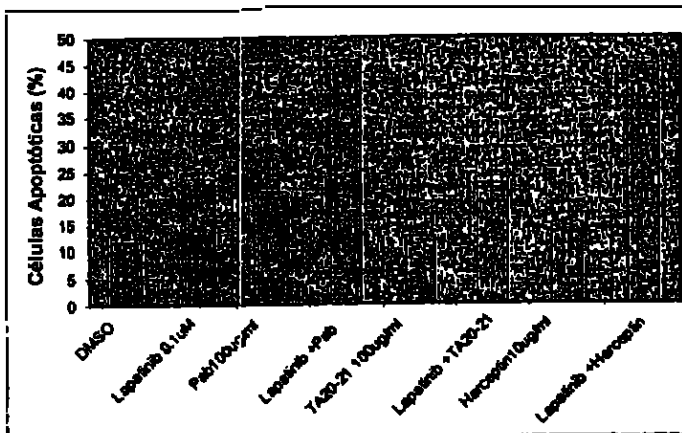
Publicado:

- con reporte de búsqueda internacional

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional:
16 de Noviembre de 2006

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: "COMBINACION DE INHIBIDOR DE TIROSINA CINASA Y HER-2/NEU PARA TERAPIA DE CANCER"



(57) Resumen: Se describe un método para tratar el cáncer que comprende la administración de una 4-quinazolinamina y una vacuna que trata la molécula HER-2/neu, así como una combinación farmacéutica que comprende 4-quinazolinaminas y una vacuna que trata la molécula HER-2/neu.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 June 2006 (15.06.2006)

(10) International Publication Number
WO 2006/061253 A3

(51) International Patent Classification:

~~A61K~~ 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2005/013409

(22) International Filing Date:

8 December 2005 (08.12.2005)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

0427131.8 10 December 2004 (10.12.2004) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): GLAXO-SMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut, 89, B-1330 Rixensart (BE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BRUCK, Claudine, Elvire, Marie [LU/US]; GlaxoSmithKline, 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406 (US). GERARD, Catherine, Marie, Ghislaine [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(74) Agent: LOVATT, Victoria, Jayne; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property, (CN925.1), 980 Great West Road, Brentford, Middlesex, TW8 9GS (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

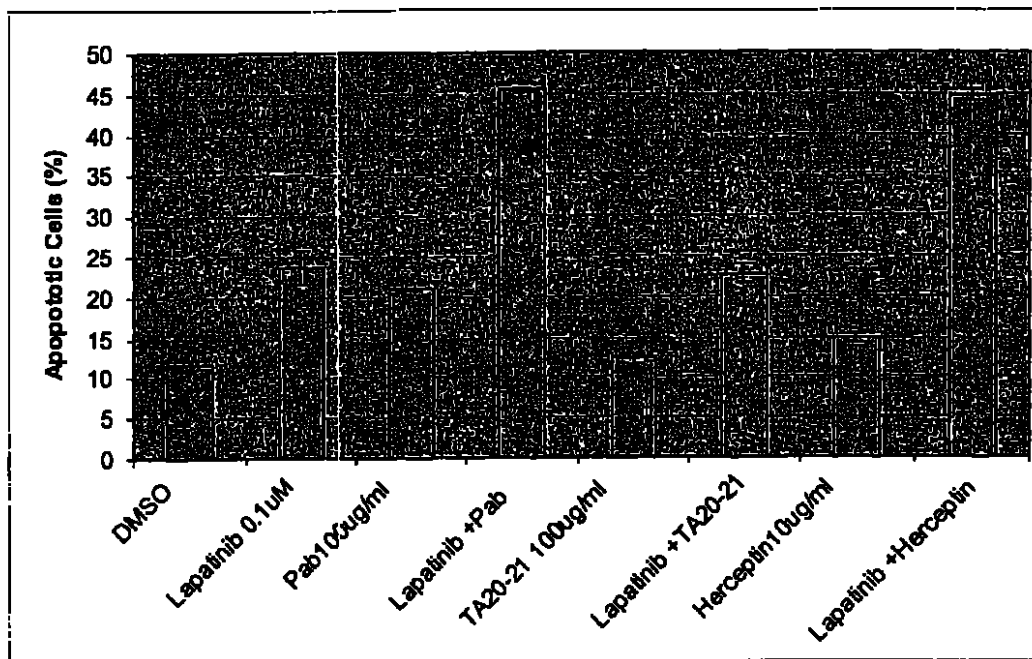
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, 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).

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

[Continued on next page]

(54) Title: COMBINATION OF TYROSINE KINASE INHIBITOR AND HER-2/NEU FOR CANCER THERAPY



(57) Abstract: A method of treating cancer is described comprising administration of a 4quinazolineamine and a vaccine targeting the HER-2/neu molecule, as well as a pharmaceutical combination comprising 4-quinazolineamines and a vaccine targeting the HER-2/neu molecule.

WO 2006/061253 A3

P

- *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*
- *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

(88) Date of publication of the international search report:
16 November 2006

Published:

- with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para: Ver forma PCT/ISA/220	PCT OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43bis.1)																									
	Fecha de envío por correo (día/mes/año) 25 de Abril de 2005																									
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220	PARA FUTURAS ACCIONES Ver párrafo 2 a continuación																									
Solicitud Internacional No. PCT/EP2005/013409	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 08.12.2005	Fecha de prioridad (día/mes/año) 10.12.2004																								
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC INV. A61K39/00 A61K31/517 A61P35/00																										
Solicitante GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.																										
1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table><tr><td>☒</td><td>Casilla No. I</td><td>Bases de la opinión</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. II</td><td>Prioridad</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. III</td><td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. IV</td><td>Falta de unidad de invención</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. V</td><td>Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No. VI</td><td>Ciertos documentos citados</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. VII</td><td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No. VIII</td><td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td></tr></table> 2. ACCIONES FUTURAS Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional. Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde. Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220. 3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.			☒	Casilla No. I	Bases de la opinión	☐	Casilla No. II	Prioridad	☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial	☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención	☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación	☒	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados	☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional
☒	Casilla No. I	Bases de la opinión																								
☐	Casilla No. II	Prioridad																								
☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial																								
☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención																								
☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación																								
☒	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados																								
☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																								
☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																								
Nombre y dirección de correo de la ISA European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399-4465	Fecha de terminación de esta opinión Ver forma PCT/ISA/210	Funcionario Autorizado Merckling-Ruiz, V Teléfono No. +49 89 2399-8590																								

OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/013409

Casilla No. I. Bases de la opinión

1. Respecto al lenguaje, esta opinión se llevó a cabo sobre las bases de:

- ☒ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó.
☐ una traducción de la solicitud internacional a ----- el cual es el lenguaje de la traducción proporcionada para los propósitos de la Búsqueda Internacional (Reglas 12.3 (a) y 23.1(b)).

2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:

a. tipo de material:

- ☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

- ☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☐ contenido en la solicitud internacional según se registró.
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..

3. ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

4. Comentarios adicionales:

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un nivel inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 1-7, 13-20, 25

porque:

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 1-7, 13-20, 25 sólo se relacionan con la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):

ver hoja separada

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) de dichas reivindicaciones Nos. son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*):

☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa.

☒ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos. 1-7, 13-20, 25

☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin el listado de secuencia, el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no:

☐ suministró un listado de secuencias en papel para cumplir con el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicho listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.

☐ suministró un listado de secuencias en formato electrónico para cumplir en el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas y tal listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.

☐ pagó la tarifa de suministro tardío para el suministro de un listado de secuencia en respuesta a una invitación de acuerdo con las Reglas 13ter.1(a) o (b).

☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con los listados de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no suministró dichas tablas en formato electrónico para cumplir con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas y dichas tablas no estuvieron disponibles para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.

☐ las tablas que se relacionan con el listado de secuencias de aminoácidos y/o nucleótidos, si están solamente en formato electrónico, no cumplen con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

☐ Ver hoja separada para detalles adicionales

Casilla No. V. Afirmación razonada bajo la Regla 66.2(a)(ii) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Declaración
- Novedad (N)

Si: Reivindicaciones 13-14, 16-25
No: Reivindicaciones 1-12, 15
- Nivel Inventivo (IS)

Si: Reivindicaciones
No: Reivindicaciones 1-25
- Aplicabilidad Industrial (IA)

Si: Reivindicaciones 8-12, 21-24 (SI) 1-7, 13-20, 25 ver hoja separada
No: Reivindicaciones
2. Citaciones y explicaciones
- ver hoja separada

Casilla No. VI Ciertos documentos citados

1. Ciertos documentos publicados (Reglas 43bis 1 y 70.10)
y/o
2. Revelaciones no-escritas (Reglas 43bis.1 y 70.9)

Ver forma 210

1. Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: WO 99/35146 A (GLAXO GROUP LIMITED; CARTER, MALCOLM, CLIVE; COCKERILL, GEORGE, STUART) 15 de julio de 1999 (1999-07-15) citado en la solicitud
- D2: WO 02/056912 A (GLAXO GROUP LIMITED; LACKEY, KAREN, ELIZABETH; SPECTOR, NEIL; WOOD, ED) 25 de julio de 2002 (2002-07-25)
- D3: WO 02/02552 A (GLAXO GROUP LIMITED; MCCLURE, MICHAEL SCOTT; OSTERHOUT, MARTIN HOWARD) 10 de enero de 2002 (2002-01-10)
- D4: WO 00/44899 A (CORIXA CORPORATION; SMITHKLINE BEECHAM; CHEEVER, MARTIN, A; GHEYSEN, D) 3 de agosto de 2000 (2000-08-03) citado en la solicitud
- D5: WO 2005/016347 A (PFIZER PRODUCTS INC; BHATTACHARYA, SAMIT, KUMAR; CONNELL, RICHARD, DAM) 24 de febrero de 2005 (2005-02-24), doc P
- D6: WO 2005/011607 A (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION; SPECTOR, NEIL, LEE; XIA, WENLE) 10 de febrero de 2005 (2005-02-10) doc P
- D7: HUANG S. ET AL: "Direccionamiento molecular de agente dual del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) combinando anticuerpo anti-EGFR con inhibidor de tirosina cinasa" CANCER RES., vol. 64, 1 de agosto de 2004 (2004-08-01), páginas 5355-5362, XP002391763
- D8: ESTEVA F.J.: "Anticuerpos monoclonales, moléculas pequeñas y vacunas en el tratamiento del cáncer de seno" THE ONCOLOGIST, vol. 9, no. Suppl. 3, 2004, páginas 4-9, XP002391764
- D9: FORMENTO P ET AL: "Direccionamiento de Her 1-2 dual del cáncer de próstata refractario por hormona mediante ZD1839 y trastuzumab" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 40, no. 18, diciembre de 2004 (2004-12), páginas 2837-2844, XP004661413 ISSN: 0959-8049
- D10: KO B.K. ET AL: "Estudios clínicos de vacunas dirigidas al cáncer de seno" CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 9, 15 de agosto de 2003 (2003-08-15), páginas 3222-3234, XP002391765

En relación al punto III

OPINION ESCRITA DE LA

AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
(HOJA SEPARADA)

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2005/013409

2. Las reivindicaciones 1-7, 13-20, 25 se relacionan con la materia objeto que esta Autoridad considera que está cubierta por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) PCT).

En relación al punto V

3. Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 1-7, 13-20, 25 sobre la pregunta de si son aplicables industrialmente, no existen criterios unificados en los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como aplicable industrialmente la materia objeto de las reivindicaciones en cuanto al uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo, reivindicaciones a un compuesto conocido para primer uso en el tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la elaboración de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.
4. D2 y D7 ambos revelan el uso de compuesto definido como (a) en la reivindicación 1 en combinación con un anticuerpo anti-Her-2/neu para tratar el cáncer. Las reivindicaciones 1-12 y 15 no son novedosas.
- 4.1 No hay combinación en la técnica anterior de un compuesto definido en (a) con una proteína de fusión de un dominio ECD de Her-2/neu como se reivindica en las reivindicaciones 13-14 y 25.
- No se revela tampoco el uso de (a) en combinación con un oligonucleótido según se define en la reivindicación 22.
- Finalmente, no se anticipa la formulación específica (a) y (b) según se define en la reivindicación 1, que además comprende adyuvantes o formulación según se enumera en las reivindicaciones 16-21 y 23-24.
5. El problema técnico implícito en la solicitud es proveer una terapia alternativa, mejorada contra el cáncer.
- D7 es considerado la técnica anterior más cercana. En D7, se muestra que la combinación de (a) gefitinib o erlotinib, con (b) cetuximab (también llamado Erbitux o C225, que Es un anticuerpo monoclonal anti-Her-2Quimerizado) tiene un efecto sinérgico sobre el

crecimiento de tumores en ratones (ver la fig. 6).

D4 revela el uso de proteínas de fusión Her-2/neu (100% de identidad con las Seq. 17 y 18 de la solicitud) para producir una respuesta inmune contra el cáncer. Se describen varias proteínas de fusión, que comprenden proteínas de fusión EC-PD, EC-ΔPD y EC-ICD, que tienen la misma secuencia que en la solicitud. Su formulación (aceite en agua, etc...) y adyuvantes a dichas proteínas son exactamente iguales que en la presente solicitud.

D10 revela también el uso de epitopes Her-2/neu para vacunar pacientes contra el cáncer.

La materia objeto de las reivindicaciones 13-14 y 16-25 es obvia sobre la combinación de D7 con D4 o D10. Aunque D7 no sugiere el uso de una combinación de un compuesto (a) con un péptido HER-2/neu en lugar de usar (a) en combinación con un anticuerpo anti-Her-2, debe hacerse énfasis en que la presente solicitud no muestra ningún ejemplo real de una combinación de (a) y un péptido según se reivindica en la reivindicación 1. Los ejemplos de la solicitud están dirigidos a las combinaciones de :

(a) lapatinib, y

(b) trastuzumab (= Herceptin) o un anticuerpo de conejo policlonal contra el Her-2/neu.

En conclusión, no se ha demostrado ningún efecto técnico para una combinación de un compuesto (a) con un péptido Her-2/neu. No puede reconocerse nivel inventivo.

Además, D8 muestra que la combinación de un compuesto (a) gefitinib con (b) tratuzumab tiene un efecto negativo sobre los cánceres de próstata en comparación con la monoterapia. Esto muestra que todas las terapias de combinación no muestran un efecto técnico mejorado sobre todos los tipos de cánceres. Dado que todos los experimentos de la presente solicitud se han llevado a cabo sobre células de cáncer de seno, hay razones para dudar que pueda esperarse el "efecto sinérgico" de una terapia de combinación para todos los tipos de cánceres, según se reivindica en la reivindicación 1. Por esta razón también, las reivindicaciones no son inventivas.

En relación al punto VI

5. D5 y D6 no son considerados como parte de la técnica anterior en la fase internacional. Sin embargo, estos documentos podrían tomarse en cuenta para evaluar la novedad en la fase regional en algunos países tales como los países EPC.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2005/013409

International filing date (day/month/year)
08.12.2005

Priority date (day/month/year)
10.12.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/00 A61K31/517 A61P35/00

Applicant
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 65.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Merckling-Ruiz, V

Telephone No. +49 89 2399-8590



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2005/013409

Box No. I	Basis of the opinion
1.	With regard to the language, this opinion has been established on the basis of: ☒ the international application in the language in which it was filed ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of: a. type of material: ☒ a sequence listing ☐ table(s) related to the sequence listing b. format of material: ☒ on paper ☒ in electronic form c. time of filing/furnishing: ☐ contained in the international application as filed. ☐ filed together with the international application in electronic form. ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3.	☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4.	Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

37
International application No.
PCT/EP2005/013409

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and Industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 1-7,13-20,25

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-7,13-20,25 relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 1-7,13-20,25

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing: the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings: the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/EP2005/013409

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	13-14,16-25
	No: Claims	1-12,15
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-25
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	8-12,21-24 (YES) 1-7,13-20,25 see separate sheet
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and /or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2005/013409

1. Reference is made to the following documents :

- D1: WO 99/35146 A (GLAXO GROUP LIMITED; CARTER, MALCOLM, CLIVE; COCKERILL, GEORGE, STUART) 15 July 1999 (1999-07-15) cited in the application
- D2: WO 02/056912 A (GLAXO GROUP LIMITED; LACKEY, KAREN, ELIZABETH; SPECTOR, NEIL; WOOD, ED) 25 July 2002 (2002-07-25)
- D3: WO 02/02552 A (GLAXO GROUP LIMITED; MCCLURE, MICHAEL SCOTT,; OSTERHOUT, MARTIN HOWARD) 10 January 2002 (2002-01-10)
- D4: WO 00/44899 A (CORIXA CORPORATION; SMITHKLINE BEECHAM; CHEEVER, MARTIN, A; GHEYSEN, D) 3 August 2000 (2000-08-03) cited in the application
- D5: WO 2005/016347 A (PFIZER PRODUCTS INC; BHATTACHARYA, SAMIT, KUMAR; CONNELL, RICHARD, DAM) 24 February 2005 (2005-02-24), P doc
- D6: WO 2005/011607 A (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION; SPECTOR, NEIL, LEE; XIA, WENLE) 10 February 2005 (2005-02-10), P doc
- D7: HUANG S. ET AL.: "Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR) combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor" CANCER RES., vol. 64, 1 August 2004 (2004-08-01), pages 5355-5362, XP002391763
- D8: ESTEVA F.J.: "Monoclonal antibodies, small molecules and vaccines in the treatment of breast cancer." THE ONCOLOGIST, vol. 9, no. Suppl.3, 2004, pages 4-9, XP002391764
- D9: FORMENTO P ET AL: "Dual HER 1-2 targeting of hormone-refractory prostate cancer by ZD1839 and trastuzumab" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 40, no. 18, December 2004 (2004-12), pages 2837-2844, XP004661413 ISSN: 0959-8049
- D10: KO B.K. ET AL.: "Clinical studies of vaccines targeting breast cancer." CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 9, 15 August 2003 (2003-08-15), pages 3222-3234, XP002391765

Regarding point III

2. Claims 1-7,13-20,25 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Regarding point V

3. For the assessment of the present claims 1-7,13-20,25 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.
4. D2 and D7 both disclose the use of a compound defined as (a) in claim 1 in combination with an anti-Her-2/neu antibody for treating cancer. Claims 1-12 and 15 are not novel.
- 4.1 There is no combination in the prior art of a compound defined as in (a) with a fusion protein of an ECD domain of Her-2/neu as claimed in claims 13-14 and 25. The use of (a) in combination with an oligonucleotide as defined in claim 22 is not disclosed either. Finally, the specific formulation (a) and (b) as defined in claim 1, further comprising specific adjuvants or formulation as recited in claims 16-21 and 23-24 is not anticipated.
5. The technical problem underlying the application is to provide an alternative, improved cancer therapy. D7 is considered as the closest prior art. In D7, the combination of (a) gefitinib or erlotinib, with (b) cetuximab (also called Erbitux or C225, which is a chimerized anti-Her-2 monoclonal antibody) is shown to have a synergistic effect on tumor growth in mice

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2005/013409

(see fig.6).

D4 discloses the use of Her-2/neu fusion proteins (100% identity with Seq.17 and 18 of the application) for eliciting an anticancer immune response. Various fusion proteins are described, comprising EC-PD, EC-ΔPD and EC-ICD fusion proteins, all having the same sequences as in the application. Their formulation (oil in water etc...) and adjuvants to said proteins are exactly the same as in the present application.

D10 also discloses the use of Her-2/neu epitopes for vaccination patients against cancer.

The subject-matter of claims 13-14 and 16-25 is obvious over the combination of D7 with either D4 or D10. Although D7 does not suggest to use a combination of a compound (a) with a HER-2/neu peptide instead of using (a) in combination with an anti-Her-2 antibody, it should be emphasized that the present application does not show any real example of a combination of (a) and a peptide as claimed in claim 1. The examples of the application are directed to the combinations of :

(a) lapatinib, and

(b) trastuzumab (= Herceptin) or a polyclonal rabbit antibody against Her-2/neu.

In conclusion, no technical effect has been demonstrated for a combination of a compound (a) with a Her-2/neu peptide. Inventive step cannot be acknowledged.

In addition, D8 shows that the combination of a compound (a) gefitinib with (b) trastuzumab has a negative effect on some prostate cancers in comparison with monotherapy. This shows that all combination therapies do not exhibit an improved technical effect on all types of cancers. Given that all experiments of the present application have been carried out on breast cancer cells, there are reasons to doubt that the "synergistic effect" of a combination therapy can be expected for all types of cancers, as claimed in claim 1. For this reason also, the claims are not inventive.

Regarding point VI

5. D5 and D6 are not regarded as part of the prior art in the international phase. However, these documents could be taken into account for assessing novelty in the regional phase in some countries such as EPC countries.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.
PCT/EP2005/013409

**COMBINACION DE INHIBIDOR DE TIROSINA CINASA Y
HER-2/NEU PARA TERAPIA DE CANCER**

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

Se describe un método para tratar el cáncer que comprende la administración de una 4-quinazolinamina y una vacuna que trata la molécula HER-2/neu, así como una combinación farmacéutica que comprende 4-quinazolinaminas y una vacuna que trata la molécula HER-2/neu.

10

15

20

25

COMBINACION DE INHIBIDOR DE TIROSINA CINASA Y
HER-2/NEU PARA TERAPIA DE CANCER

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a una combinación de (a)
un derivado de quinazolina, el cual es un inhibidor del receptor 2
del factor de crecimiento epidérmico humano de tirosina cinasa
(también conocido como HER-2/neu o c-erbB2) y del receptor del
factor de crecimiento epidérmico (también conocido como EGFR o
10 c-erbB1), y (b) una composición inmunogénica dirigida a la
molécula HER-2. La combinación se puede utilizar en el
tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la Invención

15 Las tirosina cinasas de proteína catalizan la fosforilación de
los residuos de tirosilo específicos en varias proteínas implicadas
en la regulación del crecimiento celular y en la diferenciación.
HER-2/neu y EGFR son ejemplos de tirosina cinasas de proteína.
Los ejemplos de inhibidores de tirosina cinasas de proteína
particulares se proporcionan en, por ejemplo, el documento
20 WO99/35146 (US2002 177567), incorporado en la presente por
referencia.

25 EGFR es una glicoproteína de transmembrana de cadena
sencilla de 170-kDa que consiste de un dominio catalítico
intracelular que posee la actividad de tirosina cinasa, un dominio
periférico de membrana de fijación y una región de unión de

ligando extracelular.

HER-2/neu es un miembro de la familia del receptor de factor de crecimiento epidérmico, una familia de los receptores de tirosina cinasa. Los ejemplos de vacunas o composiciones
5 inmunogénicas dirigidas a la molécula de HER-2/neu se han descrito en, por ejemplo, el documento WO00/44899 (US2002 177567) incorporado en la presente por referencia.

HER-2/neu es una proteína de transmembrana con una masa molecular relativa prevista de 185 kD que es de aproximadamente
10 1255 aminoácidos de longitud. HER-2/neu tiene un dominio extracelular (ECD, por sus siglas en ingles) de aproximadamente 645 aminoácidos, un dominio de transmembrana altamente hidrofóbico, y un dominio intracelular carboxi terminal (ICD, por sus siglas en ingles) de aproximadamente 580 aminoácidos. El
15 término "PD" representa el "dominio de fosforilación" (es decir, el dominio que es fosforilado) dentro del dominio intracelular, "ΔPD" se refiere a un fragmento particular del dominio de fosforilación que está dentro del dominio de fosforilación (según lo mostrado en la SEC ID NO: 16), y "KD" se refiere al dominio de cinasa que
20 está dentro del dominio intracelular. El PD de HER-2/neu es de 268 aminoácidos de longitud, es intracelular, y se puede fosforilar mediante las tirosina cinasas de proteína.

El gen HER-2/neu es amplificado y la proteína está sobre-
expresada en aproximadamente 30% de los pacientes con cáncer
25 de seno. La sobre-expresión de HER-2/neu se ha descrito en una

variedad de diferentes enfermedades incluyendo de seno, ovario, célula renal, próstata, páncreas, colón, pulmón de célula no pequeña, gástrica, glándula salival, vejiga y célula escamosa oral. En pacientes con cáncer de seno, la sobre-expresión de
5 HER-2/neu es un factor de pronóstico pobre y parece ser un pronóstico de resistencia a algunos agentes quimioterapéuticos.

Se ha mostrado que las vacunas con HER-2/neu basadas en el ADN de HER-2/neu y péptidos de Her2 inducen la inmunidad de células T a HER-2/neu en modelos animales y en ensayos con
10 vacunas en humanos. Además, Trastuzumab (Herceptin®, se encontró que un anticuerpo monoclonal humanizado a HER-2/neu es encontrado efectivo para el tratamiento del cáncer de seno metastático.

Breve Descripción de la Invención

15 En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tratar el cáncer en un mamífero, que comprende: administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de

(a) un compuesto de fórmula I, II, III o IV según lo descrito
20 en la presente, y/o sales, solvatos o derivados fisiológicamente funcionales de los mismos, en donde R₁ es Cl o Br; X es CH, N, o CF; y Het es tiazol o furan; y

(b) una composición inmunogénica que comprende la proteína aislada que incluye por lo menos un epítipo de la
25 proteína HER-2/neu, o un polinucleótido que codifica tal proteína.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación farmacéutica, que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de:

(a) un compuesto de fórmula I, II, III ó IV según lo descrito en la presente, y/o sales, solvatos o derivados fisiológicamente funcionales de los mismos, en donde R₁ es Cl o Br; X es CH, N, o CF; y Het es tiazol o furan; y

(b) una composición inmunogénica que comprende la proteína aislada que incluye por lo menos un epítipo de la proteína HER-2/neu, o un polinucleótido que codifica tal proteína.

En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una combinación farmacéutica según lo descrito en la presente en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una combinación farmacéutica que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de un compuesto de fórmula I, II, II ó IV según lo descrito en la presente y/o sales, solvatos o derivados fisiológicamente funcionales de los mismos en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un individuo, en donde se ha administrado al individuo una composición inmunogénica que comprende por lo menos un epítipo de la proteína HER-2/neu, o un polinucleótido que codifica tal proteína, según lo descrito en la presente.

Asombrosamente, los inventores han encontrado que la combinación del componente (a) de la presente invención, junto con la administración de sueros obtenido después de la inmunización con una composición inmunogénica (b) de la presente invención, resultó en la inhibición del crecimiento de células cancerígenas de seno. Este efecto sinérgico de los dos componentes fue mucho más prominente que la inhibición mostrada con solamente el tratamiento con el agente.

Breve Descripción de las Figuras

La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la proteína HER-2/neu humana (SEC ID NO: 12).

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la proteína HER-2/neu de rata (SEC ID NO: 13). El dominio de cinasa incluso rodea la región de aminoácidos 721 a aminoácido 998.

La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína HER-2/neu extracelular (SEC ID NO: 14).

La figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio de fosforilación (PD) de la proteína HER-2/neu humana (SEC ID NO: 15).

La figura 5 muestra un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de una porción del dominio de fosforilación (Δ PD) de la proteína HER-2/neu humana (SEC ID NO: 16).

La figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular (ECD) y

el dominio de fosforilación (PD) de la proteína HER-2/neu humana (SEC ID NO: 17).

La figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular (ECD) y una porción ejemplar del dominio de fosforilación (Δ PD) de la proteína HER-2/neu humana (SEC ID NO: 18).

La figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular (ECD) de la proteína HER-2/neu de rata (SEC ID NO: 19).

La figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos de longitud completa (SEC ID NO: 20) de una molécula de ADN que codifica la proteína HER-2/neu humana. La secuencia de nucleótidos de longitud completa se describe en el documento WO 96/30514 (US 5,726,023) y las proteínas de fusión se describen en el documento WO00/44899 (US2002/0177567), cuyas descripciones son incorporadas en su totalidad por referencia en la presente.

La figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos de longitud completa (SEC ID NO: 21) de una molécula de ADN que codifica la proteína HER-2/neu de rata. Ésta secuencia de nucleótidos de longitud completa es descrita por Bargmann y col. (1986) Nature, 319:226-30, y GENBANK/X03362, cuyas descripciones son incorporadas en su totalidad por referencia en la presente.

La figura 11A muestra el efecto anti-proliferativo de los anticuerpos policlonales anti-HER2/neu en combinación con Lapatinib en la proliferación de las células cancerígenas de seno

BT474 humanas.

La figura 11B muestra efecto anti-proliferativo de los anticuerpos policlonales anti-HER2/neu en combinación con Lapatinib en la proliferación de células cancerígenas de seno
5 SKBR3 humanas.

La figura 12A (panel superior) muestra los resultados de tratar exponencialmente las células BT474 de crecimiento con (i) DMSO solo (control negativo para lapatinib), (ii) lapatinib (0.1 μ M), (iii) pAb (100 μ g/ml), (iv) lapatinib (0.1 μ M) y pAb (100
10 μ g/ml), (v) TA2021 (100 μ g/ml), (vi) lapatinib (0.1 μ M) y TA2021 (100 μ g/ml), (vii) trastuzumab (10 μ g/ml), o (viii) lapatinib (0.1 μ M) y trastuzumab (10 μ g/ml). Después de 72 horas, se determinó la apoptosis usando la manchado Annexin V y la citometría de flujo.

15 También se determinaron los niveles de proteína en estado estacionario de fosfo-ErbB2 activado (p-ErbB2), ErbB2 total, y survivina después de 72 horas usando la técnica Western Blot (panel inferior, donde la línea 1 es DMSO solo; la línea 2 es lapatinib (0.1 μ M); línea 3 es pAb (100 μ g/ml); línea 4 es lapatinib
20 (0.1 μ M) y pAb (100 μ g/ml); línea 5 es TA2021 (100 μ g/ml); línea 6 es lapatinib (0.1 μ M) y TA2021(100 μ g/ml); línea 7 es trastuzumab (10 μ g/ml); y la línea 8 es lapatinib (0.1 μ M) y trastuzumab (10 μ g/ml). Los niveles de la proteína actina en estado estacionario sirvieron como control para la carga igual de
25 proteína. Las células BT474 tratadas con el vehículo (DMSO) o

TA2021 sirvieron como controles para lapatinib y pAb, respectivamente.

La figura 12B muestra los efectos de las condiciones de tratamiento específicas en el crecimiento de células BT474 (después de 72 horas) usando la microscopia de fase de contraste. Las condiciones de tratamiento incluyen las descritas de acuerdo a la figura 12A, y adicionalmente, gefitinib (Iressa) (0.1 μ M); gefitinib (0.1 μ M) y pAB (100 μ g/ml); gefitinib (0.1 μ M) y TA2021 (100 μ g/ml); y gefitinib (0.1 μ M) y trastuzumab (10 μ g/ml).

La figura 12C muestra los efectos de aumentar las concentraciones de pAb sola o en combinación con lapatinib (100 nM) sobre la apoptosis en las células BT474 usando el manchado Annexin V y citometría de flujo.

La figura 12D muestra los niveles de proteína en estado estacionario de ErbB2 y p-ErbB2 totales en respuesta a cantidades aumentadas de pAb, sola o en combinación con lapatinib (100 nM) según lo determinado por la técnica Western Blot. Los niveles de la proteína actina en estado estacionario la sirvieron como control para la carga igual de proteína.

La figura 12E muestra los resultados similares a la figura 12A.

La figura 13 muestra el estado de activación de Erk1/2 y de Akt está modulada en respuesta a lapatinib y a los anticuerpos anti-HER-2/neu (pAb) inducidos por la vacuna. Las células BT474 que crecieron exponencialmente se cultivaron durante 72 horas

bajo las condiciones de tratamiento descritas. Se determinaron los niveles de proteína en estado estacionario de Erk1/2 total, fosfo-Erk1/2 activado, Akt total, y fosfo-Akt activada mediante la técnica Western Blot. Las células tratadas con el vehículo
5 (DMSO) o TA2021 solo sirvieron como controles.

La figura 14 muestra los efectos de lapatinib y de los anticuerpos anti-HER-2/neu (pAb) inducidos por la vacuna en el estado de activación de ErbB3. Las células BT474 se cultivaron bajo varias condiciones de tratamiento, según lo mostrado.
10 Después de 72 horas, los lisatos celulares se recolectaron y se determinaron los niveles de proteína en estado estacionario de ErbB3 total y fosfo-ErbB3 activado mediante la técnica Western Blot.

La figura 15A muestra los efectos de las condiciones de
15 tratamiento indicadas sobre la apoptosis en las células BT474. La apoptosis se determinó usando el manchado Annexin V y la citometría de flujo.

La figura 15B muestra el análisis Western Blot de los niveles de proteína en estado estacionario del total de ErbB2, p-ErbB2, y
20 survivina después de 72 horas en las células BT474 cultivadas bajo las condiciones de tratamiento indicadas.

La figura 15C muestra los efectos de las condiciones de tratamiento indicadas en los niveles de proteína en estado estacionario de Erk1/2 total, p-Erk1/2, Akt total, y p-Akt
25 determinados por la técnica Western Blot después de 72 horas del

tratamiento.

La figura 16 muestra los efectos apoptóticos de tratar células SKBR3 con (i) DMSO solo (control negativo para lapatinib), (ii) lapatinib (0.1 μ M), (iii) pAb (100 μ g/ml), (iv) lapatinib (0.1 μ M) y pAb (100 μ g/ml); (v) TA2021 (100 μ g/ml), (vi) lapatinib (0.1 μ M) y TA2021 (100 μ g/ml), (vii) trastuzumab (10 μ g/ml), o (viii) lapatinib (0.1 μ M) y trastuzumab (10 μ g/ml). Después de 72 horas, la apoptosis se determinó usando el manchado Annexin V y la citometría de flujo.

La figura 17 muestra los efectos sobre la proteína survivina, cuando las células SKBR3 se trataron durante 72 horas con (i) DMSO solo (control negativo para lapatinib), (ii) lapatinib (0.1 μ M), (iii) pAb (100 μ g/ml), (iv) lapatinib (0.1 μ M) y pAb (100 μ g/ml); (v) TA2021 (100 μ g/ml), (vi) lapatinib (0.1 μ M) y TA2021 (100 μ g/ml), (vii) trastuzumab (10 μ g/ml), o (viii) lapatinib (0.1 μ M) y trastuzumab (10 μ g/ml).

La figura 18 muestra los efectos de lapatinib y anticuerpos anti-Her-2/neu en pTyr/ErbB12 y biomarcadores descendentes en células SkbR3, según lo indicado.

Descripción Detallada de la Invención

A través de esta especificación, a menos que el contexto requiera lo contrario, las palabras "comprende" y "incluye" o variaciones tal como "que comprende", "comprende", "que incluye", "incluye", etc., deben interpretarse como inclusivas, es decir, el uso de estas palabras implicará la inclusión posible de

números enteros o elementos no citados específicamente.

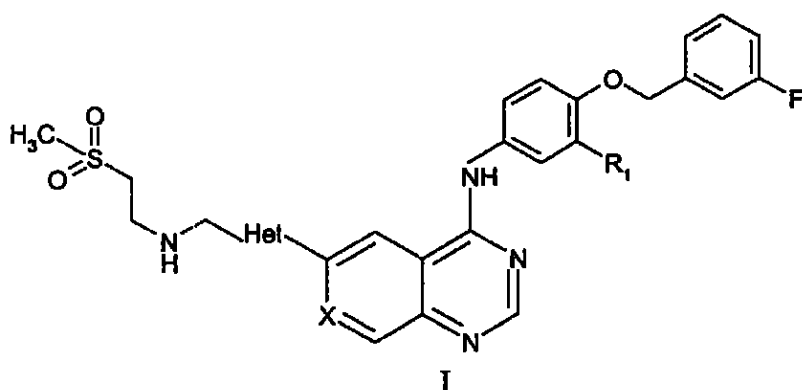
Debe observarse que todas las referencias y publicaciones a las que se hace referencia a través de la especificación se incorporan en la presente por referencia.

Adicionalmente, el término "proteína" se utiliza en la presente intercambiabilmente con "polipéptido" o "péptido".

Componente (a)

La siguiente estructura representa un compuesto de fórmula I:

10

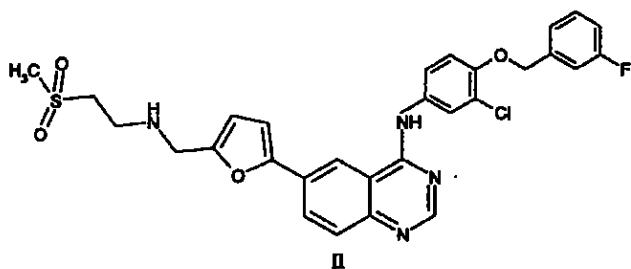


15

en donde R_1 es Cl o Br; X es CH, N, o CF; y Het es tiazol o furan.

En una modalidad, R_1 es Cl; X es CH; y Het es furan, y el componente (a) puede ser un compuesto de fórmula II y/o sales, solvatos o derivados fisiológicamente funcionales de los mismos.

20



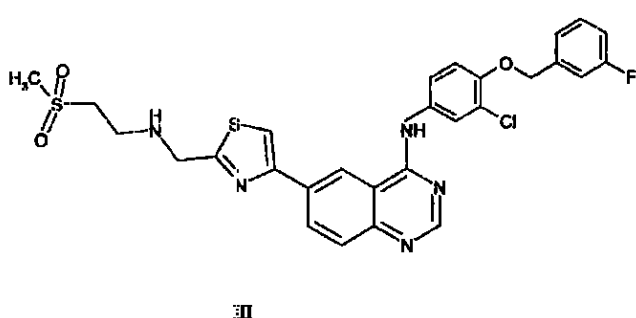
25

El compuesto de fórmula II tiene el nombre químico N-{3-cloro-4-[(3-fluorobencil)oxi]fenil}-6-[5-({[2-

(metansulfonil)etil]amino}metil)-2-furil]-4-quinazolinamina.

En otra modalidad, R_1 es Cl; X es CH; y Het es tiazol, y el componente (a) puede ser un compuesto de fórmula III y/o sales, solvatos o derivados fisiológicamente funcionales de los mismos.

5



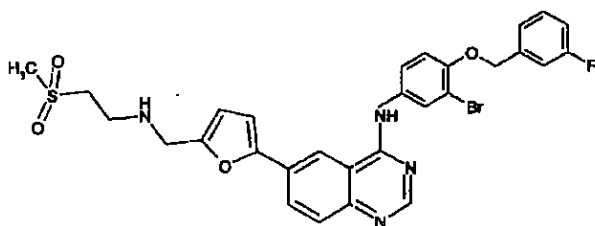
III

10

El compuesto de fórmula III es (4-(3-fluoro-benciloxi)-3-clorofenil)-(6-(2-((2-metansulfonil-etilamino)-metil)-tiazol-4-il)quinazolin-4-il)-amina.

En otra modalidad, R_1 es Br; X es CH; y Het es furan, y el componente (a) puede ser un compuesto de fórmula IV y/o sales, solvatos o derivados fisiológicamente funcionales de los mismos.

15



IV

20

El compuesto de fórmula IV es (4-(3-fluoro-benciloxi)-3-bromofenil)-(6-(5-((2-metansulfonil-etilamino)-metil)-furan-2-il)quinazolin-4-il)-amina.

Según lo utilizado en la presente, el término "cantidad efectiva" significa que la cantidad de un fármaco o agente

25

56

farmacéutico que producirá la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano, es buscada, por ejemplo, por un investigador o medico. Además, el término " cantidad terapéuticamente efectiva" significa cualquier cantidad que, con
5 respecto a un sujeto correspondiente que no ha recibido tal cantidad, dé lugar al tratamiento mejorado, curación, prevención, o mejoramiento de una enfermedad, trastorno, o efecto secundario, o que dé lugar a una disminución en la velocidad de progreso de una enfermedad o trastorno. El término también
10 incluye dentro de su alcance, cantidades efectivas para mejorar la función fisiológica normal. Adecuadamente, el componente (a) se administra en una cantidad efectiva y/o una cantidad terapéuticamente efectiva.

Según lo utilizado en la presente, el término "derivado
15 fisiológicamente funcional" se refiere a cualquier derivado farmacéuticamente aceptable de un compuesto de las fórmulas I, II, III, ó IV, por ejemplo, un éster o amida, que durante la administración a un mamífero es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de las fórmulas I, II, III, ó IV o un
20 metabolito activo del mismo. Tales derivados están claros para el experto en la técnica, sin la experimentación indebida, y con referencia a la enseñanza de Burger's Medicinal Chemistry And Drug Discovery, 5^{ta} Edición, Vol 1: Principles and Practice, que se
25 enseña los derivados fisiológicamente funcionales.

88

Según lo utilizado en la presente, el término "solvato" se refiere a un complejo de estequiometría variable formado por un soluto (en esta invención, un compuesto de fórmula I, II, III, ó IV o una sal o derivado fisiológicamente funcional del mismo) y un solvente. Tales solventes para el propósito de la invención no pueden interferir con la actividad biológica del soluto. Los ejemplos de solventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, metanol, etanol y ácido acético. El solvente usado puede ser un solvente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de solventes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, etanol y ácido acético. En una modalidad el solvente usado es agua.

Los compuestos (a) de fórmulas I, II, III y IV tienen la capacidad de cristalizarse en más de una forma, una característica, que se conoce como polimorfismo, y se entiende que tales formas polimórficas ("polimorfos") están dentro del alcance de las fórmulas I, II, III y IV. El polimorfismo puede ocurrir generalmente como una respuesta a los cambios en la temperatura o presión o ambas y también puede resultar de variaciones en el proceso de cristalización. Los polimorfos se pueden distinguir por varias características físicas conocidas en la técnica tal como patrones de difracción de rayos X, solubilidad, y punto de fusión.

Comúnmente, las sales de los compuestos de fórmula I, II, III, ó IV son sales farmacéuticamente aceptables. Las sales

comprendidas dentro del término "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a sales no tóxicas de los compuestos de ésta invención. Las sales de los compuestos de fórmula I, II, III ó IV pueden comprender las sales de adición de ácido derivadas de nitrógeno en un sustituyente en el compuesto de fórmula I, II, III, ó IV. Las sales representativas incluyen las siguientes sales: acetato, bencensulfonato, benzoato, bicarbonato, bisulfato, bitartrato, borato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, clavulanato, citrato, diclorhidrato, edetate, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicollilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromohidruro, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbromuro, metilnitrato, metilsulfato, maleato de monopotasio, mucato, napsilato, nitrato, N-metilglucamina, oxalato, pamoato(embonato), palmitato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, potasio, salicilato, sodio, estearato, subacetato, succinato, tannato, tartrato, teoclato, tosilato y ditosilato, trietyoduro, trimetilamonio y valerato. Otras sales, que no son farmacéuticamente aceptables, pueden ser útiles en la preparación de compuestos de ésta invención y forman un aspecto adicional de la invención. Además, tal sal puede estar en forma anhidra o hidratada. En una modalidad, el compuesto de fórmula I, II, III, ó IV es una sal de hidrocioruro o ditosilato, por ejemplo una sal de ditosilato, por ejemplo el

monohidrato de sal de ditosilato.

La cadena lateral $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2$ de los compuestos de fórmula I, II, III, ó IV se puede unir a cualquier posición adecuada del grupo Het. Similarmente, el grupo fenilo del núcleo
5 de quinazolina se puede unir a cualquier posición adecuada del grupo Het.

En una modalidad de la presente invención, el componente (a) puede ser ditosilato de Lapatinib (GSK572016; Lapatinib) (GSK), la forma anhidra o hidratada, tal como monohidrato de sal
10 de ditosilato.

Componente (b)

Según lo utilizado en la presente, el término "composición inmunogénica" comprende cualquier composición que, cuando se administra a un sujeto mamífero adecuado, tenga la capacidad de
15 inducir una inmunorrespuesta en tal sujeto a por lo menos una porción de HER-2/Neu. Según lo utilizado en la presente, el término "immunogen" se refiere al componente de la composición que tiene la capacidad de inducir una inmunorrespuesta a por lo menos una porción de HER-2/Neu.

20 El componente (b) puede comprender una proteína aislada que comprende por lo menos un epítipo de la proteína HER-2/neu, o un polinucleótido que codifica tal proteína. En una modalidad de la presente invención, por lo menos un epítipo de 9 o más aminoácidos de longitud.

25 La molécula de HER-2/neu descrita en la presente puede ser

de rata, ratón, primate no humano, humano o híbrido de los mismos. En una modalidad, la molécula de HER-2/neu descrita en la presente puede ser la proteína entera, o un híbrido de la misma. En una modalidad de la presente invención, HER-2/neu
5 es de humano.

En una modalidad de la presente invención, el componente (b) según lo descrito en la presente puede comprender una proteína aislada que comprende por lo menos un epítipo del dominio extracelular de HER-2/neu, o un polinucleótido que
10 codifica tal proteína. En una modalidad de la presente invención, por lo menos un epítipo es de 9 o más aminoácidos de longitud.

En una modalidad de la presente invención, el componente (b) comprende una proteína aislada que comprende o consiste del dominio extracelular de HER-2/neu, o un polinucleótido que
15 codifica tal proteína.

En una modalidad de la presente invención, el componente (b) según lo descrito en la presente puede comprender una proteína aislada que comprende por lo menos un epítipo del dominio intracelular de HER-2/neu, o un polinucleótido que
20 codifica tal proteína. En una modalidad de la presente invención, por lo menos un epítipo es de 9 o más aminoácidos de longitud.

En una modalidad alternativa, el componente (b) comprende una proteína aislada que comprende o consiste del dominio intracelular de HER-2/neu, o un polinucleótido que codifica tal
25 proteína.

En una modalidad alternativa de la presente invención, el componente (b) comprende una proteína de la fusión que comprende por lo menos un epítipo de la proteína HER-2/neu, por ejemplo del dominio extracelular, o un polinucleótido que
5 codifica tal proteína. Los ejemplos de proteínas de fusión que se pueden utilizar en la presente invención se describen en el documento WO00/44899 (US2002177567), incorporado en la presente por referencia.

El término "proteína de fusión" se refiere a una proteína que
10 comprende por lo menos dos péptidos o polipéptidos. En una modalidad de una proteína de fusión, un péptido o polipéptido es de una secuencia o dominio de proteína y el otro péptido o polipéptido es otra secuencia o dominio de proteína. Los péptidos o polipéptidos se pueden unir covalentemente, por
15 ejemplo vía un enlace covalente, por ejemplo, un enlace de aminoácidos, tal como un enlace de poliglicina, u otro tipo de enlace químico, por ejemplo, un enlace de carbohidratos, enlace de lípidos, enlace de ácido graso, enlace de poliéter, por ejemplo, PEG, etc. (Ver, por ejemplo, Hermanson, *Bioconjugate*
20 *techniques* (1996)).

En otra modalidad de la presente invención, el componente (b) puede comprender una proteína Her2/neu y/o epítipo de la misma según lo descrito en la presente, conjugado a una
25 molécula de portador (por ejemplo usando técnicas conjugación químicas) o fusionado a una molécula de portador (por ejemplo

para formar una proteína de fusión recombinante que comprende la proteína Her2/neu y/o epítipo de la misma y el portador). El portador puede proporcionar la ayuda de células T para la generación de una inmunorrespuesta a la molécula de HER-2/neu.

5 Una lista incompleta de portadores que se pueden utilizar en la presente invención incluye: Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH), albúminas de suero tal como albúmina de suero bovina o humana (BSA o HSA, ambas por sus siglas en ingles), ovalbumina (OVA), toxinas bacterianas inactivadas tal como toxoide de
10 tétanos (TT) o toxoide de difteria (DT, por sus siglas en ingles), o fragmentos recombinante de los mismos (por ejemplo, dominio 1 o fragmento C de TT, o el dominio de desplazamiento de DT), derivado proteína purificado de tuberculina (PPD, por sus siglas en ingles). En una modalidad de la invención en la cual la
15 proteína de portador es de origen animal, tal como KLH o una albúmina de suero, la proteína de portador puede derivarse de forma recombinante.

 En una modalidad de la invención el portador puede ser la proteína D de Haemophilus influenzae (EP0594610B1 incorporado
20 en la presente por referencia). La proteína D es una proteína de unión a IgD de Haemophilus influenzae y ha sido patentada por Forsgren (WO 91/18926, otorgada, EP 0 594 610 B1 incorporada en la presente por referencia). En algunas circunstancias, por ejemplo en sistemas de expresión de inmunogen recombinante,
25 puede ser deseable utilizar fragmentos de proteína D, por ejemplo

proteína D 1/3rd (que comprende los aminoácidos 100-110 N-terminales de la proteína D (GB 9717953,5 (US 6,342,224 incorporado en la presente por referencia)).

En una modalidad de la presente invención el portador
5 puede ser un "epítoto auxiliar de células T (Th)" o "epítoto
auxiliar T", que es un péptido capaz de unirse a una molécula de
MHC y estimular las células T en una especie animal. El epítoto
auxiliar T puede ser un epítoto extraño (non-self). Los epítotos
de a células T pueden ser epítotos promiscuos, es decir epítotos
10 que se unen a una fracción sustancial de moléculas de clase II de
MHC en una especie o población animal (Panina-Bordignon y col.,
EJI. 1989, 19:2237-2242; Reece y col., JI 1993, 151:6175-6184,
incorporados en la presente por referencia).

Los epítotos-Th que son promiscuos son alta y ampliamente
15 reactivos en poblaciones animales y humanas con tipos de MHC
ampliamente divergentes (Partidos y col. (1991) "Immune
Responses in Mice Following Immunisation with chimaeric
Synthetic Peptides Representing B and T Cell Epitopes of
Measles Virus Proteins" J. of Gen. Virol. 72:1293-1299; US
20 5,759,551, incorporados en la presente por referencia). Los
dominios de Th que se pueden utilizar de acuerdo con la presente
invención tienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 50
aminoácidos, por ejemplo de aproximadamente 10 a
aproximadamente 30 aminoácidos. Cuando los epítotos Th
25 múltiples están presentes, éstos pueden todos ser el mismo (es

decir, los epítopes son homólogos) o se puede utilizar una combinación de más de un tipo de epítope (es decir, los epítopes es heterogéneos).

Los epítopes Th incluyen como ejemplos, epítopes derivados
 5 de patógenos tal como epítopes Th de antígeno de superficie o
 núcleo de Hepatitis (péptido 50-69, Ferrari y col., J. Clin. Invest,
 1991, 88, 214-222), epítopes Th de toxina de Pertussis, epítopes
 Th de toxina de tétanos (tal como P2 (EP 0 378 881 B1
 incorporado en la presente por referencia) y P30 (WO 96/34888,
 10 WO 95/31480, WO 95/26365, incorporados en la presente por
 referencia), epítopes Th de proteína F de virus del sarampión,
 epítopes Th de proteína de membrana externa principal de
 Chlamydia trachomatis (tal como P11, Stagg y col., Immunology,
 1993, 79, 1-9), invasina de Yersinia, toxoide de difteria,
 15 hemaglutinina del virus de la influenza (HA) y antígeno CS de
 P.falciparum.

Otros epítopes Th se describen en la literatura, incluyendo:
 WO 98/23635; Soutwood y col., 1998, J. Immunol., 160:
 3363-3373; Sinigaglia y col., 1988, Nature, 336: 778-780;
 20 Rammensee y col., 1995, Immunogenetics, 41: 4, 178-228; Chicz
 y col., 1993, J. Exp. Med., 178:27-47; Hammer y col., 1993, Cell
 74:197-203; y Falk y col., 1994, Immunogenetics, 39: 230-242, US
 5,759,551; Cese y col., 1987, PNAS 84, 4249-4253; Partidos y
 col., J. Gen. Virol, 1991, 72, 1293-1299; WO 95/26365 y EP 0 752
 25 886 B. El epítope de células T también puede ser una secuencia

artificial tal como un péptido Pan D-R "PADRE" (WO95/07707 (US 6,675,428) incorporado en la presente por referencia). En una modalidad de la presente invención, el portador usado es PADRE.

El epítotope de células T se puede seleccionar del grupo de
 5 epítotope que se unirán a un número de individuos que expresan
 más de una molécula MHC II en humanos. Por ejemplo, los
 epítotope que se contemplan específicamente son epítotope P2 y
 P30 de TT (Panina-Bordignon Eur. J. Immunol 1989 19 (12) 2237).
 En una modalidad el epítotope de células T heterólogo es P2 ó P30
 10 de TT.

El epítotope P2 tiene la secuencia QYIKANSKFIGITE (SEC ID NO: 1) y corresponde a los aminoácidos 830-843 de la toxina de tétanos.

El epítotope P30 (residuos 947-967 de la toxina de tétanos)
 15 tiene la secuencia FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEC ID NO: 2);
 la secuencia FNNFTV se puede eliminar opcionalmente.

Otros epítotope T universales que se pueden derivar de la
 proteína Circumsporozoite de Plasmodium falciparum - en
 particular la región 378-398 que tiene la secuencia
 20 DIEKKIAKMEKASSVFNVVNS (SEC ID NO: 3) (Alexander J, (1994)
 Immunity 1 (9), p 751-761).

Otro epítotope que se puede utilizar se deriva de la proteína
 de fusión del virus del sarampión en el residuo 288-302 que tiene
 la secuencia LSEIKGVrVHRLEGV (SEC ID NO: 4) (Partidos CD,
 25 1990, J. Gen. Virol 71(9) 2099-2105).

Aún otro epítope que se puede utilizar se deriva del antígeno superficial del virus de la hepatitis B, en particular los aminoácidos, tiene la secuencia FLLTRILTEPQSLD (SEC ID NO: 5).

5 Otro conjunto de epítopes que se pueden utilizar se deriva de la toxina de la difteria. Cuatro de estos péptidos (aminoácidos 271-290, 321-340, 331-350, 351-370) están distribuidos dentro del dominio T del fragmento B de la toxina, y los 2 restantes están distribuidos en el dominio R (411-430, 431-450):

- 10 PVFAGANYAAWAVNVAQVID (SEC ID NO: 6)
- VHHNTEEIVAQSIALSSLMV (SEC ID NO: 7)
- QSIALSSLMVAQAIPLVGEL (SEC ID NO: 8)
- VDIGFAAYNFVESIINLFQV (SEC ID NO: 9)
- QGESHDIKITAENTPLPIA (SEC ID NO: 10)
- 15 GVLLPTIPGKLDVNKSKTI (SEC ID NO: 11)

(Raju R., Navaneetham D., Okita D., Dietelm-Okita B., McCormick D., Conti-Fine B. (1995) Eur. J. Immunol. 25: 3207-14.)

La composición inmunogénica de la presente invención puede, por lo tanto, comprender una proteína Her2/neu y/o epítope de la misma según lo descrito en la presente, y portadores y/o epítopes Th según lo descrito en la presente como conjugados químicos o como constructos de péptidos puramente sintéticos. El inmunogen se puede unir a los epítopes Th vía un
25 separador (por ejemplo, Gly-Gly) en las terminales N o C del

immunogen.

Se pueden incluir uno o más portadores y/o epítopes Th promiscuos. En una modalidad, la composición inmunogénica puede comprender entre 2 a 5 portadores y/o epítopes Th.

5 En una modalidad, el inmunogen se puede conjugar directamente a portadores de liposomas, que pueden comprender adicionalmente inmunogenes capaces de proporcionar el auxiliar de células T.

Proteína de Conjugación o Fusión

10 El portador o epítoto Th se puede acoplar usando un método de conjugación bien conocido en la técnica. Así, por ejemplo, para el acoplamiento covalente directo es posible utilizar una carbodiimida, glutaraldehído o un éster de (N-[γ-maleimidobutiriloxi] succinimida, utilizando enlaces
15 heterobifuncionales disponibles comercialmente tal como CDAP y SPDP (usando las instrucciones de los fabricantes). Después de la reacción de acoplamiento, la conjugación se puede aislar y purificar fácilmente por medio de un método de diálisis, método de filtración en gel, un método de fraccionamiento, etc. Las
20 conjugaciones formadas mediante el uso de la química de glutaraldehído o maleimida, se pueden utilizar en la presente invención. En una modalidad, se puede usar la química de maleimida.

Alternativamente, el portador o epítoto Th se puede
25 fusionar a la proteína o epítoto de Her-2/neu según lo descrito en

la presente. Por ejemplo, el documento EP0421635B (incorporado en la presente por referencia) describe el uso de partículas quiméricas del antígeno de núcleo de hepadnavirus para secuencias de péptidos extraños presentes en una partícula
5 tipo virus. Como tal, las moléculas de fusión pueden comprender el inmunogen de la presente invención presente en las partículas quiméricas que consisten de por ejemplo el antígeno de núcleo de hepatitis B. Alternativamente, las proteínas de fusión recombinantes pueden comprender el inmunogen y NSI del virus
10 de la influenza.

Para cualquier proteína expresada de forma recombinante que forman parte del componente (b) de la presente invención, el ácido nucleico que codifica proteína también forma un aspecto de la presente invención.

15 En una modalidad de la presente invención, la proteína de fusión puede ser la expresión de asociados de fusión diseñados genéticamente, opcionalmente vía una secuencia de enlace.

Los polipéptidos que forman la proteína de fusión pueden unir la terminal C a la terminal N. Alternativamente, pueden unir
20 la terminal C a la terminal C, terminal N a la terminal N, o la terminal N a la terminal C. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden. Los términos "polipéptido" y "proteína de fusión" también pueden referirse a variantes modificadas de forma conservadora, variantes
25 polimórficas, alelos, mutantes, sub-secuencias y homólogos inter-

especie de polipéptidos, o polipéptidos que constituyen una proteína de fusión.

Las proteínas de fusión se pueden producir uniendo covalentemente una cadena de aminoácidos de una secuencia de proteína a una cadena de aminoácidos de otra secuencia de proteína, por ejemplo, preparando un polinucleótido recombinante que codifica contiguamente la proteína de fusión. Las proteínas de fusión pueden comprender 2, 3, 4 ó más cadenas diferentes de aminoácidos de una especie igual o diferente. Las diferentes cadenas de aminoácidos en una proteína de fusión se pueden unir directamente o se pueden unir indirectamente vía un grupo de enlace químico o un grupo de enlace de aminoácidos. La proteína de fusión puede comprender opcionalmente otros componentes, según lo descrito más detalladamente en la presente.

La proteína de conjugación o fusión puede ser de forma sustancial inactiva biológicamente.

En una modalidad, la proteína o epítipo de HER-2/neu descritos en la presente se pueden unir o fusionar a GM-CSF recombinante, por ejemplo GM-CSF humano. En una modalidad adicional, una composición que comprende una proteína o epítipo de HER-2/neu según lo descrito en la presente puede comprender además GM-CSF.

Según lo utilizado en la presente, el término "proteína de fusión HER-2/neu ECD-ICD", también referido en la presente

como "ECD-ICD" o "proteína de fusión de ECD-ICD", se refiere a una proteína de fusión o fragmento de la misma que comprende (i) una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste del dominio extracelular o fragmentos del mismo; y (ii) una secuencia
5 de aminoácidos que comprende o consiste del dominio intracelular o fragmentos del mismo de la proteína HER-2/neu.

Según lo utilizado en la presente, el término "proteína de fusión HER-2/neu ECD-PD", también referido en la presente como "ECD-PD" o "proteína de fusión ECD-PD", se refiere una proteína
10 de fusión o fragmento de la misma que comprende (i) una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste del dominio extracelular o fragmentos del mismo; y (ii) una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste del dominio de fosforilación o fragmentos del mismo de la proteína HER-2/neu.

Según lo utilizado en la presente, el término "proteína de fusión HER-2/neu ECD- Δ PD", también referido como "ECD- Δ PD" o "proteína de la fusión ECD- Δ PD", se refiere a una proteína de
15 fusión o fragmento de la misma que comprende (i) una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste del dominio extracelular o fragmentos del mismo; y (ii) una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste del dominio Δ PD o
20 fragmentos del mismo de la proteína HER-2/neu.

En una modalidad, el componente (b) comprende una composición inmunogénica que comprende o consiste de la
25 proteína de fusión "ECD-ICD", o un polinucleótido que codifica la

proteína de fusión.

En una modalidad alternativa, el componente (b) comprende una composición inmunogénica que comprende o consiste de la proteína de fusión "ECD-PD", o un polinucleótido que codifica la
5 proteína de fusión.

En una modalidad alternativa adicional, el componente (b) comprende una composición inmunogénica que comprende o consiste de la proteína de fusión "ECD-APD", o un polinucleótido que codifica la proteína de fusión.

10 En una modalidad de la presente invención, la proteína de fusión no incluye una porción sustancial del dominio de transmembrana de HER-2/neu. En una modalidad adicional, la proteína de fusión no incluye ningún dominio de transmembrana de HER-2/neu.

15 Las proteínas de fusión de ECD-ICD y las proteínas de fusión ECD-PD de la invención pueden ser solubles, secretadas y estables en medios de cultivo.

Según lo descrito en la presente se entiende que las proteínas HER-2/neu incluyen fragmentos de las mismas,
20 homólogos de la misma y equivalentes funcionales de la misma (referidos colectivamente como "variantes"), tal como aquellos en los cuales uno o más aminoácidos se insertan, eliminan o sustituyen por otros aminoácidos o ácidos no amínicos que, en algunas modalidades de la invención, (i) aumentan la obtención o
25 mejoramiento de una inmunorrespuesta con respecto a la proteína

72

HER-2/neu, o (ii) sustancialmente no afectan la obtención o mejoramiento de una inmunorrespuesta con respecto a la proteína HER-2/neu (por ejemplo, la variante estimula una respuesta mediante células T auxiliares o las células T citotóxicas o
5 estimula la producción de anticuerpos).

Se describen más detalladamente los ejemplos de variantes incluyendo fragmentos, homólogos y equivalentes funcionales ejemplares de la proteína de fusión HER-2/neu ECD-ICD y de la proteína de fusión HER-2/neu ECD-PD en el documento
10 WO00/44899 (US2002/0177567), incorporado en la presente por referencia. Las variantes pueden ser "sustancialmente idénticas" o "sustancialmente similares" a una proteína de fusión que comprende los componentes de polipéptidos nativos, y conservan la capacidad de estimular una inmunorrespuesta. Los ejemplos
15 de las variantes que se pueden utilizar y los métodos para determinar tales variantes se describen en el documento WO00/44899 (US2002/0177567), incorporado en la presente por referencia.

El ICD que puede formar parte de la presente invención,
20 puede ser de origen humano, de rata o ratón. El ICD humano (figura 1; SEC ID NO: 12) rodea inclusivamente la región de Lys 676 a Val 1255. El ICD de rata se especifica en la figura 2 y la SEC ID NO: 13 que rodea inclusivamente la región de Lys 677 a Val 1256.

25 El PD que puede formar parte de la presente invención

74

puede ser de origen humano, de rata o ratón. El PD humano se especifica en la figura 4 (secuencia de aminoácidos 1 a 266 de la SEC ID NO: 15, equivalente a la secuencia de aminoácidos 990 a 1255 de HER-2/neu). El PD humano puede ser Δ PD humano,
5 según lo mostrado en la figura 15 (secuencia de aminoácidos 1 a 59 de la SEC ID NO: 16, equivalente a la secuencia de aminoácidos 990 a 1050 de HER-2/neu). El PD de rata se muestra en la figura 2 y la SEC ID NO: 13 que rodea inclusivamente la región de Gln 991 a Val 1256. El PD de rata
10 puede ser el Δ PD de rata, que se muestra en la figura 2 y la SEC ID NO:13 que rodea inclusivamente la región de Gln 991 a Arg 1049.

En una modalidad, un ECD humano se puede fusionar con (i) un ICD humano o ICD de rata o con (ii) un PD o Δ PD humano,
15 o con un PD o Δ PD de rata. En otra modalidad, un ECD de rata se puede fusionar con (i) un ICD humano o ICD de rata o con (ii) un PD o Δ PD humano, o PD o Δ PD de rata.

La proteína de fusión que puede formar parte de la presente invención puede comprender un dominio extracelular de
20 HER-2/neu fusionado a un dominio de fosforilación de HER-2/neu. La proteína puede tener una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 17, o una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 14 fusionada a una secuencia por lo menos
25 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 15.

Alternativamente, la proteína puede comprender una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO:3 fusionada directamente a una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia inclusiva de Gln 991 a Val 1256 de la SEC ID NO: 13, o una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO:3 (17) fusionada a la secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia inclusiva de Gln 991 a Val 1256 de la SEC ID NO: 13. Alternativamente, la proteína puede comprender una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 19 fusionada directamente a una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 15, o una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 19 fusionada a una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntico a la secuencia de la SEC ID NO:15. Alternativamente, la proteína puede comprender una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 19 fusionada directamente a la secuencia de aminoácidos inclusiva de Gln 991 a Val 1256 de la SEC ID NO: 13, o una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 19 fusionada a una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos inclusiva de Gln 991 a Val 1256 de la SEC ID NO:13.

En una modalidad alternativa, la proteína de fusión puede

comprender un dominio extracelular de HER-2/neu fusionado a un
fragmento del dominio de fosforilación de HER-2/neu. En una
modalidad, la proteína puede tener una secuencia por lo menos
80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 18, o
5 una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la
secuencia de la SEC ID NO: 14 fusionada a una secuencia por lo
menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia SEC ID NO: 16.
Alternativamente, la proteína puede comprender una secuencia
por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC
10 ID NO: 14 fusionada directamente a una secuencia por lo menos
80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos inclusiva
de Gln 991 a Arg 1049 de la SEC ID NO: 2 SEQ, o una secuencia
por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia SEC ID
NO: 14 fusionada a una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95%
15 idéntica a la secuencia de aminoácidos inclusiva de Gln 991 a Arg
1049 de la SEC ID NO: 13. Alternativamente, la proteína puede
comprender una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica
a la secuencia de la SEC ID NO: 19 fusionada directamente a una
secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia
20 de la SEC ID NO: 16, o una secuencia por lo menos a 80%, 90% ó
95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 19 fusionada a una
secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia
de la SEC ID NO: 16. Alternativamente, la proteína puede
comprender una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica
25 a la secuencia de la SEC ID NO: 19 fusionada directamente a una

secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica la secuencia de aminoácidos inclusiva de Gln 991 a Arg 1049 de la SEC ID NO:13, o una secuencia por lo menos a 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de SEC ID NO: 19 fusionada a una secuencia por lo
5 menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos inclusiva de Gln 991 a Arg 1049 de la SEC ID NO:13.

En una modalidad alternativa, la proteína de fusión puede comprender un dominio extracelular de HER-2/neu fusionado a un dominio intracelular de HER-2/neu. Alternativamente, la proteína
10 puede comprender una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 14 fusionada directamente a una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos inclusiva de Lys 676 a Val 1255 en la SEC ID NO: 12, o una secuencia por lo menos 80%,
15 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 14 fusionada a una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos inclusiva de Lys 676 a Val 1255 de la SEC ID NO:12 vía por lo menos un grupo de enlace de aminoácidos o químico. Alternativamente, la proteína puede
20 comprender una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO:14 fusionada directamente a una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos inclusiva de Lys 677 a Val 1256 de la SEC ID NO: 13, o en donde la proteína comprende una secuencia por lo
25 menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO:

14 fusionada a una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos inclusiva de Lys 677 a Val 1256 de la SEC ID NO:2 vía por lo menos un grupo de enlace de aminoácidos o químico. Alternativamente, la proteína puede

5 comprender una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 19 fusionada directamente a una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos inclusiva de Lys 676 a Val 1255 de la SEC ID NO: 12, o una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la

10 secuencia de la SEC ID NO: 19 fusionada a una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos inclusiva de Lys 676 a Val 1255 de la SEC ID NO:12 vía por lo menos uno de un grupo de enlace de aminoácido o químico. Alternativamente, la proteína puede comprender una secuencia

15 por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 19 fusionada directamente a una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos inclusiva de Lys 677 a Val 1256 de la SEC ID NO: 13, o una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de la SEC ID

20 NO: 19 fusionada a una secuencia por lo menos 80%, 90% ó 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos inclusiva de Lys 677 a Val 1256 de la SEC ID NO: 13 vía por lo menos uno de un grupo de enlace de aminoácidos o químico.

Las proteínas de fusión de ECD-ICD que se pueden utilizar

25 en la presente invención, que se entenderá que incluyen

variantes, incluyen cualquier combinación posible entre polipéptidos humanos y no humanos. Los polipéptidos no humanos comprenden polipéptidos de cualquier mamífero, tal como por ejemplo, rata, ratón, cobayo, caballo, vaca, cerdo, 5 oveja, perro, etc. En una modalidad, las proteínas de fusión de ECD-ICD incluyen:

(i) proteínas de fusión de ECD humano – ICD humano, tal como las formadas uniendo el ECD humano de la figura 3 (SEC ID NO: 14) con el ICD humano, que es la secuencia de aminoácidos 10 que rodea inclusivamente Lys 676 a Val 1255, según lo demostrado en la figura 1 (SEC ID NO: 12), con o sin un grupo de enlace de aminoácidos y/o químico, y variantes del mismo;

(ii) proteínas de fusión de ECD de rata - ICD de rata, tal como las formadas uniendo el ECD de rata de la figura 8 (SEC ID NO: 19) con ICD de rata, que es la secuencia de aminoácidos que 15 rodea inclusivamente Lys 677 a Val 1256, según lo mostrado en la figura 2 (SEC ID NO: 13), con o sin un grupo de enlace de aminoácidos y/o químico, y variantes del mismo;

(iii) proteínas de fusión de ECD humano - ICD de rata, tal como las formadas uniendo el ECD humano mostrado en la figura 3 (SEC ID NO: 14) con ICD de rata, que es la secuencia de aminoácidos que rodea inclusivamente Lys 677 a Val 1256, según lo mostrado en la figura 2 (SEC ID NO: 13), con o sin un grupo de 20 enlace de aminoácidos y/o químico, y variantes del mismo; y

(iv) proteínas de fusión de ECD de rata - ICD humano, tal 25

como las formadas uniendo el ECD de rata, según lo mostrado en la figura 8 (SEC ID NO: 19), con ICD humano, que es la secuencia de aminoácidos que rodea inclusivamente Lys 676 a Val 1255, según lo mostrado en la figura 1 (SEC ID NO: 12), con
5 o sin un grupo de enlace de aminoácidos y/o químico, y variantes del mismo.

Cualquier variante de las proteínas de fusión de ECD-ICD descritas en la presente, se incluye como proteínas de fusión de la presente invención. En una modalidad, tales variantes son
10 sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a la proteína nativa HER-2/neu ECD-ICD y conservan la capacidad de estimular una inmunorrespuesta.

Las secuencias de ADN humano que codifican la proteína de ECD se muestran, por ejemplo, en la figura 9 (SEC ID NO: 20) mientras rodean inclusivamente el nucleótido 1 al nucleótido 1959.
15 Las secuencias de ADN humano que codifican la proteína de ICD se muestran, por ejemplo, en la figura 9 (SEC ID NO: 20) mientras rodean inclusivamente el nucleótido 2026 al nucleótido 3765. El efecto de cualquier modificación de secuencia sobre la capacidad
20 de una proteína HER-2/neu ECD-ICD de producir una inmunorrespuesta se puede determinar fácilmente, por ejemplo, analizando la capacidad de la proteína HER-2/neu ECD-ICD mutada de inducir una respuesta de las células T usando, por ejemplo, los métodos descritos en la presente, o analizando la
25 capacidad de la proteína HER-2/neu ECD-ICD mutada de producir

los anticuerpos.

Las proteínas de fusión de ECD-PD que se pueden utilizar en la presente invención, que se entenderá que incluyen las variantes, incluyen cualquier combinación posible entre los polipéptidos humanos y no humanos. Los polipéptidos no humanos comprenden, por ejemplo, de rata, ratón, cobayo, caballo, vaca, cerdo, oveja, perro, etc. En una modalidad, las proteínas de fusión de ECD-PD incluyen:

(i) proteínas de fusión de ECD humano - PD humano, tal como las mostradas en la figura 6 (SEC ID NO: 17) y variantes de las mismas, incluyendo las proteínas de fusión formadas uniendo el ECD humano de la figura 3 (SEC ID NO:14) al PD humano de la figura 4 (SEC ID NO: 15) con o sin un grupo de enlace de aminoácidos y/o químico, y variantes del mismo;

(ii) proteínas de fusión de ECD de rata - PD de rata, tal como las formadas uniendo el ECD de rata de la figura 8 (SEC ID NO: 19) con el PD de rata, que es la secuencia de aminoácidos que rodea inclusivamente Gln 991 a Val 1256, según lo mostrado en la figura 2 (SEC ID NO: 13), con o sin un grupo de enlace de aminoácidos y/o químico, y variantes del mismo;

(iii) proteínas de fusión de ECD humano - PD de rata, tal como las formadas uniendo el ECD humano mostrado en la figura 3 (SEC ID NO: 14) con PD de rata, que es la secuencia de aminoácidos que rodea inclusivamente Gln 991 a Val 1256, según

lo mostrado en la figura 2 (SEC ID NO: 13), con o sin un grupo de enlace de aminoácidos y/o químico, y variantes del mismo; y

(iv) proteínas de fusión de ECD de rata - PD humano, tal como las formadas uniendo ECD de rata, según lo mostrado en la figura 8 (SEC ID NO: 19), con PD humano, según lo mostrado en la figura 4 (SEC ID NO: 15), con o sin un grupo de enlace de aminoácidos y/o químico, y variantes del mismo.

Cualquier variante de las proteínas de fusión de ECD-PD se incluye como modalidades de la presente invención. En una modalidad, tales variantes son sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a la proteína nativa de HER-2/neu ECD-PD, y conservan la capacidad de estimular una inmunorrespuesta. Las secuencias de ADN humano que codifican la proteína de ECD se muestran, por ejemplo, en la figura 9 (SEC ID NO: 20) mientras rodean inclusivamente el nucleótido 1 al nucleótido 1959. Las secuencias de ADN humano que codifican la proteína de PD se muestran, por ejemplo, en la figura 9 (SEC ID NO: 20) mientras rodean inclusivamente el nucleótido 2968 al nucleótido 3765. El efecto de cualquier modificación de secuencia sobre la capacidad de una proteína HER-2/neu ECD-PD de producir una inmunorrespuesta se puede determinar fácilmente, por ejemplo, analizando la capacidad de la proteína HER-2/neu ECD-PD mutada de inducir una respuesta de las células T usando, por ejemplo, los métodos descritos en la presente, o analizando la capacidad de la proteína HER-2/neu

ECD-PD mutada para producir los anticuerpos.

En otra modalidad, las proteínas de fusión de ECD-PD son proteínas de fusión de ECD- Δ PD de la presente invención, que será entendido que incluyen variantes, incluyendo cualquier
5 combinación posible entre los polipéptidos humanos y no humanos. Los polipéptidos no humanos comprenden, por ejemplo, de rata, ratón, cobayo, caballo, vaca, cerdo, oveja, perro, etc. En una modalidad, las proteínas de fusión de ECD- Δ PD incluyen:

10 (i) proteínas de fusión de ECD humano - Δ PD humano, tal como las mostradas en la figura 7 (SEC ID NO: 18) y variantes de las mismas, incluyendo las proteínas de fusión formadas uniendo el ECD humano de la figura 3 (SEC ID NO: 14) con el Δ PD humano de la figura 5 (SEC ID NO: 16) con o sin un grupo de
15 enlace de aminoácidos y/o químico, y variantes del mismo;

(ii) proteínas de fusión de ECD rata - Δ PD de rata, tal como las formadas uniendo el ECD de rata de la figura 8 (SEC ID NO: 19) con el Δ PD de rata, que es la secuencia de aminoácidos que rodea inclusivamente Gln 991 a Arg 1049, según lo mostrado
20 en la figura 2 (SEC ID NO: 13), con o sin un grupo de enlace de aminoácidos y/o químico, y variantes del mismo;

(iii) proteínas de fusión de ECD humano - Δ PD de rata, tal como las formadas uniendo el ECD humano mostrado en la figura 3 (SEC ID NO: 14) con el Δ PD de rata, que es la secuencia de
25 aminoácidos que rodea inclusivamente Gln 991 a Arg 1049, según

lo mostrado en la figura 2 (SEC ID NO: 13), con o sin un grupo de enlace de aminoácidos y/o químico, y variantes del mismo; y

(iv) proteínas de fusión de ECD de rata - Δ PD humano, tal como las formadas uniendo el ECD de rata, según lo mostrado en la figura 8 (SEC ID NO: 19), con el Δ PD humano, según lo mostrado en la figura 5 (SEC ID NO: 16), con o sin un grupo de enlace de aminoácidos y/o químico, y variantes del mismo.

Cualquier variante de las proteínas de fusión de ECD- Δ PD se incluye como modalidades de la presente invención. En una modalidad, tales variantes son sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a la proteína nativa de HER-2/neu ECD- Δ PD y conservan la capacidad de estimular una inmunorrespuesta. Las secuencias de ADN humano que codifican la proteína de ECD se muestran, por ejemplo, en la figura 9 (SEC ID NO: 20) mientras rodean inclusivamente el nucleótido 1 al nucleótido 1959. Las secuencias de ADN humano que codifican la proteína Δ PD de la SEC ID NO: 16 se muestran, por ejemplo, en la figura 9 (SEC ID NO: 20) mientras rodean inclusivamente el nucleótido 2968 al nucleótido 3144. El efecto de cualquier modificación de secuencia sobre la capacidad de una proteína HER-2/neu ECD- Δ PD de producir una inmunorrespuesta se puede determinar fácilmente, por ejemplo, analizando la capacidad de la proteína HER-2/neu ECD- Δ PD mutada de inducir una respuesta de las células T usando, por ejemplo, los métodos descritos en la presente, o analizando la capacidad de la proteína HER-2/neu

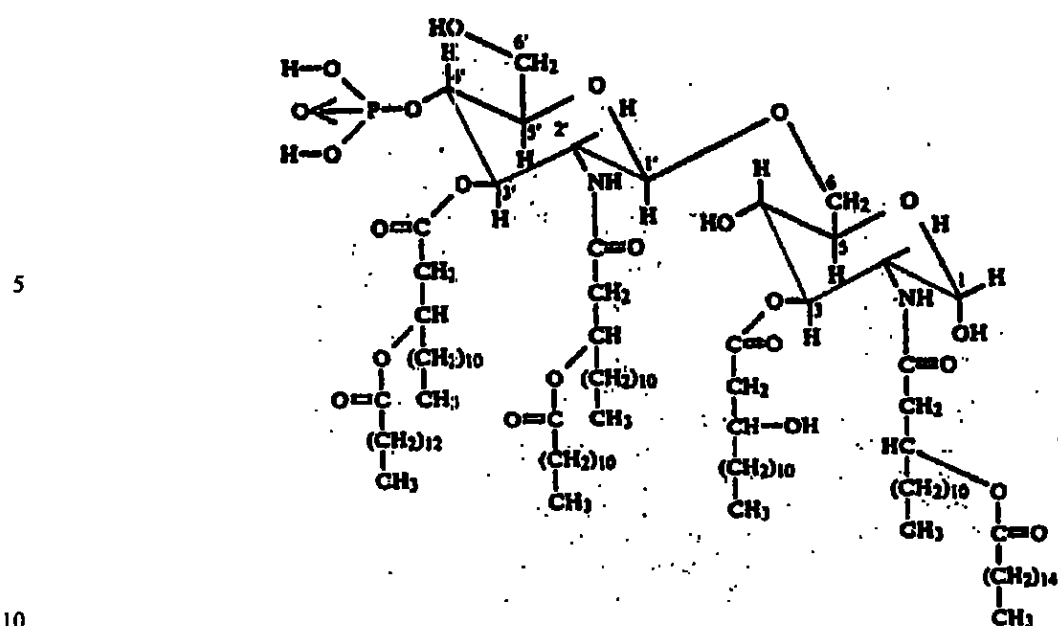
ECD-ΔPD mutada de producir los anticuerpos.

En una modalidad, el componente inmunogenético (b) comprende una proteína de fusión ECD-PD o un polinucleótido que codifica tal proteína de fusión.

5 En una modalidad de la presente invención en la cual el componente (b) es una proteína, el componente (b) puede además comprender un adyuvante o estimulante inmunológico tal como pero sin limitarse a uno capaz de estimular una respuesta de tipo TH1. En una modalidad de la presente invención, el componente
10 (b) comprende un adyuvante capaz de estimular una respuesta del tipo TH1.

Adyuvantes Adecuados para las Formulaciones de Proteínas

Ya se ha conocido anteriormente que el lipopolisacárido
15 enterobacteriano (LPS, por sus siglas en ingles) es un estimulador potente del sistema inmunológico, aunque su uso en adyuvantes se ha restringido por sus efectos tóxicos. Un derivado no tóxico de LPS, un lípido A de monofosforilo (MPL, por sus siglas en ingles), producido por la eliminación del grupo de
20 carbohidrato del núcleo y fosfato de la glucosamina de extremo reducido, ha sido descrito por Ribi y col. (1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ Corp., NY, p407-419) y tiene la siguiente estructura:



Una versión adicional desintoxicada de MPL resulta de la eliminación de la cadena de acilo de la posición 3 de la estructura del disacárido, y es llamada lípido A de monofosforilo 3-O-desacilado (3D-MPL). Se puede purificar y preparar

15 mediante los métodos enseñados en GB 2122204B, cuya referencia también describe la preparación del lípido A de difosforilo, y variantes 3-O-deaciladas del mismo. En una modalidad, la composición inmunogénica comprende 3D-MPL.

20 En una modalidad, la forma de 3D-MPL que se puede utilizar está en forma de una emulsión que tiene un tamaño de partícula pequeño de menos de 0.2 μm de diámetro, y su método de fabricación se describe en el documento WO 94/21292, incorporado en la presente por referencia. Las formulaciones

25 acuosas comprenden el lípido A de monofosforilo y un

tensioactivo se han descrito en el documento WO9843670, incorporado en la presente por referencia.

Los adyuvantes derivados de lipopolisacáridos bacterianos que se formularán en las composiciones de la presente invención, se pueden purificar y procesar a partir de fuentes bacterianas, o
5 alternativamente pueden ser sintéticos. Por ejemplo, el lípido A de monofosforilo purificado se describe en Ribi y col. 1986 (supra), y el lípido A de monofosforilo o difosforilo 3-O-desacilado derivado *Salmonella* sp. se describe en los documentos GB
10 2220211 y US 4912094. Se han descrito otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos (Hilgers y col., 1986, Int. Arch. Allergy. Immunol., 79(4):392-6; Hilgers y col., 1987, Immunology, 60(1):141-6; y EP 0 549 074 B1). En una modalidad el adyuvante lipopolisacáridos bacterianos es 3D-MPL.

15 Por consiguiente, los LPS derivados que se pueden utilizar en la presente invención son los estimulantes inmunológicos que son similares en estructura a los de LPS o MPL o 3D-MPL. En otro aspecto de la presente invención los derivados de LPS pueden ser un monosacárido acilado, que es una sub-porción en
20 la estructura anterior de MPL.

3D-MPL es un agonista del receptor de tipo Toll (TLR-4). En una modalidad, uno o más agonistas de TLR-4 se pueden incluir en una composición inmunogénica de la presente invención. Los agonistas de TLR-4 incluyen: lipopolisacáridos (LPS) de bacterias
25 gram-negativas, o fragmentos de las mismas; proteínas de choque

térmico (HSP, por sus siglas en ingles) 10, 60, 65, 70, 75 ó 90; proteína A de tensioactivo, oligosacáridos de hialuronano, fragmentos de heparan sulfato, fragmentos de fibronectina, péptidos de fibrinógeno y b-defensin-2 y MPL, por ejemplo 3D-MPL.

Las saponinas se enseñan en: Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (1996, A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol. 2 pp 363-386). Las saponinas son glucósidos de esteroides o triterpeno distribuidos ampliamente en los reinos de plantas y animales marinas. Se observa que las saponinas forman soluciones coloidales en agua que forman espuma al sacudirlas, y que precipitan colesterol. Cuando las saponinas son membranas celulares cercanas crean estructuras de tipo poro en la membrana, las cuales causan que la membrana se rompa. La hemólisis de eritrocitos es un ejemplo de este fenómeno, que es una propiedad de alguna, pero no de todas, saponina.

Las saponinas son conocidas como adyuvantes en vacunas para la administración sistémica. El adyuvante y la actividad hemolítica de las saponinas individuales se ha estudiado ampliamente en la técnica (Lacaille-Dubois y Wagner, supra). Por ejemplo, Quil A (derivado de la corteza del árbol suramericano Quillaja Saponaria Molina), y fracciones del mismo, se describen en los documentos 5,057,540 y "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2):1-

55; y EP 0 362 279 B1. Las estructuras en partículas, llamadas complejos de estimulación inmunológica (ISCOMS, por sus siglas en ingles), que comprende fracciones de Quil A son hemolíticas y se han utilizado en la fabricación de vacunas (Morein, B., EP 0 109 942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739, incorporados en la presente por referencia). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS 17 (fracciones purificadas por CLAR de Quil A) se han descrito como adyuvantes sistémicos potentes, y el método de su producción se describe en la Patente Norteamericana No. 10 5,057,540 y en el documento EP 0 362 279 B1. Otras saponinas que se han utilizado en estudios sistémicos de vacunación incluyen las derivadas de otra especie de planta tal como Gypsophila y Saponaria (Bomford y col., Vaccine, 10(9):572-577, 1992).

15 Un sistema de adyuvante que se puede utilizar en la presente invención comprende un derivado de lípido A no tóxico y un derivado de saponina. Un sistema de adyuvante particular que se puede utilizar, comprende 3D-MPL y QS21, según lo descrito en, por ejemplo, el documento WO 94/00153, incorporado en la presente por referencia. Otro sistema adicional que se puede utilizar comprende 3D-MPL y QS21, en donde QS21 se enfrió con colesterol, según lo descrito en, por ejemplo, el documento WO 20 96/33739, incorporado en la presente por referencia.

En una modalidad alternativa de la presente invención, el 25 componente (b) comprende adicionalmente una composición de

adyuvante que comprende una saponina, junto con un oligonucleótido estimulador inmunológico. Por ejemplo, la composición de adyuvante puede comprender QS21, junto con el oligonucleótido estimulador inmunológico, por ejemplo el
5 oligonucleótido que contiene elementos de CG sin metilar (oligonucleótidos de CpG).

En una modalidad de la presente invención, un oligonucleótido estimulador inmunológico que se puede incluir en un adyuvante se selecciona del grupo:

10 SEC ID NO: 22 – TCCATGACGTTTCCTGACGTT (CpG 1826)
SEC ID NO: 23 – TCTCCCAGCGTGCGCCAT (CpG 1758)
SEC ID NO: 24 – ACCGATGACGTCGCCGGTGACGGCACCACG
SEC ID NO: 25 – TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (CpG
2006)

15 SEC ID NO: 26 – TCCATGACGTTTCCTGATGCT (CpG 1668)

En una modalidad alternativa de la presente invención, el componente (b) comprende adicionalmente una composición de adyuvante que comprende una emulsión de aceite-en-agua, por ejemplo según lo descrito en el documento EP 382 271,
20 incorporado en la presente por referencia.

En una modalidad adicional, el componente (b) comprende adicionalmente una composición de adyuvante formulada con 3D-MPL, QS21 y oligonucleótidos CpG junto con un portador de liposoma o de emulsión aceite-en-agua, por ejemplo según lo
25 descrito en el documento WO02/32450, incorporado en la

presente por referencia. Tales formulaciones pueden producir una respuesta mediada humoral y celular. En comparaciones con la formulación de adyuvante que comprende solo QS21 y 3D-MPL, la formulación de la invención puede aducir, en ratones, ventajosamente una respuesta de TH1 más fuerte.

En aún una modalidad adicional de la presente invención, el adyuvante es SB62'c, un adyuvante que comprende una emulsión de aceite-en-agua y una saponina, en donde el aceite es un aceite metabolizable, y la relación del aceite metabolizable:saponina (p/p) está en el intervalo de 1:1 a 200:1 (dosis baja de emulsión de aceite-en-agua) descrito en el documento WO99/11241, cuya enseñanza completa se incorpora en la presente por referencia. En una modalidad, la relación del aceite metabolizable:saponina (p/p) es sustancialmente 48:1. La saponina puede ser QuilA, tal como QS21. En un ejemplo, el aceite metabolizable es escualeno. La composición de adyuvante SB62'c puede comprender adicionalmente un esteroide, por ejemplo colesterol. La composición de adyuvante SB62'c puede adicional o alternativamente comprender además uno o más estimuladores inmunológicos, por ejemplo: 3D-MPL y/o α -tocoferol. En una modalidad de SB62'c, el cual comprende 3D-MPL, la relación de QS 21:3D-MPL (p/p) puede ser de 1:10 a 10:1, por ejemplo 1:1 a 1:2.5, ó 1:1 a 1:20.

Así, en una modalidad del adyuvante SB62'c, la relación del aceite metabolizable:saponina (p/p) está en el intervalo de 1:1 a

200:1 o es sustancialmente 48:1, la saponina es QS21 y el adyuvante también incluye 3D-MPL (dosis baja de la emulsión de aceite-en-agua, QS21, 3D-MPL).

En otra modalidad de la presente invención, el adyuvante
5 consiste de una emulsión de agua/aceite que comprende un tocol, por ejemplo según lo descrito en el documento EP0382271, incorporado en la presente por referencia. En una modalidad adicional, la emulsión de aceite-en-agua que se puede utilizar comprende α -tocoferol.

10 En una modalidad, el adyuvante es una composición de adyuvante según lo descrito en la presente, presente dentro de un liposoma, por ejemplo según lo descrito en el documento EP822831, incorporado en la presente por referencia. En una modalidad adicional, el adyuvante puede comprender montanida
15 ISA51.

Vacuna

La presente invención también proporciona una vacuna que comprende una composición inmunogénica según lo descrito en la presente, con un excipiente, adyuvante o vehículo
20 farmacéuticamente aceptable. La presente invención también proporciona un proceso para la fabricación de una composición para vacuna que comprende mezclar una composición inmunogénica según lo descrito en la presente con vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables
25 adecuados. Los vehículos y los excipientes apropiados son bien

conocidos en la técnica e incluyen por ejemplo agua o amortiguadores. La preparación para vacuna se describe generalmente en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. y Newman M.J.) (1995) Plenum Press
5 New York).

Polinucleótido

En una modalidad de la presente invención, el componente (b) comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión de la presente invención según lo descrito en
10 la presente.

En una modalidad adicional, la secuencia de polinucleótidos puede hibridizar bajo condiciones rigurosas a una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión. Según lo usado en la presente, los términos "condiciones rigurosas" y
15 "condiciones rigurosas de hibridación" significan que la hibridación ocurre solamente si hay por lo menos 95% y preferiblemente por lo menos 97% de identidad entre las secuencias. Un ejemplo específico de las condiciones rigurosas de hibridación, es la incubación durante la noche a 42°C en una
20 solución que comprende: 50% de formamida, 5x SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato de trisodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH 7.6), solución de 5x Denhardt, 10% de sulfato de dextran, y 20 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón dividido y desnaturalizado, seguido por el lavado del soporte de hibridación
25 en 0.1x SSC a aproximadamente 65°C. Las condiciones de

hibridación y lavado son bien conocidas y ejemplificadas en Sambrook, y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), particularmente el capítulo 11 en el mismo documento.

5 Las secuencias de polinucleótidos que codifican el polipéptido de fusión por lo tanto incluyen variantes modificadas conservadoramente, variantes polimórficas, alelos, mutantes, sub-secuencias, y homólogos inter-especie. En una modalidad en la cual el componente (b) comprende un polinucleótido, el
10 componente (b) puede comprender adicionalmente un adyuvante, o administrarse concomitante o secuencialmente con un adyuvante o agente estimulador inmunológico.

Los polinucleótidos pueden estar presentes dentro de cualquiera de una variedad de sistemas de liberación conocidos
15 por el experto en la técnica, incluyendo sistemas de expresión de ácido nucleico, sistemas de expresión de bacterias y virus. Las numerosas técnicas de liberación de gen son bien conocidas en la técnica, tal como las descritas por Rolland (1998) *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 75:143-198, y referencias citadas
20 en el mismo. Los sistemas de expresión de ácido nucleico apropiados contienen las secuencias de ADN necesarias para la expresión en el paciente (tal como una señal adecuada del promotor y de finalización). Los sistemas de liberación bacterianos implican la administración de una bacteria (tal como
25 *Bacillus Calmette-Guerin*) que expresa una porción inmunogénica

de la proteína de fusión en su superficie celular o secreta tal epítotope. En una modalidad, el ADN se puede introducir usando un sistema o vector viral (por ejemplo, vacuna, virus pox, retrovirus, o adenovirus), que puede implicar el uso de un virus competente de réplica no patogénico (defectuoso). Los sistemas adecuados se describen, por ejemplo, en Fisher-Hoch et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.E.U.U* 5(5:317-321; Flexner y col. (1989) *Ann. NY. Acad. Sci.* 569:86-103; Flexner y col. (1990) *Vaccine* 5:17-21; Patentes Norteamericanas Nos. 4,603,112, 4,769,330, 4,777,127 y 5,017,487; WO 89/01973; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner (1988) *Biotechniques* (5:616-627; Rosenfeld y col. (1991) *Science* 252:431-434; Kolls y col. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.E.U.U* 91:215-219; Kass-Eisler y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.E.U.U* 90:11498-11502; Guzman y col. (1993) *Circulation* 55:2838-2848; y Guzman y col. (1993) *Cir. Res.* 73:1202-1207. Las técnicas para incorporar el ADN en tales sistemas de expresión son bien conocidas por el experto en la técnica. El ADN también puede estar "expuesto", según lo descrita, por ejemplo, en Ulmer y col. (1993) *Science* 259:1745-1749 y según lo revisado por Cohen (1993) *Science* 259:1691-1692. La absorción del ADN expuesto se puede aumentar recubriendo el ADN sobre gránulos biodegradables, que se transportan eficientemente en las células.

Será evidente que una composición para vacuna o inmunogénica de la presente invención puede comprender un

polinucleótido y un componente de polipéptidos. Tales vacunas o composiciones inmunogénicas pueden proporcionar una inmunorrespuesta mejorada.

Los agentes estimuladores inmunológicos que se pueden
5 utilizar con una secuencia de polinucleótidos incluyen
imidazoquinolinas sintéticas tal como el imiquimod [S-26308,
R-837] o cualquier otra molécula conocida para estimular el
receptor 7 de tipo Toll, (Harrison, y col. 'Reduction of recurrent
HSV disease using imiquimod alone or combined with a
10 glycoprotein vaccine', Vaccine 19: 1820-1826, (2001)); y
resiquimod [S-28463, R-848] (Vasilakos, y col. 'Adjuvant activities
of immune response modifier R-848: Comparison with CpG ODN',
Cellular immunology 204: 64-74 (2000).), bases de Schiff de
carbonilos y aminas que se expresan constitutivamente en el
15 antígeno que presenta superficies celulares y de células T, tal
como tucaresol (Rhodes, J. y col. 'Therapeutic potentiation of the
immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs',
Nature 377: 71-75 (1995)), citosina, quimiocina y moléculas
co-estimuladores como proteínas o péptidos, éstas incluirían
20 citocinas pro-inflamatorias tal como interferones, interferones
particulares e inductores de GM-CSF, IL-1 alfa, IL-1 beta, TGF-
alfa y TGF-beta, Th1 tal como el interferón gamma, inductores
IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21, Th2 tal como IL-4, IL-5, IL-6,
IL-10 e IL-13 y otros genes de quimiocina y co-estimulantes tal
25 como MCP-1, MIP-1 alfa, MEP-1 beta, RANTES, TCA-3, CD80,

CD86 y CD40L, otros ligandos que dirigen estimuladores inmunológicos tal como CTLA-4 y L-selectin, proteínas y péptidos de estimulación de apoptosis tal como Fas, (49), lípidos sintéticos basados en adyuvantes tal como Vaxfectin, (Reyes y col. 5 'Vaxfectin enhance antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune responses to plasmid ADN immunization', Vaccine 19: 3778-3786) escualeno, alfa-tocoferol, polisorbato 80, DOPC y colesterol, endotoxina, [LPS], Beutler, B., 'Endotoxin, Toll-like receptor 4, and the afferent limb fo innate immunity', 10 Current opinion in Microbiology 3: 23- 30 (2000)); oligo- y di-nucleótidos CpG, Sato, Y. y col., 'Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gen immunization', Science 273 (5273): 352-354 (1996). Hemmi, H. y col., 'A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA', Nature 408: 740-745, 15 (2000) y otros ligandos potenciales que activan los receptores Toll para producir las citocinas que incluyen Th1, tal como lipoproteínas micobacterianas sintéticas, proteína micobacteriana p19, peptidoglican, ácido teicoico y lípidos A. Otras proteínas estimuladoras inmunológicas derivadas bacterianas incluyen, 20 toxina de cólera, toxina E.Coli y toxoides mutantes de la misma. Los ejemplos de adyuvantes para producir predominantemente una respuesta de tipo Th1 incluyen, por ejemplo, un derivado de lípidos A tal como el lípido A de monofosforilo, o el lípido A de monofosforilo 3-O-acilado. Los adyuvantes MPL® están 25 disponibles de Corixa Corporation (Seattle, WA; ver, por ejemplo,

Patentes Norteamericanas Nos. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 y 4,912,094). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en el cuál el dinucleótido CpG no está metilado) también inducen predominantemente una respuesta de Th1. Tales oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y en las Patentes Norteamericanas Nos. 6,008,200 y 5,856,462. Las secuencias de ADN estimuladoras inmunológicas también se describen, por ejemplo, por Sato y col., Science 273:352, 1996. Otro adyuvante que se puede utilizar comprende una saponina, tal como Quil A, o derivados de la misma, incluyendo QS21 y QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); quinoa saponinas Escin; Digitonin; o Gypsophila o Chenopodium.

En una modalidad de la presente invención, un oligonucleótido estimulador inmunológico que se puede incluir en un adyuvante se selecciona del grupo:

SEC ID NO: 22 - TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

SEC ID NO: 23 - TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

SEC ID NO: 24 - ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

SEC ID NO: 25 - TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

SEC ID NO: 26 - TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

Combinaciones

El componente (a) y el componente (b) se pueden utilizar en la combinación concomitante o secuencialmente en cualquier combinación terapéuticamente apropiada.

5 La combinación se puede utilizar de acuerdo con la invención mediante la administración concomitante de los componentes (a) y (b), por ejemplo (1) administrando una composición farmacéutica unitaria que comprende ambos componentes o (2) administrando concomitantemente a un sujeto
10 las composiciones farmacéuticas separadas, las cuales cada una comprende uno de los componentes.

En la modalidad en la cual los componentes (a) y (b) se administran por separado, la combinación se puede administrar al mismo tiempo o de una manera secuencial en la cual uno se
15 administra primero y el otro en segundo lugar o viceversa.

Según lo utilizado en la presente, la administración secuencial se refiere a la administración de los componentes (a) y (b) dentro de un periodo de tiempo biológicamente relevante. Los ejemplos de administración secuencial incluyen, por ejemplo, la
20 administración del segundo componente tan pronto como la administración del primero se termine; o administrando el segundo componente al momento en que el sujeto experimente los efectos biológicos del componente administrado en primer lugar. Así será evidente que cuando el componente (b) se
25 administre primero, el componente (a) se administra durante el

período de una inmunorrespuesta, por ejemplo una respuesta del anticuerpo y/o células T producida por el componente (b). En una modalidad de la presente invención en la cual el componente (b) se da en un régimen de inducción-refuerzo, el componente (a) se puede dar concomitante con una administración de "inducción" del componente (b).

Donde el componente (a) se administra primero, el componente (b) se administra durante el período de tiempo en que el componente (a) está presente en el cuerpo del sujeto. Será evidente para el experto en la técnica que los componentes se pueden administrar de una manera distinta a 1:1, por ejemplo, el componente (b) se puede administrar más de una vez, antes de la administración del componente (a); la administración del componente (b) puede ser seguida por la administración múltiple del componente (a) dentro de un periodo de tiempo biológicamente relevante, etc.

En una modalidad, el componente (a) se da antes que el componente (b). El componente (a) se puede dar una vez o más de una vez antes del componente (b).

En una modalidad adicional, el componente (b) se da antes que el componente (a). El componente (b) se puede dar una vez o más de una vez antes del componente (a). En una modalidad, el componente (a) se puede administrar a un individuo, en donde previamente se ha administrado al individuo la composición inmunogénica (b).

Se entiende que si el componente (b) se da más de una vez, una o más administraciones puede ser la de la proteína y una o más administraciones puede ser la del ADN.

La presente invención puede también incluir la
5 administración de por lo menos una terapia adicional de
tratamiento del cáncer en combinación concomitante o
secuencialmente en cualquier combinación terapéuticamente
apropiada con las combinaciones de la presente invención. La
terapia adicional de tratamiento del cáncer puede incluir la
10 radioterapia, terapia quirúrgica y/o por lo menos una terapia
adicional quimioterapéutica que comprende la administración de
por lo menos un agente anti-neoplástico adicional.

En una modalidad de la presente invención en la cual el
componente (b) se administra antes del componente (a), el
15 componente (b) se puede dar en un momento lo suficientemente
previo al componente (a) para permitir la generación de una
inmunorrespuesta, por ejemplo una respuesta del anticuerpo
policlonal. En una modalidad de la presente invención, el
componente (a) se puede dar en el pico de una inmunorrespuesta
20 generada contra el componente (b). En una modalidad, el
componente (a) se puede dar en el pico de la respuesta
anamnética (memoria).

Administración del Componente (a)

Mientras que sea posible que, para el uso en la terapia, los
25 compuestos de fórmula I, II, III, IV así como sales, solvatos y

derivados fisiológicamente funcionales de los mismos del componente (a), se puedan administrar como el químico crudo, es posible presentar el ingrediente activo como una composición farmacéutica. Por consiguiente, en una modalidad, el
5 componente (a) de la invención se proporciona como una composición farmacéutica que comprende los compuestos de fórmula I, II, III y/o IV, y de sales, solvatos, y derivados fisiológicamente funcionales de los mismos, y uno o más portadores, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente
10 aceptables.

Los portadores, diluyentes o excipientes deben ser aceptables en el sentido de compatibilidad con otros ingredientes de la formulación y no nocivos para el receptor de los mismos.

De acuerdo a otro aspecto de la invención también se
15 proporciona un proceso para la preparación de una formulación farmacéutica del componente (a), el proceso comprende mezclar un compuesto de fórmula I, II, III y/o IV, y/o sales, solvatos, y/o derivados fisiológicamente funcionales de los mismos, con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente
20 aceptables y proporcionar tal formulación farmacéutica en combinación con el componente (b) de la presente invención.

Los componentes de las composiciones farmacéuticas del componente (a) de la presente invención, se pueden formular para la administración mediante cualquier ruta, y la ruta
25 apropiada dependerá del cáncer específico que será tratado así

como de los sujetos que se tratarán. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas incluyen las destinadas a la administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo la bucal, sub-lingual, y transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo la intramuscular, sub-cutánea, intravenosa, y directamente en el tejido afectado), o en una forma adecuada para la administración mediante la inhalación o insuflación. Las formulaciones pueden, cuando sea apropiado, presentarse convenientemente en unidades de dosificación discretas y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas tal como cápsulas o tabletas; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o batidos comestibles; o emulsiones líquidas de aceite-en-agua o emulsiones líquidas agua/aceite.

Por ejemplo, para la administración oral en forma de una tableta o cápsula, el componente de fármaco activo se puede combinar con un portador inerte, oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable tal como etanol, glicerol, agua y similares. Los polvos son preparados moliendo el compuesto a un tamaño fino conveniente y mezclándolo con un portador farmacéutico molido similarmente tal como un carbohidrato comestible, como por ejemplo, almidón o manitol. Los agentes

de saborización, conservación, dispersión y coloración también pueden estar presentes.

Las cápsulas se elaboran preparando una mezcla de polvos según lo descrito anteriormente, y rellenando los revestimientos de gelatina formados. Los deslizantes y lubricantes tal como silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilenglicol sólido, se pueden agregar a la mezcla de polvo antes de la operación de rellenado. Un agente desintegrante o solubilizante tal como agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio, también se puede agregar para mejorar la disponibilidad del medicamento cuando se iniere la cápsula.

Por otra parte, cuando se desee o necesite los agentes aglutinantes, lubricantes, desintegrantes y colorantes adecuados también se pueden incorporar en la mezcla. Los aglutinadores adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tal como glucosa o beta-lactosa, endulzantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tal como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los desintegrantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantan y similares. Las tabletas son formuladas, por ejemplo, preparando una mezcla de polvo, granulando o triturando, agregando un lubricante y

desintegrante y comprimiendo en tabletas. Una mezcla de polvo es preparada mezclando el compuesto, moliendo adecuadamente, con un diluyente o base según lo descrito anteriormente, y opcionalmente, con un aglutinante tal como carboximetilcelulosa, aliginato, gelatina, o pirrolidona de polivinilo, una solución retardadora tal como parafina, un acelerador de resorción tal como una sal cuaternaria y/o un agente de absorción tal como bentonita, caolina o fosfato de dicálcico. La mezcla de polvo se puede granularse humedeciéndola con un aglutinante tal como jarabe, pasta de almidón, mucílago de acacia o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos y forzándola a través de un tamiz. Como una alternativa a la granulación, la mezcla de polvo se puede hacer pasar a través de la máquina de tabletas y el resultado son balas formadas imperfectamente rotas en gránulos. Los gránulos se pueden lubricar para evitar que se adhieran a las matrices de formación de tableta por medio de la adición de ácido esteárico, una sal de estearato, talco o aceite mineral. La mezcla lubricada entonces se comprime en tabletas. Los compuestos de la presente invención también se pueden combinar con un portador inerte de flujo libre y comprimir en tabletas directamente sin pasar a través de las etapas de granulación o golpeado. Se pueden proporcionar un recubrimiento protector claro u opaco consiste de un recubrimiento de sellado de goma laca, recubrimiento de azúcar o material polimérico y un recubrimiento pulido de cera. Los colorantes se pueden agregar a estos

recubrimientos para distinguir diferentes dosificaciones unitarias.

Los fluidos orales tal como soluciones, jarabes y elixires se pueden preparar en forma de unidades de dosificación a modo que una cantidad dada contenga una cantidad predeterminada del compuesto. Los jarabes se pueden preparar disolviendo el compuesto en una solución acuosa saborizada adecuadamente, mientras que los elixires se preparan a través del uso de un vehículo alcohólico no tóxico. Las suspensiones se pueden formular dispersando el compuesto en un vehículo no tóxico. También se pueden agregar solubilizantes y emulsificantes tal como alcoholes de isostearilo etoxilados y éteres de polloxi etilen sorbitol, conservadores, aditivos de sabor tal como aceite de hierbabuena o endulzantes naturales o sacarina u otros endulzantes artificiales, y similares.

Cuando es apropiado, las formulaciones de la unidad de dosificación para la administración oral se pueden microencapsular. La formulación también se puede preparar para prolongar o mantener la liberación como por ejemplo recubriendo o integrando el material de partículas dentro de polímeros, cera o similares.

Los componentes de las composiciones farmacéuticas de la presente invención también se pueden administrar en forma de sistemas de liberación de liposomas, tal como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas se pueden formar de

106

una variedad de fosfolípidos, tal como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

Los componentes de las composiciones farmacéuticas de la presente invención también se pueden liberar mediante el uso de anticuerpos monoclonales como portadores individuales a los
5 cuales se acoplan las moléculas del compuesto. Los compuestos también se pueden acoplar con polímeros solubles como portadores dirigibles del fármaco. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de piran,
10 polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspirtamida-fenol, o polietilenoóxido-polilisina sustituida con residuos de palmitoilo. Además, los compuestos se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles en la producción de la liberación controlada de un fármaco, por
15 ejemplo, ácido poliláctico, poliepsilon caprolactona, ácido butírico de polihidroxi, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la
20 administración transdérmica se pueden presentar como parches discretos con el propósito de mantenerse en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado. Por ejemplo, el ingrediente activo se puede liberar desde el parche por iontoforesis según lo descrito generalmente
25 en Pharmaceutical Research, 3(6), 318 (1986).

108

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica se pueden formular como ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, sprays, aerosoles o aceites.

5 Para el tratamiento ocular o de otros tejidos externos, por ejemplo boca y piel, las formulaciones se pueden aplicar como un ungüento o crema tópica. Cuando está formulado en un ungüento, el ingrediente activo se puede utilizar con una base de ungüento miscible en agua o parafínica. Alternativamente, el
10 ingrediente activo se puede formular en una crema con una base de crema de aceite-en-agua o una base de agua/aceite.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para las administraciones tópicas al ojo incluyen gotas oculares en donde el ingrediente activo se disuelve o suspende en un portador
15 adecuado, especialmente un solvente acuoso.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen grajeas, pastillas y enjuagues bucales.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la
20 administración rectal se pueden presentar como supositorios o enemas.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración nasal en donde el portador es un sólido incluyen un polvo crudo que tiene un tamaño de partícula por ejemplo en el
25 intervalo de 20 a 500 micrones, que se administrada un una

manera en la cual toma lugar la aspiración, es decir mediante la inhalación rápida a través del paso nasal de un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas en donde el portador es un líquido, para la administración como un spray nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas o de aceite del ingrediente activo.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración por inhalación incluyen polvo o pulverizaciones en partícula finas, que se pueden generar por medio de varios tipos de mediciones, los aerosoles de dosis presurizados, nebulizadores o insufladores.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración vaginal se pueden presentar como dispositivos intrauterinos, tapones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en spray.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostatos y solutos que producen la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de única dosis o multidosis, por ejemplo ampollas y frascos sellados, y se pueden almacenar en una condición de secado y congelado

(liofilizado) que requiere solamente la adición del portador líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones para inyección improvisadas se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y tabletas.

Se debe entender que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica, con respecto al tipo de formulación en cuestión, por ejemplo los adecuados para la administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

Una cantidad terapéuticamente efectiva del componente (a) de las composiciones farmacéuticas de la presente invención dependerá de un número de factores incluyendo, pero sin limitarse a, edad y peso del mamífero, trastorno exacto que requiere el tratamiento y su gravedad, naturaleza de la formulación, y ruta de la administración, y en última instancia del criterio del médico o veterinario tratante. Comúnmente, los componentes de las composiciones farmacéuticas de la presente invención serán dados para el tratamiento en el intervalo 0.1 a 100 mg/kg en peso corporal del receptor (mamífero) por día y más comúnmente en el intervalo de 1 a 10 mg/kg en peso corporal por día. Las dosificaciones diarias aceptables, pueden ser de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1000 mg/día, por ejemplo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 mg/día.

Administración del Componente (b)

Las rutas y la frecuencia de administración del componente (b) descrito en la presente, así como la dosificación, variarán de individuo a individuo, y se pueden establecer fácilmente usando técnicas estándares. En general, las composiciones inmunogénicas y/o vacunas se pueden administrar por inyección (por ejemplo, intracutánea, intramuscular, intravenosa o subcutánea), intranasal (por ejemplo, por aspiración) u oralmente. En una modalidad, entre 1 y 10 dosis se pueden administrar durante un período de 52 semanas. Se pueden administrar 6 dosis, en intervalos de 1 mes, y las vacunaciones de refuerzo se pueden dar después periódicamente. Los protocolos alternos pueden ser apropiados para los pacientes individuales. Una dosis adecuada es una cantidad de un compuesto que, cuando se administra según lo descrito anteriormente, es capaz de promover una inmunorrespuesta anti-tumoral, y está por lo menos 10-50% por encima del nivel básico (es decir, sin tratar). Para una vacuna, tal respuesta se puede monitorear midiendo los anticuerpos anti-tumorales en un paciente o mediante la generación dependiente de la vacuna de células efectoras citolíticas capaces de eliminar a las células tumorales del paciente in vitro. Tales vacunas también pueden ser capaces de causar una inmunorrespuesta que conduzca a un resultado clínico mejorado (por ejemplo, remisiones más frecuentes, supervivencia libre de enfermedad completa o parcial o más larga) en pacientes

vacunados con respecto a pacientes no vacunados.

En general, para las composiciones inmunogénicas y vacunas, la cantidad de cada inmunógeno presente en una dosis que oscila de aproximadamente 1 μ g a 5 mg, por ejemplo 100 μ g a 5 mg, o por ejemplo 5 μ g a 250 μ g por kg del hospedador. Los
5 tamaños de dosis adecuados variarán con el tamaño del paciente, pero oscilarán comúnmente de aproximadamente 0.1 ml a aproximadamente 5 ml.

En una modalidad, una inmunización inicial o primaria será
10 hecha con una composición inmunogénica de HER-2/neu según lo descrito en la presente, por ejemplo una proteína de fusión HER-2/neu que tiene, por ejemplo, por lo menos uno de ECD y/o ICD o PD, y también será hecha una inmunización subsiguiente o reforzadora. Las proteínas de fusión de ECD-ICD y/o ECD-PD
15 adecuadas para la inmunización incluyen las descritas en la presente. Será apreciado por el experto en la técnica que donde la composición inmunogénica de HER-2/neu es una proteína de fusión, la presente invención contempla el uso de una proteína de fusión HER-2/neu intacta así como la división de la proteína de
20 fusión Her-2/neu en una pluralidad de péptidos.

En general, una dosificación apropiada y el régimen de tratamiento proporcionan los compuestos activos en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico. Tal respuesta se puede monitorear estableciendo un
25 resultado clínico mejorado (por ejemplo, remisiones más

frecuentes, supervivencia libre de enfermedad completa o parcial, o más larga) en pacientes tratados con respecto a pacientes no tratados. La generación de inmunorrespuestas o el aumento de inmunorrespuestas preexistentes a una proteína HER-2/neu o proteína de fusión también puede indicar el uso de una cantidad suficiente del componente (b). Los aumentos en las inmunorrespuestas preexistentes se pueden correlacionar con un resultado clínico mejorado. Tales inmunorrespuestas se pueden evaluar generalmente usando los análisis estándares de proliferación, citotoxicidad o citocina, que se pueden realizar usando las muestras obtenidas de un paciente antes y después del tratamiento.

Células T

El componente (b) de la invención también puede, o alternativamente, comprender células T específicas para un polipéptido o proteína de fusión según lo descrito en la presente. Tales células pueden generalmente prepararse *in vivo* o *ex vitro*, usando procedimientos estándares. Por ejemplo, las células T se pueden aislar de la médula ósea, sangre periférica o de una fracción de la médula ósea o sangre periférica de un paciente, usando un sistema de separación celular comercialmente disponible (ver también las Patentes Norteamericanas Nos. 5,240,856 y 5,215,926; los documentos WO 89/06280; WO 91/16116 y WO 92/07243). Alternativamente, las células T se pueden derivar de humanos, mamíferos no humanos, líneas

celulares o cultivos, relacionados o sin relación.

Las células T se pueden estimular con un polipéptido, polinucleótido y/o un antígeno que presenta la célula (APC) que expresa tal polipéptido. Tal estimulación se realiza bajo
5 condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la generación de células T que son específicas para el polipéptido de fusión. El polipéptido o polinucleótido puede estar presente dentro de un vehículo de liberación, tal como una microesfera, para facilitar la generación de células T específicas.

10 Se considera que las células T son específicas para un polipéptido de fusión HER-2/neu si las células T eliminan las células objetivo recubiertas con el polipéptido de fusión o expresando un polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión. La especificidad de las células T se puede evaluar
15 usando cualquiera de una variedad de técnicas estándares. Por ejemplo, dentro de un análisis de liberación de cromo o análisis de proliferación, un índice de estimulación del aumento de más de dos veces en lisis y/o proliferación, con respecto a los controles negativos, indica la especificidad de las células T. Tales análisis
20 se pueden realizar, por ejemplo, según lo descrito en Chen y col. (1994) Cancer Res. 54:1065-1070. Alternativamente, la detección de la proliferación de células T se puede lograr mediante una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, la proliferación de células T se puede detectar midiendo la velocidad aumentada de
25 síntesis de ADN (por ejemplo, por cultivos de marcación a pulso

de las células T con timidina tritiada y midiendo la cantidad de timidina tritiada incorporada en el ADN). El contacto con un polipéptido de fusión HER-2/neu (100 ng/ml - 100 µg/ml, por ejemplo 200 ng/ml - 25 µg/ml) durante 3-7 días debe dar lugar por lo menos a un aumento de dos veces en la proliferación de las células T. El contacto según lo descrito anteriormente durante 2-3 horas debe dar lugar a la activación de las células T, según lo medido usando los análisis estándares de citocina en los cuales un aumento de dos veces en el nivel de liberación de citocina (por ejemplo, TNF o IFN γ) es indicativo de la activación de células T (ver Coligan y col., Current Protocols in Immunology, vol. 1, Wiley Interscience (Greene 1998)). Las células T que se han activado en respuesta al polipéptido de fusión HER-2/neu, polinucleótido o APC que expresa el polipéptido de fusión pueden ser CD4+ y/o CD8+.

HER-2/neu - células T específicas se pueden expandir usando técnicas estándares. Dentro de algunas modalidades, las células T se derivan de un paciente, o de un donante relacionado o no relacionado, y se administran al paciente después de la estimulación y expansión.

Para los propósitos terapéuticos, las células T CD4+ ó CD8+ que proliferan en respuesta a un polipéptido HER-2/neu, polinucleótido o APC de se pueden expandir en un número *in vitro* o *in vivo*. La proliferación de tales células T *in vitro* se puede lograr en una variedad de maneras. Por ejemplo, las células T se

pueden re-exponer un polipéptido HER-2/neu con o sin la adición de factores de crecimiento de células T, tal como interleucina-2, y/o células estimuladoras que sintetizan un polipéptido HER-2/neu. Alternativamente, una o más células T que proliferan en presencia de una proteína HER-2/neu se pueden expandir en un número mediante la clonación. Los métodos para clonar las células son bien conocidos en la técnica, e incluyen limitar la dilución. Después de la expansión, las células se pueden administrar nuevamente al paciente según lo descrito, por ejemplo, por Chang y col. (1996) Crit. Rev. Oncol. Hematol. 22:213.

Células Dendríticas

El componente (b) de la invención también puede, o alternativamente, comprender las células dendríticas específicas (DCS, por sus siglas en inglés) para un polipéptido o proteína de fusión según lo descrito en la presente. Tales células pueden prepararse generalmente *in vitro* o *ex vivo*, usando procedimientos estándares. Un ejemplo de un método que se pueda utilizar se describe en el documento WO01/74855, incorporado en la presente por referencia.

En una modalidad, el mamífero en los métodos y usos de la presente invención es un humano.

Ejemplo de un Método de Preparación del Componente (a)

La base libre, sales de HCl, y sales de ditosilato del compuesto de fórmula (I) se pueden preparar de acuerdo a los

procedimientos de la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/EP99/00048, presentada el 8 de enero de 1999, y publicada como WO 99/35146 el 15 de julio de 1999, con referencia a la anterior y a la Solicitud de Patente Internacional No. 5 PCT/US01/20706, presentada el 28 de junio de 2001 y publicada como WO 02/02552 el 10 de enero de 2002, y de acuerdo a los ejemplos apropiados citados posteriormente. Tal procedimiento para preparar la sal de ditosilato del compuesto de fórmula (I) se presenta más adelante en el esquema de reacción 1.

Esquema de Reacción 1

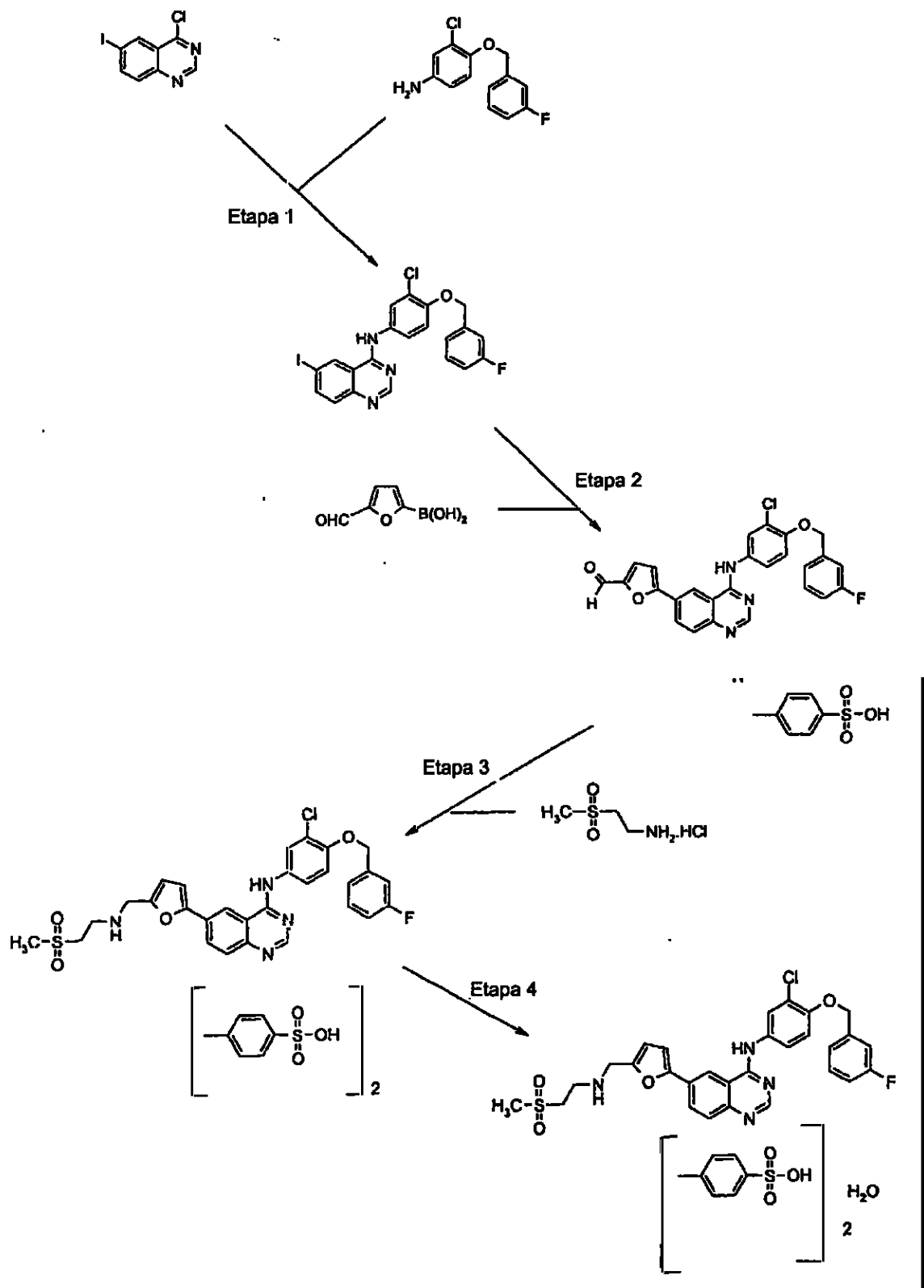
5

10

15

20

25



En el esquema de reacción 1, la preparación de la sal de ditosilato del compuesto de fórmula (III) procede en cuatro etapas: Etapa 1: Reacción el compuesto bicíclico indicado y amina para dar el derivado indicado de yodoquinazolina; Etapa 2: preparación de la sal correspondiente de aldehído; Etapa 3: preparación de la sal de ditosilato de quinazolina; y etapa 4: preparación de la sal de ditosilato de monohidrato.

Los ejemplos de cómo preparar las proteínas de fusión del componente (b) se describen en el documento WO00/44899 (US2002/0177567).

Los métodos, usos, combinaciones y composiciones de la presente invención pueden ser útiles para administrar a un paciente que padece cáncer, por ejemplo de, seno, ovario, colón, pulmón o próstata. En una modalidad, el cáncer es un cáncer que sobreexpresa erbB2, tal como el cáncer de seno que sobreexpresa erbB2. Según lo utilizado en la presente, "tratar el cáncer" no requiere que el sujeto sea curado. Como sera evidente para el experto en la técnica, los resultados clínicos acertados al tratar el cáncer incluyen un tiempo de supervivencia más largo, un tiempo más largo al progreso de la enfermedad, respuesta parcial, así como la remisión del cáncer.

Uso de Survivina como Marcador Biológico

Los resultados proporcionados en la presente indican que la apoptosis mejorada de células tumorales en células cancerigenas que sobreexpresan erbB2 después la terapia combinada (usando

un inhibidor dual de EGFR/erbB2 tal como lapatinib y anticuerpos anti-Her-2/neu inducidos por la vacuna) se asoció más estrechamente a la disminución-regulación de la proteína survivina, que con la disminución-regulación de las trayectorias de MAPK-Erk1/2 o PBK-Akt. Esto proporciona un razonamiento biológico para usar tal terapia combinada, y para usar los niveles de survivina como un marcador biológico para la eficacia de tales terapias combinadas.

La survivina es un miembro del inhibidor de la familia de la apoptosis de las proteínas (IAP, por sus siglas en ingles). La expresión de la proteína survivina fue inhibida en las células BT474 tratadas con lapatinib solo (figura 12A, parte inferior); en contraste, pAb o trastuzumab tienen poco efecto sobre la survivina (figura 12A, parte inferior). Combinar lapatinib con pAb o trastuzumab inhibió la survivina en un mayor grado (figura 12A, parte inferior) en las células BT474. Similarmente, la apoptosis se mejoró en las células BT474 tratadas con lapatinib y pAb o trastuzumab combinados, con respecto a lapatinib solo (figura 12A, parte inferior). Los resultados presentados en la presente usando las células SKBR3 muestran una relación similar entre la inhibición de survivina y la apoptosis mejorada después de la terapia combinada, aunque a un grado menor que en las células BT474 (figuras 16 y 17).

Así los presentes resultados indican que la disminución-regulación de survivina en respuesta a la

combinación de lapatinib y anticuerpos anti-ErbB2, está correlacionada con la apoptosis mejorada (con respecto a la disminución-regulación de pErk1/2 o pAkt). En los presentes ejemplos, las condiciones de tratamiento que inhibieron la

5 proteína survivina la mayoría (lapatinib combinado con pAb o trastuzumab) resultaron en la apoptosis marcada de células tumorales.

Así una modalidad adicional de la presente invención se relaciona con el uso de survivina como un marcador biológico en

10 el tratamiento del cáncer con inhibidores duales de cinasa de EGFR/erbB2, tal como los compuestos del componente (a) descritos en la presente.

Los cambios en los niveles de varias proteínas específicas en el tejido tumoral en respuesta al tratamiento con un inhibidor

15 dual de tirosina cinasa de EGFR/erbB2 se han sugerido como útiles en la determinación de si el tumor de un paciente está respondiendo a la terapia. Ver por ejemplo, los documentos WO2005/017493; WO2004/000094. Los presentes resultados indican que los niveles de survivina en células o tejidos tumorales

20 que sobreexpresan erbB2, se pueden utilizar para pronosticar la probabilidad de que un paciente con tal tumor responda favorablemente al tratamiento con un inhibidor dual de tirosina cinasa de EGFR/erbB2 según lo descrito en la presente, o al tratamiento con una combinación del componente (a) y (b) según

25 lo descrito en la presente. Los sujetos cuyas células tumorales

han disminuido los niveles de survivina después de un período inicial de tratamiento (disminuido con respecto a los niveles de pre-tratamiento), son más probables que tengan una respuesta clínica favorable a tal tratamiento que los sujetos con los niveles de survivina son cambios o aumentados en células tumorales después de un período inicial de tratamiento. En contraste, los sujetos con los niveles de survivina sin cambios o aumentados después de un período inicial de tratamiento son menos probables que tengan una respuesta clínica favorable, y que se puedan beneficiar de tratamientos alternos.

La survivina se puede medir mediante cualquier medio adecuado como se conoce en la técnica. Según lo utilizado en la presente, un sujeto o paciente se refiere a un mamífero, incluyendo humanos, que padecen un tumor sólido que sobreexpresa erbB2. Según lo utilizado en la presente, una 'respuesta clínica favorable' a un tratamiento se refiere a una respuesta biológica o física que es reconocida por los expertos en la técnica mientras que indica una cantidad disminuida del crecimiento tumoral, con respecto al crecimiento tumoral que ocurriría en ausencia de cualquier tratamiento; no significa que indique una cura. Los niveles del pre-tratamiento con survivina se determinan dentro de un período biológicamente relevante antes del tratamiento, preferiblemente dentro de un periodo de un mes, dos semanas, diez días, o una semana antes del tratamiento. Después de que un período inicial de tratamiento

haya pasado, los niveles de survivina en el tejido tumoral se determinan nuevamente.

Ejemplos

La invención ahora será descrita más a fondo, con
5 referencia a los siguientes ejemplos no limitados:

Ejemplo 1

Introducción

Según lo mostrado por los siguientes ejemplos, la
vacunación de animales con la proteína dHER2 recombinante
10 indujo una respuesta específica al anticuerpo policlonal en la
molécula de HER2/neu.

Los experimentos descritos en la presente han mostrado que
los anticuerpos policlonales inhiben el crecimiento de las células
que sobreexpresan HER2 en modelos *in vitro*.

15 Los ejemplos proporcionados en la presente evaluaron el
efecto anti-proliferativo de estos anticuerpos policlonales anti-
HER2 (pAb) generados por la vacuna en combinación con
Lapatinib, un inhibidor específico de tirosina cinasa para las
moléculas de HER2/neu y EGFR, en las células humanas de
20 cancer de seno que sobreexpresa la molécula de HER2/neu
(BT474 y SKBR3).

Métodos y Materiales

Ejemplo 2

***Construcción de la codificación del Plásmido de Expresión
25 para la Proteína HER2/neu***

Se ha establecido una línea celular estable de CHO-K1, que produce una glicoproteína de Her2/neu recombinante. La proteína se secretada en el medio de cultivo celular, del cual se purifica posteriormente.

5 Brevemente, el sADNc que corresponde al dominio extracelular de la molécula de HER2/neu (ECD: AA 1-653) y a la región de fosforilación (PD) del dominio intracelular (ICD: AA 991-1255) fue amplificado por RT-PCR (Clontech) comenzando con ARNm preparado a partir de una muestra del tumor de seno. Los
10 2 sADNc después se ligaron y clonaron en un vector de higromicina pcADN3.1 y un fragmento de restricción de HindII-XbaI (2782 bp de largo) fue reproducido en un vector de expresión de CHO K1-Glutamina Sintasa (pEE14I Celltech). Éste plásmido fue nombrado pEE14-ECD-PD#13 también llamado pRIT
15 15050 y utilizado para células CHO-K1 transfectadas establemente (derivadas de MCB 024M de Lonza), usando el procedimiento clásico de co-precipitación de CaPO₄. Los clones transfectados se seleccionaron en GMEM (medio de Glasgow Minimal Eagle) sin glutamina, complementados con 5% de
20 glutamato (New Zealand) de suero bovino fetal, asparragina, nucleósidos y 30 μ M de MSX como reactivo selectivo. Un clon (#13002) se seleccionó en base a su nivel de expresión. La proteína expresada de forma recombinante es una versión
25 truncada del receptor de factor de crecimiento HER2/neu que consiste de una fusión del dominio extracelular (ECD) y una parte

de fosforilación (PD) C-terminal del dominio intracelular (ICD),
excluyendo la porción de transmembrana y el radical de
fosfocinasa del receptor. Esta proteína dHER2 recombinants es
secretada eficientemente de las células CHOK1 y se purifica del
5 supernadante del cultivo celular.

Ejemplo 3

Purificación de la Proteína HER2/neu (dHER2)

La cosecha del cultivo fue sometido a la separación
cromatográfica en una columna Q Sepharose FF de intercambio
10 de aniones (Amersham) equilibrada en 20 mM de amortiguador de
propano de Bis-Tris con un pH 6.5 que contiene 150 mM de
cloruro de sodio (NaCl). El antígeno se enjuagó desde la
columna aumentando la concentración de NaCl en el mismo
amortiguador de equilibrio. Después de la adición de fosfato, el
15 eluido positivo del antígeno se hizo pasar a través de 2 columnas
sucesivas de afinidad, una columna de del tipo I Macro-Prep
Ceramic Hydroxyapatite (Bio-Rad) equilibrada en un amortiguador
de fosfato de 40 mM con pH 7.0 seguida por una columna Blue
Trisacril plus LS (Biosepra) equilibrada en un amortiguador de
20 fosfato de 10 mM con pH 7.0. Después de la adición de sulfato
de amonio (AMS, por sus siglas en ingles) y del ajuste de pH
(7.0), el flujo continuo de Blue Trisacril que contiene el antígeno,
entonces fue inyectado en una columna hidrofóbica Ether
Toyopearl 650 M (TosoHaas) equilibrada en un amortiguador de
25 fosfato de 10 mM con pH 7.0 que contiene 1.2 M de AMS. El

antígeno se enjuagó desde la columna disminuyendo la concentración de AMS en el mismo amortiguador de fosfato. El eluido positivo del antígeno se concentró, después diafiltró contra el amortiguador final de fosfato de 5 mM con pH 7.0 en una
5 membrana Biomax de 10 kDa (Millipore). El concentrado de la ultrafiltración fue sometido a una etapa de nanofiltración (membrana Planova 15 N, Asahi) y el permeado resultante fue entonces filtrado estéril a través de 0.22 μ m de membrana Durapore (Millipore). El material purificado se almacenó a -20°C.

10 **Ejemplo 4**

Composición Inmunogénica o para Vacuna

La composición inmunogénica usada en los presentes ejemplos comprende la proteína de ECD-PD (conocido como un constructo "eliminado" de Her-2/neu, o "dHER2") formulada
15 extemporáneamente, o el día antes de la inyección con un sistema de adyuvante propietario GSK Bio que comprende una formulación de liposomas de 50 μ g de 3D-MPL (Corixa, Seattle, WA, E.E.U.U.), 50 μ g de QS21 (Antigenics, New York, NY, E.E.U.U.) mezclada con 500 μ g de oligonucleótidos CpG 2006
20 (también conocidos como ODN 7909) (Coley Pharmaceuticals).

Ejemplo 5

Líneas Celulares y Reactivos

Las células BT474 y SKBR3 se obtuvieron de American Type Culture Collection (Manassas, VA, E.E.U.U.) y cultivaron en
25 DMEM complementado con 10% de suero bovino fetal.

726

El anticuerpo de survivina anti-humano fue de RD System (Minneapolis, Minnesota, E.E.U.U.). IgG anti-ratón fue de Rockland (Gilbertsville, PA, E.E.U.U.). Los anticuerpos para fosfotirosina y actina se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.E.U.U.). Los anticuerpos anti-ErbB1 (Ab-12) y anti-ErbB2 (Ab-11) fueron de Neo Markers (Union City, CA, E.E.U.U.). Anti-fosfo-AKT (Ser 437) fue de Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, E.E.U.U.). Los anticuerpos anti-Akt1/2, anti-fosfo-Erk1/2, anti-Erk1 y anti-Erk2 se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, E.E.U.U.). Trastuzumab se adquirió de Genentech Inc. (South San Francisco, CA, E.E.U.U.). El kit Guava PCA 96 Nesis se adquirió de Guava Technologys Inc. (Hayward, Ca, E.E.U.U.). SuperSignal West Femto Maximum Sensivity Substrate de Pierce (Rockford, IL, E.E.U.U.). La agarosa Protein G se adquirió de Boehringer Mannheim (Alemania). GW572016 (lapatinib) se sintetizó según lo descrito (Cockerill y col., Bioorg Med. Chem. Lett, 11:1401-1405 (2001)). Lapatinib para el trabajo de cultivo celular se disolvió en DMSO (Xia y col., Oncogen 21:6255-63 (2002)).

20 **Ejemplo 6**

Animales

Los conejos Female New Zealand White vacunados con la proteína dHER2 en el adyuvante se utilizaron como la fuente de suero para los experimentos de inhibición de crecimiento *in vitro*. Brevemente los conejos se vacunaron intramuscularmente 3

112B'

semanas separadas con 100 μ g de proteína dHER2 formulada en el sistema de adyuvante de liposoma según lo descrito en el ejemplo 4. Una inyección reforzadora se dio el día 161 y los sueros se tomaron 14 días después. La fracción de IgG del suero se purificó en sefarosa de proteína A y concentró a 10mg/ml.

La selectividad de pAb para ErbB2 sobre ErbB1 y ErbB3 se demostró mediante la inmunoprecipitación y el análisis Western Blot en las células BT474 (datos no mostrados). En contraste al anticuerpo monoclonal tal como trastuzumab, los anticuerpos policlonales se caracterizan por un espectro de afinidades de unión contra los epítopes múltiples de un inmunogen objetivo.

Ejemplo 7

Determinación de la Apoptosis: Manchado Annexin V y Citometría de Flujo

Las células determinadas usando el manchado Annexin V y citometría de flujo se trataron en placas con 6 pozos con DMSO, lapatinib, pAb, suero de conejos pre-inmunizados (referido en la presente como 'pAB pre-inmune' o TA2021), Trastuzumab, y/o Gefitinib a las concentraciones según lo indicado en las leyendas de las figuras de las figuras 12A, 12C, 15A y 16. Después de cosechar las células con trypsin-EDTA, 5000 células en 50 μ l se muestrearon en microplacas de 96 pozos. Las células se mancharon directamente en el microplaca con Annexin V-PE y Nexin 7 AAD en 1X Nexin Buffer en un volumen de reacción final de 200 μ l. Después de la incubación durante 20 minutos a

temperatura ambiente, las muestras de reacción se prepararon para adquirirse en el sistema Guava PCA-96 (Guava Technology, Inc., Hayward, CA, E.E.U.U.).

7-AAD se une al material nuclear celular después de que las
5 membranas celulares se rompan en la apoptosis posterior. El
manchado Annexin-V indicó los cambios apoptóticos previos que
preceden la pérdida de integridad de la membrana celular. El uso
de Annexin-V en combinación con 7-amino-actinomicina D (7-
AAD) así puede identificar las células apoptóticas previas y
10 posteriores.

Los resultados de la citometría de flujo se representaron
gráficamente como los resultados en grafica de puntos (no
mostrados) con Annexin V en el eje X y 7-AAD en el eje Y. La
Annexin V bajo y 7-AAD baja representan las células viables;
15 Annexin V bajo y 7-AAD alta indican los restos nucleares; las
células con manchado Annexin V alto indicaron las células
apoptóticas. Los gráficos proporcionados en las figuras 12A,
12C, 15A, y 16 muestran el porcentaje de células apoptóticas
(Annexin V alto) con respecto a las células totales.

20 ***Ejemplo 8***

Niveles de Proteína Celulares: SDS-PAGE y Análisis Western Blot

Para determinar los niveles de varias proteínas en las
células, los extractos celulares completos se prepararon raspando
25 las células de los platos de petri, lavando los gránulos celulares

dos veces en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), y después suspendiendo nuevamente el gránulo en dos hematocritos (packed-cell volume) de amortiguador de RIPA (150 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 0.25% (p/v) desoxicolato, 1% de NP-40, 5 mM de ortovanadato de sodio, 2 mM de fluoruro de sodio, y un cóctel inhibidor de proteasa). Las concentraciones de proteína se determinaron usando una modificación del método Bradford (Bio-Rad Laboratory). El lisato celular se clarificó por centrifugación; y ErbB1, ErbB2 y ErbB3 se inmunoprecipitaron por separado a partir de 200 μ g de lisato con 3 μ g de anti-ErbB1 (Ab-13, NeoMarkers), anti-ErbB2 (Ab-11, NeoMarkers), anticuerpos anti-ErbB3 (C-17, Santa Cruz Biotechnology), o 5 μ g de pAb y 20 μ l de proteína A+G-Sepharose. Los inmunoprecipitados se separaron mediante 4-15% de electroforesis de gel de agarosa de SDS-poliacrilamida de gradiente (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), y los receptores ErbB se detectaron por Western Blot con anticuerpos del receptor anti-ErbB.

Los niveles en estado estacionario de survivina, ErbB2 total, ErbB2 fosforilado (pErbB2 o pTyr), Erk1/2 total, Erk1/2 activado (p-Erk), pErbB3 total, pErbB3 activado (pErbB3), proteína AKT total y proteína Akt activada (p-Akt) se determinaron por Western Blot. Los niveles de pErbB2 se determinaron usando un anticuerpo que se une a las formas múltiples tirosina-fosforiladas de ErbB2 (es decir, el anticuerpo no tuvo un sitio de fosforilación

específico). Los niveles de proteína en estado estacionario de la actina sirvieron como control para la carga igual de la proteína.

Para Western Blot, las cantidades iguales de proteínas se resolvieron por 7.5% o 4-15% de electrophoresis de gel de SDS-poliacrilamida de gradiente bajo condiciones de reducción. Las proteínas se transfirieron a membranas de Immobilon-P o de nitrocelulosa. La eficacia y carga igual de las proteínas se evaluaron mediante el manchado Ponceau S. Las membranas se bloquearon durante 1 hora en TBS (25 mM de Tris-HCL pH 7.4, 150 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl) que contiene 4% (p/v) de leche baja en grasa o 3% de BSA (p/v). Las membranas entonces se examinaron con anticuerpos específicos que reconocen las proteínas objetivo que se visualizaron con el kit SuperSignal West Femto Maximum Sensivity Substrate (Pierce) o Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR, Lincoln, NE, E.E.U.U.).

Ejemplo 9

Análisis de inhibición del Crecimiento In Vitro (Anti-Proliferación)

El efecto antiproliferativo de los anticuerpos anti-HER2 policlonales (pAb) inducidos por la vacuna en combinación con Lapatinib se evaluó en las células humanas de cáncer de seno que sobreexpresan la molécula de HER2/neu (células BT474 y SKBR3) usando el método de incorporación de timidina [³H]. Brevemente, las células 10e4 se sembradas en 200 µl, por triplicado, en placas de 96 pozos e incubaron durante 72 h a 37°C en

- 1) medio;
- 2) medio que contiene Lapatinib solo (0.01 μ M);
- 3) medio que contiene pAb solo (50 μ g/ml);
- 4) medio que contiene pAb pre-inmune (TA2021) (50
5 μ g/ml);
- 5) una combinación de (2) Lapatinib (0.01 μ M) y (3) pAb
(50 μ g/ml); o
- 6) una combinación de (2) Lapatinib (0.01 μ M) y (4) pAb
pre-inmune (TA2021) (50 μ g/ml).

10 Se agregó 1 μ Ci de timidina [^{3} H] (5 Ci/mmol; Amersham)
durante 24 h adicionales después de lo cual las células se
cosecharon por tripsinización en placas de filtro y la radiactividad
incorporada se contó en un contador beta. Los resultados se
expresaron en CPM y el porcentaje de inhibición de crecimiento
15 se calculó refiriéndose al medio.

Las curvas del intervalo de dosis se establecieron para
Lapatinib y pAb (datos no mostrados). Las dosis sub-óptimas de
cada componente, induciendo solamente 10-30% de inhibición de
crecimiento se eligieron para poder ver efectos potenciales
20 sinérgicos o del aditivo.

Los IgG purificados de los conejos no vacunados (pAb pre-
inmune) se utilizaron como controles negativos en estos análisis.

Los experimentos se han realizado por lo menos tres veces
independientemente y se proporcionan en las figuras 11A y 11B
25 los datos combinados para los pozos triplicados de un

experimento representativo.

Ejemplo 10

Resultados: Efecto antiproliferativo

La vacunación de conejos con la proteína dHER2
5 recombinante formulada en un adyuvante fuerte, indujo una
respuesta específica del anticuerpo policlonal para la molécula
HER2/neu.

El efecto antiproliferativo de estos anticuerpos policlonales
anti-HER2 (pAb) en combinación con Lapatinib, un inhibidor
10 específico tirosina cinasa para las moléculas de HER2/neu y
EGFR, fue evaluado en las células humanas de cáncer de seno
que sobreexpresan la molécula de HER2/neu (BT474 y SKBR3).
Los datos se muestran en las figuras 11A y 11B.

Ejemplo 11

15 **Resultados (Niveles de Apoptosis y Proteína)**

Todos los resultados según lo mostrado en las figuras 12A,
12C, 12D, 13, 14, 15A, 15B, 15C, 16 y 17 son representativos de
por lo menos tres experimentos independientes.

Como puede observarse en las figuras 12A, B y C, Lapatinib
20 y los anticuerpos anti-HER-2/neu (pAb) inducidos por la vacuna
de sinergizan para inducir la apoptosis de las células BT474 que
sobreexpresan ErbB2 (HER-2/neu).

La figura 12A muestra los resultados de tratar BT474 de
crecimiento exponencial con (i) DMSO solo (control negativo para
25 lapatinib), (ii) lapatinib (0.1 μ M), (iii) pAb (100 μ g/ml), (iv)

lapatinib y pAb, (v) TA2021 (100 $\mu\text{g/ml}$), (vi) lapatinib y TA2021, (vii) trastuzumab (10 $\mu\text{g/ml}$), o (viii) lapatinib y trastuzumab después de 72 horas, la apoptosis se determinó usando el manchado Annexin V y la citometría de flujo. Los niveles en estado estacionario de la proteína de fosfo-ErbB2 activado (p-ErbB2), ErbB2 total, y survivina, también se determinaron después de 72 horas usando la técnica Western Blot (figura 12A, panel inferior). Los niveles en estado estacionario de la proteína de actina sirvieron como un control para la carga igual de la proteína. Las células BT474 tratadas con el vehículo (DMSO) o TA2021 sirvieron como controles para lapatinib y pAb, respectivamente.

La figura 12B muestra que los efectos de las condiciones de tratamiento variadas en el crecimiento de células BT474 (después de 72 horas) usando la microscopia de fase de contraste. Las condiciones de tratamiento incluyeron las descritas para la figura 12 A, y adicionalmente, gefitinib (Iressa) (0.1 μM); gefitinib (0.1 μM) y pAB (100 $\mu\text{g/ml}$); gefitinib (0.1 μM) y TA2021 (100 $\mu\text{g/ml}$); y gefitinib 0.1 μM y trastuzumab (10 $\mu\text{g/ml}$).

La figura 12C muestra los efectos de aumentar las concentraciones de pAb solo o en combinación con lapatinib (100 nM) sobre la apoptosis en las células BT474 usando el manchado Annexin V y la citometría de flujo.

La figura 12D muestra los niveles en estado estacionario de la proteína de ErbB2 y p-ErbB2 totales en células tratadas con las

condiciones aumentas de pAb solo o en combinación con lapatinib (100 nM), determinados por la técnica Western Blot. Los niveles en estado estacionario de la proteína de actina sirven como control para la carga igual de la proteína.

5 La figura 13 muestra el estado de activación de Erk1/2 y Akt se modula en respuesta a lapatinib y a los anticuerpos anti-HER-2/neu (pAb) inducidos por la vacuna. Las células de crecimiento exponencial BT474 se cultivaron durante 72 horas bajo las condiciones de tratamiento descritas. Los niveles en estado
10 estacionario de la proteína de Erk1/2 total, fosfo-Erk1/2 activado, Akt total, y fosfo-Akt activado, se determinaron por la técnica Western Blot. Las células tratadas con el vehículo (DMSO) o TA2021 solo sirvieron como controles.

La figura 14 muestra los efectos de lapatinib y de los
15 anticuerpos anti-HER-2/neu (pAb) inducidos por la vacuna en el estado de activación de ErbB3. Las células BT474 se cultivaron bajo varias condiciones de tratamiento, según lo mostrado. Después de 72 horas, los lisatos celulares se recolectaron y los niveles en estado estacionario de la proteína de ErbB3 total y
20 fosfo-ErbB3 activado se determinaron por la técnica Western Blot.

La figura 15 muestra las diferencias entre lapatinib y gefitinib en su capacidad de estar sinergizados con los anticuerpos anti-HER-2/neu (pAb) inducidos por la vacuna para inducir la apoptosis de células BT474 y modular la survivina.
25 Gefitinib (Iressa o zdl839) es un inhibidor de tirosina cinasa de

proteína de EGFR.

La figura 15A muestra los resultados usando las células BT474 en la fase de crecimiento exponencial, cultivadas durante 72 horas bajo las condiciones de tratamiento indicadas. La apoptosis se determinó usando el manchado Annexin V y citometría de flujo.

Las figura 15B muestra os resultados del análisis Western Blot de los niveles en estado estacionario de la proteína de ErbB2 total, p-ErbB2, y survivina después de 72 horas en las células BT474 cultivadas bajo las condiciones de tratamiento indicadas.

La figura 15C muestra los efectos de las condiciones de tratamiento indicadas sobre los niveles en estado estacionario de la proteína de Erk1/2 total, p-Erk1/2, Akt total, y p-Akt en las células BT474, determinado por la técnica Western Blot después de 72 horas de tratamiento.

La figura 16 muestra los efectos de las condiciones de tratamiento indicadas sobre las células SKBR3. Después de 72 horas, la apoptosis se determinó usando el manchado Annexin V y la citometría de flujo.

La figura 17 muestra los efectos de las condiciones de tratamiento indicadas sobre la survivina en las células SKBR3 después de 72 horas de tratamiento.

La figura 18 muestra los efectos de lapatinib y los anticuerpos anti-Her-2/neu sobre pTyr/ErbB12 y de los marcadores biológicos descendentes en las células SkbR3, según

lo indicado.

Según lo demostrado en las figuras discutidas anteriormente, el tratamiento con lapatinib, pAb, o trastuzumab como monoterapias dio lugar a un aumento ligero en la apoptosis (figura 12A, panel superior) con respecto a los controles (DMSO, TA2021). La combinación de lapatinib con pAb o trastuzumab dio lugar a la apoptosis mejorada de células tumorales con respecto a cualquier tratamiento solo (figura 12A, panel superior). Aumentando la concentración de pAb por sí mismo tuvo poco impacto sobre la apoptosis (figura 12C). Cuando se combinó con una concentración establecida de lapatinib, el aumento de la concentración de pAb dio lugar a la apoptosis mejorada de células B474 (figura 12C). Similarmente, combinando lapatinib con pAb también mejoró la apoptosis de las células SKBR3, otra línea celular de cáncer de seno que sobreexpresa ErbB2, aunque menos de lo observada en las células BT474 (figura 16).

También según lo mostrado en las figuras discutidas anteriormente, los niveles en estado estacionario de la proteína activada y fosforilada ErbB2 (pErbB2) se inhibieron mediante lapatinib solo, sin afectar la proteína ErbB2 total (figura 12A, panel inferior). Lapatinib también redujo los niveles en estado estacionario de pErk1/2 y pAkt (figura 13). En contraste, pAb inhibió de forma marcada la proteína ErbB2 total sin afectar ErbB2 (activada) fosforilada (figura 12A, panel inferior). Fosfo-Erk1/2 y pAkt también fueron inhibidas de forma marcada

por pAb (figura 13). En los presentes estudios, trastuzumab causó menos efecto sobre ErbB2 total con respecto a pAb, aunque inhibió ligeramente pErbB2 (figura 12A, panel inferior). Adicionalmente, pErk1/2 y pAkt también fueron inhibidas por trastuzumab, aunque
5 menos de lo observado con pAb (figura 13). Combinar lapatinib con pAb dio lugar a la inhibición adicional de pErbB2 con respecto a lapatinib solo (figura 12A, panel inferior). La combinación de lapatinib con trastuzumab inhibió completamente los niveles en estado estacionario de la proteína pErbB2 (figura 12A, panel
10 inferior), además de inhibir pErk1/2 y pAkt.

El aumento de la concentración de pAb de 20 a 100 a 200 $\mu\text{g/ml}$ no condujo a la inhibición aumentada de la proteína ErbB2 total, pero resultó en la inhibición mejorada de pErbB2, especialmente a concentraciones más altas de pAb.

15 **Conclusión**

Según lo mostrado en la figura 11A y B, usando 50 $\mu\text{g/ml}$ de suero policlonal de anti-HER2/neu inducido por la vacuna y 0.01 μM de Lapatinib, respectivamente, solamente se observó la inhibición modesta del crecimiento en ambas líneas celulares.

20 Combinar los anticuerpos anti-HER2/neu (pAb) inducidos por la vacuna y Lapatinib, dio lugar a una inhibición del crecimiento más pronunciada que solo el tratamiento con el agente. Esta combinación muestra los efectos sinérgicos inhibidores de crecimiento (mayores que el aditivo) en las líneas celulares BT474 y
25 SKBR3 de sobre-expresión Her2/neu.

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar el cáncer en un mamífero, que comprende: administrar al mamífero una cantidad
5 terapéuticamente efectiva de

(a) un compuesto de fórmula I, II, III ó IV, y/o sales, solvatos o derivados fisiológicamente funcionales de los mismos, en donde R₁ es Cl o Br; X es CH, N, o CF; y Het es tiazol o furan;
y

10 (b) una composición inmunogénica que comprende la proteína aislada que incluye por lo menos un epítipo de la proteína HER-2/neu, o un polinucleótido que codifica tal proteína.

2. El método de la reivindicación 1, en donde R₁ es Cl; X es CH; y Het es furan.

15 3. El método de la reivindicación 1, en donde R₁ es Br; X es CH; y Het es furan.

4. El método de la reivindicación 1, en donde R₁ es Cl; X es CH; y Het es tiazol.

5. El método de la reivindicación 1, en donde el
20 componente (a) es un compuesto de fórmula II.

6. El método de la reivindicación 1, en el cual el componente (a) y el componente (b) se administran simultáneamente.

7. El método de la reivindicación 1, en el cual el
25 componente (a) y el componente (b) se administran

secuencialmente.

8. Una combinación farmacéutica, que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de:

(a) un compuesto de fórmula I, II, III ó IV, y/o sales, solvatos o derivados fisiológicamente funcionales de los mismos, en donde R₁ es Cl o Br; X es CH, N, o CF; y Het es tiazol o furan; y

(b) una composición inmunogénica que comprende la proteína aislada que incluye por lo menos un epítipo de la proteína HER-2/neu, o un polinucleótido que codifica tal proteína.

9. Una composición farmacéutica, que comprende: la combinación de la reivindicación 8.

10. Una composición o combinación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 8 ó 9 para el uso en la terapia.

11. Uso de una composición o combinación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

12. Uso de una combinación farmacéutica que comprende cantidades terapéuticamente efectivas de un compuesto de fórmula I, II, III ó IV y/o sales, solvatos o derivados fisiológicamente funcionales de los mismos, en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un individuo, en donde se ha administrado al individuo una composición inmunogénica que comprende por lo menos un epítipo de la proteína HER-2/neu, o un polinucleótido que codifica tal proteína.

13. Un método, combinación, composición o uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición inmunogénica comprende una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular de HER-2/neu fusionado a un dominio de fosforilación HER-2/neu.

14. Un método, combinación, composición o uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la composición inmunogénica comprende una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular de HER-2/neu fusionado a un dominio intracelular de HER-2/neu.

15. Un método, combinación, composición o uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición inmunogénica comprende un adyuvante.

16. Un método, combinación, composición o uso de acuerdo a la reivindicación 15, en donde el adyuvante comprende uno o más de colesterol; emulsión aceite-en-agua; dosis baja de emulsión de aceite-en-agua; tocoferol; liposoma; una saponina; 3D-MPL5, y un oligonucleótido estimulador inmunológico.

17. Un método, combinación, composición o uso de acuerdo a la reivindicación 16, en donde el adyuvante comprende una saponina, junto con un oligonucleótido estimulador inmunológico.

18. Un método, combinación, composición o uso de acuerdo a la reivindicación 16, que adicionalmente comprende un lipopolisacárido.

19. Un método, combinación, composición o uso de acuerdo a la reivindicación 17 ó 18, en donde la saponina es QS21.

20. Un método, combinación, composición o uso de acuerdo a la reivindicación 17 a 19, en donde el lipopolisacárido se selecciona del grupo de

- i. Lípido A de monofosforilo
- ii. Lípido A de monofosforilo 3-0-desacilado
- iii. Lípido A de difosforilo

21. Una composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en donde el oligonucleótido estimulador inmunológico contiene por lo menos dos elementos de CpG.

22. Una composición inmunogénica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en donde el oligonucleótido estimulador inmunológico se selecciona del grupo:

SEC ID NO: 22 – TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

SEC ID NO: 23 – TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

24 – ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

SEC ID NO: 25 – TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

26 – TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

23. Una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en donde la saponina se formula para formar ISCOMS o liposomas.

24. Una composición de conformidad con cualquiera de las
5 reivindicaciones 17 a 23, en donde la saponina está presente en una emulsión aceite-en-agua.

25. Un método, combinación, composición o uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde por lo menos un epítipo es de la región extracelular de la
10 proteína HER-2/neu.

1/33

Fig. 1 (SEC ID NO: 12)

Met	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Cys	Arg	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu
1				5					10					15	
Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys
			20					25					30		
Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	His
	35						40				45				
Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Thr	Tyr
	50					55				60					
Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val
65					70					75				80	
Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu
				85				90					95		
Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr
			100				105						110		
Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro
	115						120					125			
Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser
	130					135				140					
Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Asn	Pro	Gln
145					150					155				160	
Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe	His	Lys	Asn
				165				170					175		
Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala	Cys
			180					185					190		
His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser
	195						200					205			
Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys
	210					215				220					
Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys
225					230					235				240	
Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	Leu
				245				250					255		
His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	Leu	Val
			260					265					270		
Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg
		275					280					285			
Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Leu
	290					295					300				
Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	His	Asn	Gln
305					310					315				320	
Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys
				325				330					335		
Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu
			340					345					350		
Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys
	355						360					365			
Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp
	370					375				380					
Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe
385					390					395				400	
Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro
				405				410					415		
Asp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg
			420					425					430		
Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu
	435						440					445			
Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly
	450					455				460					
Leu	Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val
465					470					475				480	
Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Thr
				485				490						495	
Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	Cys	His
			500					505					510		
Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	Gln	Cys
	515						520					525			
Val	Asn	Cys	Ser	Gln	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys	Val	Glu	Glu	Cys

530	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	Asn	Ala	Arg	His	Cys
545	Leu	Pro	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Gln	Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Cys
565	Phe	Gly	Pro	Glu	Ala	Asp	Gln	Cys	Val	Ala	Cys	Ala	His	Tyr	Lys	Asp
580	Pro	Pro	Phe	Cys	Val	Ala	Arg	Cys	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Asp	Leu
595	Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp	Lys	Phe	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	Cys	Gln
610	Pro	Cys	Pro	Ile	Asn	Cys	Thr	His	Ser	Cys	Val	Asp	Leu	Asp	Asp	Lys
625	Gly	Cys	Pro	Ala	Glu	Gln	Arg	Ala	Ser	Pro	Leu	Thr	Ser	Ile	Ile	Ser
645	Ala	Val	Val	Gly	Ile	Leu	Leu	Val	Val	Val	Leu	Gly	Val	Val	Phe	Gly
660	Ile	Leu	Ile	Lys	Arg	Arg	Gln	Gln	Lys	Ile	Arg	Lys	Tyr	Thr	Met	Arg
675	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Thr	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly
690	Ala	Met	Pro	Asn	Gln	Ala	Gln	Met	Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr	Glu	Leu
705	Arg	Lys	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr	Lys
725	Gly	Ile	Trp	Ile	Pro	Asp	Gly	Glu	Asn	Val	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Ile
740	Lys	Val	Leu	Arg	Glu	Asn	Thr	Ser	Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu
755	Asp	Glu	Ala	Tyr	Val	Met	Ala	Gly	Val	Gly	Ser	Pro	Tyr	Val	Ser	Arg
770	Leu	Leu	Gly	Ile	Cys	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Leu	Val	Thr	Gln	Leu
785	Met	Pro	Tyr	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp	His	Val	Arg	Glu	Asn	Arg	Gly	Arg
805	Leu	Gly	Ser	Gln	Asp	Leu	Leu	Asn	Trp	Cys	Met	Gln	Ile	Ala	Lys	Gly
820	Met	Ser	Tyr	Leu	Glu	Asp	Val	Arg	Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala
835	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Lys	Ser	Pro	Asn	His	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	Phe
850	Gly	Leu	Ala	Arg	Leu	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	Thr	Glu	Tyr	His	Ala	Asp
865	Gly	Gly	Lys	Val	Pro	Ile	Lys	Trp	Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	Arg
885	Arg	Arg	Phe	Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	Val
900	Trp	Glu	Leu	Met	Thr	Phe	Gly	Ala	Lys	Pro	Tyr	Asp	Gly	Ile	Pro	Ala
915	Arg	Glu	Ile	Pro	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro
930	Pro	Ile	Cys	Thr	Ile	Asp	Val	Tyr	Met	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	Met
945	Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Arg	Pro	Arg	Phe	Arg	Glu	Leu	Val	Ser	Glu	Phe
965	Ser	Arg	Met	Ala	Arg	Asp	Pro	Gln	Arg	Phe	Val	Val	Ile	Gln	Asn	Glu
980	Asp	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Pro	Leu	Asp	Ser	Thr	Phe	Tyr	Arg	Ser	Leu
995	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Met	Gly	Asp	Leu	Val	Asp	Ala	Glu	Glu	Tyr	Leu
1010	Val	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	Phe	Cys	Pro	Asp	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Gly
1025	Gly	Met	Val	His	His	Arg	His	Arg	Ser	Ser	Ser	Thr	Arg	Ser	Gly	Gly
1045	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	Arg
1060	Ser	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	Asp	Val	Phe	Asp	Gly
1075	Asp	Leu	Gly	Met	Gly	Ala	Ala	Lys	Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	Pro	Thr	His
1090	Asp	Pro	Ser	Pro	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Glu	Asp	Pro	Thr	Val	Pro	Leu
1100																

1105		1110		1115		1120
Pro	Ser	Glu	Thr	Asp	Gly	Tyr
		1125	Val	Ala	Pro	Leu
Pro	Glu	Tyr	Val	Asn	Gln	Pro
		1140		1145		1150
Arg	Glu	Gly	Pro	Leu	Pro	Ala
		1155		1160		1165
Arg	Pro	Lys	Thr	Leu	Ser	Pro
		1170		1175		1180
Phe	Ala	Phe	Gly	Gly	Ala	Val
		1185		1190		1195
Gly	Gly	Ala	Ala	Pro	Gln	Pro
		1205		1210		1215
Phe	Asp	Asn	Leu	Tyr	Trp	Asp
		1220		1225		1230
Pro	Pro	Ser	Thr	Phe	Lys	Gly
		1235		1240		1245
Leu	Gly	Leu	Asp	Val	Pro	Val
		1250		1255		

Fig. 2 (SEC ID NO: 13)

Met	Glu	Leu	Ala	Ala	Trp	Cys	Arg	Trp	Gly	Phe	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu
1			5						10					15	
Pro	Pro	Gly	Ile	Ala	Gly	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys
			20					25					30		
Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	His
		35					40					45			
Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Thr	Tyr
	50				55					60					
Val	Pro	Ala	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val
65					70				75					80	
Gln	Gly	Tyr	Met	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Lys	Arg	Val	Pro	Leu
			85						90					95	
Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Lys	Tyr
		100					105						110		
Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Arg	Asp	Pro	Gln	Asp	Asn	Val	Ala	Ala
		115					120					125			
Ser	Thr	Pro	Gly	Arg	Thr	Pro	Glu	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg
	130					135					140				
Ser	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Arg	Gly	Asn	Pro
145					150					155					160
Gln	Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Met	Val	Leu	Trp	Lys	Asp	Val	Phe	Arg	Lys
			165						170					175	
Asn	Asn	Gln	Leu	Ala	Pro	Val	Asp	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala
			180					185					190		
Cys	Pro	Pro	Cys	Ala	Pro	Ala	Cys	Lys	Asp	Asn	His	Cys	Trp	Gly	Glu
		195					200					205			
Ser	Pro	Glu	Asp	Cys	Gln	Ile	Leu	Thr	Gly	Thr	Ile	Cys	Thr	Ser	Gly
	210					215					220				
Cys	Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Arg	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln
225					230					235					240
Cys	Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys
			245						250					255	
Leu	His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	Leu
		260						265					270		
Val	Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	His	Asn	Pro	Glu	Gly
		275					280						285		
Arg	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Thr	Cys	Pro	Tyr	Asn	Tyr
	290					295					300				
Leu	Ser	Thr	Glu	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Pro	Asn	Asn
305					310					315					320
Gln	Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser
			325						330					335	
Lys	Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg
			340					345					350		
Gly	Ala	Arg	Ala	Ile	Thr	Ser	Asp	Asn	Val	Gln	Glu	Phe	Asp	Gly	Cys
		355					360					365			
Lys	Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly
	370					375					380				
Asp	Pro	Ser	Ser	Gly	Ile	Ala	Pro	Leu	Arg	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val
385					390					395					400
Phe	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp
			405						410					415	
Pro	Asp	Ser	Leu	Arg	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Arg	Ile	Ile
			420					425					430		
Arg	Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asp	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly
		435					440					445			
Leu	Gly	Ile	His	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser
	450					455					460				
Gly	Leu	Ala	Leu	Ile	His	Arg	Asn	Ala	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr
465					470					475					480
Val	Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His
			485						490					495	
Ser	Gly	Asn	Arg	Pro	Glu	Glu	Asp	Cys	Gly	Leu	Glu	Gly	Leu	Val	Cys
		500						505					510		
Asn	Ser	Leu	Cys	Ala	His	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	Gln
		515					520					525			
Cys	Val	Asn	Cys	Ser	His	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys	Val	Glu	Glu
	530					535					540				
Cys	Arg	Val	Trp	Lys	Gly	Leu	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	Ser	Asp	Lys	Arg

5/33

545	Cys	Leu	Pro	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Gln	Asn	Ser	Ser	Glu	Thr	560
					565					570							575
	Cys	Phe	Gly	Ser	Glu	Ala	Asp	Gln	Cys	Ala	Ala	Cys	Ala	His	Tyr	Lys	
				580					585					590			
	Asp	Ser	Ser	Ser	Cys	Val	Ala	Arg	Cys	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Asp	
				595				600					605				
	Leu	Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp	Lys	Tyr	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ile	Cys	
				610				615					620				
	Gln	Pro	Cys	Pro	Ile	Asn	Cys	Thr	His	Ser	Cys	Val	Asp	Leu	Asp	Glu	
				625				630					635				640
	Arg	Gly	Cys	Pro	Ala	Glu	Gln	Arg	Ala	Ser	Pro	Val	Thr	Phe	Ile	Ile	
				645						650							655
	Ala	Thr	Val	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Phe	Leu	Ile	Leu	Val	Val	Val	Val	
				660					665					670			
	Gly	Ile	Leu	Ile	Lys	Arg	Arg	Arg	Gln	Lys	Ile	Arg	Lys	Tyr	Thr	Met	
				675					680					685			
	Arg	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Thr	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	
				690				695					700				
	Gly	Ala	Met	Pro	Asn	Gln	Ala	Gln	Met	Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr	Glu	
				705				710					715				720
	Leu	Arg	Lys	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr	
				725						730							735
	Lys	Gly	Ile	Trp	Ile	Pro	Asp	Gly	Glu	Asn	Val	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	
				740					745					750			
	Ile	Lys	Val	Leu	Arg	Glu	Asn	Thr	Ser	Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ile	
				755				760					765				
	Leu	Asp	Glu	Ala	Tyr	Val	Met	Ala	Gly	Val	Gly	Ser	Pro	Tyr	Val	Ser	
				770				775					780				
	Arg	Leu	Leu	Gly	Ile	Cys	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Leu	Val	Thr	Gln	
				785				790				795					800
	Leu	Met	Pro	Tyr	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp	His	Val	Arg	Glu	His	Arg	Gly	
				805						810							815
	Arg	Leu	Gly	Ser	Gln	Asp	Leu	Leu	Asn	Trp	Cys	Val	Gln	Ile	Ala	Lys	
				820					825					830			
	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	Glu	Asp	Val	Arg	Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	
				835				840					845				
	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Lys	Ser	Pro	Asn	His	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	
				850				855					860				
	Pro	Gly	Leu	Ala	Arg	Leu	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	Thr	Glu	Tyr	His	Ala	
				865				870				875					880
	Asp	Gly	Gly	Lys	Val	Pro	Ile	Lys	Trp	Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	
				885						890							895
	Arg	Arg	Arg	Phe	Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	
				900					905					910			
	Val	Trp	Glu	Leu	Met	Thr	Phe	Gly	Ala	Lys	Pro	Tyr	Asp	Gly	Ile	Pro	
				915				920					925				
	Ala	Arg	Glu	Ile	Pro	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	
				930				935					940				
	Pro	Pro	Ile	Cys	Thr	Ile	Asp	Val	Tyr	Met	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	
				945				950				955					960
	Met	Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Arg	Pro	Arg	Phe	Arg	Glu	Leu	Val	Ser	Glu	
				965						970							975
	Phe	Ser	Arg	Met	Ala	Arg	Asp	Pro	Gln	Arg	Phe	Val	Val	Ile	Gln	Asn	
				980					985					990			
	Glu	Asp	Leu	Gly	Pro	Ser	Ser	Pro	Met	Asp	Ser	Thr	Phe	Tyr	Arg	Ser	
				995				1000					1005				
	Leu	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Met	Gly	Asp	Leu	Val	Asp	Ala	Glu	Glu	Tyr	
				1010				1015					1020				
	Leu	Val	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	Phe	Ser	Pro	Asp	Pro	Thr	Pro	Gly	Thr	
				1025				1030				1035					1040
	Gly	Ser	Thr	Ala	His	Arg	Arg	His	Arg	Ser	Ser	Ser	Thr	Arg	Ser	Gly	
				1045						1050							1055
	Gly	Gly	Glu	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu	Glu	Gly	Pro	Pro	
				1060					1065					1070			
	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	Asp	Val	Phe	Asp	
				1075				1080					1085				
	Gly	Asp	Leu	Ala	Met	Gly	Val	Thr	Lys	Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	Ser	Pro	
				1090				1095					1100				
	His	Asp	Leu	Ser	Pro	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Glu	Asp	Pro	Thr	Leu	Pro	
				1105				1110				1115					1120
	Leu	Pro	Pro	Glu	Thr	Asp	Gly	Tyr	Val	Ala	Pro	Leu	Ala	Cys	Ser	Pro	

1125 1130 1135
Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Ser Glu Val Gln Pro Gln Pro Pro Leu
1140 1145 1150
Thr Pro Glu Gly Pro Leu Pro Pro Val Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu
1155 1160 1165
Glu Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp
1170 1175 1180
Val Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Val Pro
1185 1190 1195 1200
Arg Glu Gly Thr Ala Ser Pro Pro His Pro Ser Pro Ala Phe Ser Pro
1205 1210 1215
Ala Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asn Ser Ser Glu Gln Gly
1220 1225 1230
Pro Pro Pro Ser Asn Phe Glu Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu
1235 1240 1245
Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
1250 1255

Fig. 3 (SEC ID NO: 14)

```

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
1      5      10      15
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
20      25      30
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
35      40      45
Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
50      55      60
Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
65      70      75      80
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
85      90      95
Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
100     105     110
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
115     120     125
Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
130     135     140
Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
145     150     155     160
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
165     170     175
Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
180     185     190
His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
195     200     205
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
210     215     220
Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
225     230     235     240
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
245     250     255
His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
260     265     270
Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
275     280     285
Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
290     295     300
Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
305     310     315     320
Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
325     330     335
Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
340     345     350
Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
355     360     365
Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
370     375     380
Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
385     390     395     400
Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
405     410     415
Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
420     425     430
Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
435     440     445
Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
450     455     460
Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
465     470     475     480
Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
485     490     495
Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
500     505     510
Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
515     520     525
Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys

```

8/33

530		535		540
Arg Val Leu Gln Gly	Leu Pro Arg Glu Tyr Val	Asn Ala Arg His Cys		
545		550		555
Leu Pro Cys His Pro	Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys			560
		565		570
Phe Gly Pro Glu Ala Asp	Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp			575
		580		585
Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg	Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu			590
		595		600
Ser Tyr Met Pro Ile Trp	Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln			605
		610		615
Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr	His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys			620
		625		630
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg	Ala Ser Pro Leu Thr Ser			635
		645		650

Fig. 4 (SEC ID NO: 15)

Gln	Asn	Glu	Asp	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Pro	Leu	Asp	Ser	Thr	Phe	Tyr
1				5					10					15	
Arg	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Met	Gly	Asp	Leu	Val	Asp	Ala	Glu
		20						25					30		
Glu	Tyr	Leu	Val	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	Phe	Cys	Pro	Asp	Pro	Ala	Pro
		35					40					45			
Gly	Ala	Gly	Gly	Met	Val	His	His	Arg	His	Arg	Ser	Ser	Ser	Thr	Arg
		50				55					60				
Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu	Glu	Glu
65					70				75					80	
Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	Asp	Val
				85					90					95	
Phe	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Met	Gly	Ala	Ala	Lys	Gly	Leu	Gln	Ser	Leu
		100						105					110		
Pro	Thr	His	Asp	Pro	Ser	Pro	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Glu	Asp	Pro	Thr
		115					120					125			
Val	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Thr	Asp	Gly	Tyr	Val	Ala	Pro	Leu	Thr	Cys
		130				135					140				
Ser	Pro	Gln	Pro	Glu	Tyr	Val	Asn	Gln	Pro	Asp	Val	Arg	Pro	Gln	Pro
145				150						155				160	
Pro	Ser	Pro	Arg	Glu	Gly	Pro	Leu	Pro	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	Gly	Ala
				165					170					175	
Thr	Leu	Glu	Arg	Pro	Lys	Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Asn	Gly	Val	Val
		180						185					190		
Lys	Asp	Val	Phe	Ala	Phe	Gly	Gly	Ala	Val	Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu
		195						200				205			
Thr	Pro	Gln	Gly	Gly	Ala	Ala	Pro	Gln	Pro	His	Pro	Pro	Pro	Ala	Phe
		210				215					220				
Ser	Pro	Ala	Phe	Asp	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Asp	Gln	Asp	Pro	Pro	Glu
225				230						235				240	
Arg	Gly	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Phe	Lys	Gly	Thr	Pro	Thr	Ala	Glu	Asn
				245					250					255	
Pro	Glu	Tyr	Leu	Gly	Leu	Asp	Val	Pro	Val						
			260					265							

Fig. 5 (SEC ID NO: 16)

Gln	Asn	Glu	Asp	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Pro	Leu	Asp	Ser	Thr	Phe	Tyr
1				5					10					15	
Arg	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Met	Gly	Asp	Leu	Val	Asp	Ala	Glu
		20						25					30		
Glu	Tyr	Leu	Val	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	Phe	Cys	Pro	Asp	Pro	Ala	Pro
		35					40					45			
Gly	Ala	Gly	Gly	Met	Val	His	His	Arg	His	Arg					
	50					55									

11/33

Fig. 6 (SEC ID NO: 17)

Met	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Cys	Arg	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu
1				5					10					15	
Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys
			20					25					30		
Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	His
			35				40					45			
Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Thr	Tyr
	50					55					60				
Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val
65					70					75					80
Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu
			85						90					95	
Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr
			100					105					110		
Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro
		115					120					125			
Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser
	130					135					140				
Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Asn	Pro	Gln
145					150					155					160
Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe	His	Lys	Asn
			165						170					175	
Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala	Cys
			180					185						190	
His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser
	195						200						205		
Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys
	210					215					220				
Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys
225					230					235					240
Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	Leu
			245						250					255	
His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	Leu	Val
			260					265					270		
Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg
	275						280						285		
Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Leu
	290						295				300				
Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	His	Asn	Gln
305					310					315					320
Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys
			325						330					335	
Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu
			340					345					350		
Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys
		355					360					365			
Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp
	370					375					380				
Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe
385					390					395					400
Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro
			405						410					415	
Asp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg
			420					425					430		
Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu
	435						440					445			
Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly
	450					455					460				
Leu	Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val
			470						475						480
Pro	Trp	Asp	Glu	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Thr
			485						490					495	
Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	Cys	His
			500					505					510		
Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	Gln	Cys
	515						520					525			
Val	Asn	Cys	Ser	Gln	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys	Val	Glu	Glu	Cys

530					535					540					
Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	Asn	Ala	Arg	His	Cys
545					550					555					560
Leu	Pro	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Gln	Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Cys
				565					570						575
Phe	Gly	Pro	Glu	Ala	Asp	Gln	Cys	Val	Ala	Cys	Ala	His	Tyr	Lys	Asp
			580					585					590		
Pro	Pro	Phe	Cys	Val	Ala	Arg	Cys	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Asp	Leu
		595					600					605			
Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp	Lys	Phe	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	Cys	Gln
610						615				620					
Pro	Cys	Pro	Ile	Asn	Cys	Thr	His	Ser	Cys	Val	Asp	Leu	Asp	Asp	Lys
625					630					635					640
Gly	Cys	Pro	Ala	Glu	Gln	Arg	Ala	Ser	Pro	Leu	Thr	Ser	Gln	Asn	Glu
			645					650						655	
Asp	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Pro	Leu	Asp	Ser	Thr	Phe	Tyr	Arg	Ser	Leu
			660					665				670			
Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Met	Gly	Asp	Leu	Val	Asp	Ala	Glu	Glu	Tyr	Leu
		675				680					685				
Val	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	Phe	Cys	Pro	Asp	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Gly
690					695					700					
Gly	Met	Val	His	His	Arg	His	Arg	Ser	Ser	Ser	Thr	Arg	Ser	Gly	Gly
705					710					715					720
Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	Arg
			725					730						735	
Ser	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	Asp	Val	Phe	Asp	Gly
			740					745				750			
Asp	Leu	Gly	Met	Gly	Ala	Ala	Lys	Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	Pro	Thr	His
		755					760				765				
Asp	Pro	Ser	Pro	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Glu	Asp	Pro	Thr	Val	Pro	Leu
		770				775				780					
Pro	Ser	Glu	Thr	Asp	Gly	Tyr	Val	Ala	Pro	Leu	Thr	Cys	Ser	Pro	Gln
785				790						795					800
Pro	Glu	Tyr	Val	Asn	Gln	Pro	Asp	Val	Arg	Pro	Gln	Pro	Pro	Ser	Pro
			805					810						815	
Arg	Glu	Gly	Pro	Leu	Pro	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	Gly	Ala	Thr	Leu	Glu
			820					825					830		
Arg	Pro	Lys	Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Asn	Gly	Val	Val	Lys	Asp	Val
		835					840					845			
Phe	Ala	Phe	Gly	Gly	Ala	Val	Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu	Thr	Pro	Gln
		850				855				860					
Gly	Gly	Ala	Ala	Pro	Gln	Pro	His	Pro	Pro	Pro	Ala	Phe	Ser	Pro	Ala
865				870						875					880
Phe	Asp	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Asp	Gln	Asp	Pro	Pro	Glu	Arg	Gly	Ala
			885					890						895	
Pro	Pro	Ser	Thr	Phe	Lys	Gly	Thr	Pro	Thr	Ala	Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr
			900					905					910		
Leu	Gly	Leu	Asp	Val	Pro	Val									
		915													

Fig. 7 (SEC ID NO: 18)

Met	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Cys	Arg	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu
1				5					10					15	
Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys
			20					25					30		
Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	His
		35					40					45			
Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Thr	Tyr
	50					55					60				
Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val
65				70						75					80
Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu
				85					90					95	
Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr
			100				105						110		
Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro
		115					120					125			
Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser
	130					135					140				
Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Asn	Pro	Gln
145				150						155					160
Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe	His	Lys	Asn
				165					170					175	
Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala	Cys
			180					185					190		
His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser
		195					200					205			
Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys
	210					215					220				
Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys
	225				230					235				240	
Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	Leu
			245						250					255	
His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	Leu	Val
			260					265					270		
Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg
		275					280					285			
Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Leu
	290					295					300				
Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	His	Asn	Gln
	305				310					315				320	
Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys
			325					330					335		
Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu
		340						345					350		
Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys
		355					360					365			
Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp
	370					375				380					
Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe
	385				390					395				400	
Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro
			405					410					415		
Asp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg
			420					425					430		
Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu
		435					440					445			
Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly
	450					455					460				
Leu	Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val
	465				470					475				480	
Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Thr
			485						490					495	
Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	Cys	His
		500						505					510		
Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	Gln	Cys
		515					520					525			
Val	Asn	Cys	Ser	Gln	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys	Val	Glu	Glu	Cys

14/33

530	535	540
Arg Val Leu Gln Gly	Leu Pro Arg Glu Tyr Val	Asn Ala Arg His Cys
545	550	555
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro	Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys	560
565	570	575
Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val	Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp	580
585	590	595
Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro	Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu	600
605	610	615
Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro	Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln	620
625	630	635
Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser	Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys	640
645	650	655
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser	Pro Leu Thr Ser Gln Asn Glu	660
665	670	675
Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp	Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu	680
685	690	695
Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu	Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu	700
705	710	

Fig. 8 (SEC ID NO: 19)

Met	Glu	Leu	Ala	Ala	Trp	Cys	Arg	Trp	Gly	Phe	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	
1				5					10					15		
Pro	Pro	Gly	Ile	Ala	Gly	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys	
			20					25					30			
Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	His	
		35					40				45					
Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Thr	Tyr	
	50					55				60						
Val	Pro	Ala	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val	
65					70				75						80	
Gln	Gly	Tyr	Met	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Lys	Arg	Val	Pro	Leu	
			85					90					95			
Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Lys	Tyr	
			100				105						110			
Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Arg	Asp	Pro	Gln	Asp	Asn	Val	Ala	Ala	
		115					120					125				
Ser	Thr	Pro	Gly	Arg	Thr	Pro	Glu	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	
	130					135					140					
Ser	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Arg	Gly	Asn	Pro	
145					150					155					160	
Gln	Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Met	Val	Leu	Trp	Lys	Asp	Val	Phe	Arg	Lys	
				165					170					175		
Asn	Asn	Gln	Leu	Ala	Pro	Val	Asp	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala	
			180					185					190			
Cys	Pro	Pro	Cys	Ala	Pro	Ala	Cys	Lys	Asp	Asn	His	Cys	Trp	Gly	Glu	
		195					200					205				
Ser	Pro	Glu	Asp	Cys	Gln	Ile	Leu	Thr	Gly	Thr	Ile	Cys	Thr	Ser	Gly	
	210					215					220					
Cys	Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Arg	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	
225					230					235					240	
Cys	Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	
			245						250					255		
Leu	His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	Leu	
			260					265					270			
Val	Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	His	Asn	Pro	Glu	Gly	
		275					280					285				
Arg	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Thr	Cys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	
	290					295					300					
Leu	Ser	Thr	Glu	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Pro	Asn	Asn	
305					310					315					320	
Gln	Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	
			325						330					335		
Lys	Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	
			340					345					350			
Gly	Ala	Arg	Ala	Ile	Thr	Ser	Asp	Asn	Val	Gln	Glu	Phe	Asp	Gly	Cys	
	355					360						365				
Lys	Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	
	370					375				380						
Asp	Pro	Ser	Ser	Gly	Ile	Ala	Pro	Leu	Arg	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	
385					390					395					400	
Phe	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	
			405						410					415		
Pro	Asp	Ser	Leu	Arg	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Arg	Ile	Ile	
			420				425						430			
Arg	Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asp	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	
	435						440					445				
Leu	Gly	Ile	His	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	
	450					455					460					
Gly	Leu	Ala	Leu	Ile	His	Arg	Asn	Ala	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	
465					470					475					480	
Val	Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His	
			485						490					495		
Ser	Gly	Asn	Arg	Pro	Glu	Glu	Asp	Cys	Gly	Leu	Glu	Gly	Leu	Val	Cys	
		500						505					510			
Asn	Ser	Leu	Cys	Ala	His	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	Gln	
		515					520					525				
Cys	Val	Asn	Cys	Ser	His	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys	Val	Glu	Glu	

16/33

530						535						540					
Cys	Arg	Val	Trp	Lys	Gly	Leu	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	Ser	Asp	Lys	Arg		
545					550					555					560		
Cys	Leu	Pro	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Gln	Asn	Ser	Ser	Glu	Thr		
				565					570					575			
Cys	Phe	Gly	Ser	Glu	Ala	Asp	Gln	Cys	Ala	Ala	Cys	Ala	His	Tyr	Lys		
			580				585					590					
Asp	Ser	Ser	Ser	Cys	Val	Ala	Arg	Cys	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Asp		
		595					600					605					
Leu	Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp	Lys	Tyr	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ile	Cys		
	610					615					620						
Gln	Pro	Cys	Pro	Ile	Asn	Cys	Thr	His	Ser	Cys	Val	Asp	Leu	Asp	Glu		
625					630					635					640		
Arg	Gly	Cys	Pro	Ala	Glu	Gln	Arg	Ala	Ser	Pro	Val	Thr	Phe				
				645					650								

Fig. 9 (SEC ID NO: 20)

```

atggagctgg cggccttgtg cggctggggg ctcctctctg ccctcttgcg ccccgagacc 60
gcgagcaccg aagtggtgcac cggcacagac atgaagctgc ggctccctgc cagtcccgag 120
accacacctg acatgctcog ccacctctac cagggtctgc aggtggtgca gggaaacctg 180
gaactcacct acctgcccac caatgccagc ctgtccttcc tgcaggatat ccaggaggtg 240
cagggtctacg tgcctcatgc tcacaaccaaa gtgaggcagg tcccactgca gaggtctcgg 300
attgtgctgag gcacccagct ctttgaggan aactatgccc tggccgtgct agacaatgga 360
gacccgctga acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc caggaggcct gcgggagctg 420
cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaaa ggagggtct tgcctcagcg gaacccccag 480
ctctgctacc aggcacagat tttgtggaag gacatcttcc acaagaacaa ccagctggct 540
ctcaractga tagacaccaa ccgtctctgg gcctgcaccc cctgttctcc gatgtgttag 600
ggctcccgct gctggggaga gagttctgag gattgtcaga gcctgacgcg cactgtctgt 660
gccggtggct gtgcccgtcg caaggggcca ctgccactg actgtgcga tgagcagtg 720
gctgcccgtc gcacggggcc cagtccttg cctgcctcca cttcaaccac 780
agtggcatct gtgagctgca ctgccagcc ctggctaccc acaacacaga caggtttgag 840
tccatgcccc atccccaggg ccggtatata ttcggcgcca gctgtgtgac tgcctgtccc 900
tacaactacc tttctacgga cgtgggatac tgcacccctg tctgccccct gcacaaccaa 960
gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg tgtgagaagt gcagcaagcc ctgtgcccga 1020
gtgtgctatg gctcgggcat ggagcacttg cgagaggtga gggcagttac cagtgcctat 1080
atccaggagt ttgctggctg caagaagatc tttgggagcc tggcatttct gccggagagc 1140
tttgatgggg accnagcctc caacactgcc ccgctccagc cagagcagct ccaagtgttt 1200
gagactctgg aagagatcac aggttaccta tcatctcag catggccgga cagcctgcct 1260
gacctcagcg tcttccagaa cctgcaagta atccggggac gaattctgca caatggcgcc 1320
tactcgctga cctgcaagg gctgggcata aacacccacc ggctgcgctc actgagggaa 1380
ctgggcagtg gactggccct catccaccat caagctctgc tccacactgc caaccggcca 1500
ccctgggacc agctcttctg gaacccgcac caagctctgc tgcacaccag tgtgcgccc 1560
gaggtcagag gtgtgggcca gggcctggcc tgcacaccag tgcagccagt tcttctgggg 1620
tggggctccag ggcccaccca gtgtgtcaac tgcagccagt cccaggaggt atgtgaatgc 1680
gtggaggaat gccaggtact tcagccccag aatggctcag tgacctgtt tggaccggag 1740
ttgcccgtgc gtgtggcctg tgcacactat aaggacctc ccttctgctg ggcccgtgc 1800
ccagcgggtg tgaaacctga cctctctctac atgcccctct gggaatttcc agatgaggg 1860
ggcgcagtgc agccttgccc catcaactgc accactctct gtgtggacct ggtgagaa 1920
ggctgcccgg ccgagcagag agccagcctt ctgacgtcca tcatctctgc ggtggttggc 1980
attctgctgg tcgtggctct gggtgggtgc tttgggatac tcatcaagcg acggcagcag 2040
aagatccgga agtacacgat gcggagactg ctgcaggaaa cggagctggt ggagccgctg 2100
aaccctagcg gagcgatgcc caaccaggcg cagatgcgga tccgaaaga gacggagctg 2160
aygaaggctg aggtgcttgg atctggcgct tttggcacag tctacaaggg catctggatc 2220
cttgatgggg agaattgtga aatbocagt gccatcaaa tgttgaggga aaacacatc 2280
cccaagacca acaagaaat cttagaagaa gcatangtga tggctggctg gggctcccca 2340
tatgtctccc gcttctggg catctgcctg acatccacgg tgcagctggt gacacagctt 2400
atgcccctatg gctgcctctt agaocattgc cgggaaaaac gcggacgccc gggctcccag 2460
gacctgctga actggtgrat gcagattgcc aaggggatga gctacctgga ggtgtgcgg 2520
ctcgtaacaa gggacttgcc cgctgggaac gctctggtca agagtcccaa ccatgtcaaa 2580
attacagact tcgggctggc tggctgctg gtgagtgcc ctggagtcca tctccgccc 2640
gggggcaagg tgcacatcaa gtggatggcg ctggagtcca tctccgccc 2700
caccagagtg atgtgtggag ttatgggtg actgtgtggg agctgatgac ttttggggcc 2760
aaaccttacy atgggatccc agcccgggag atccctgacc tgcctgaaaa gggggagcgg 2820
ctgccccagc ccccatctg caccattgat gctacatga tcatggtcaa atgttggatg 2880
attgactcty aatgtcggcc aagatccgg gagttgggt ctgaattctc ccgcatggcc 2940
agggaccccc agcgttttgt ggtcatccag aatgaggact tgggcccagc cagtcccttg 3000
gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca tgggggacct ggtggatgct 3060
gaggagtatc tggtaaccca gcagggttc tctgttccag accctgccc gggcgctggg 3120
ggcatggttc accacaggca ccgcagctca tctaccagga gtggcggtgg ggacctgaca 3180
ctagggctgg agccctctga agaggaggcc cccaggtctc cactggcacc ctccgaaggg 3240
gctggctccg atgtatttga tgggtjacct ggaaaggggg cagccaaggg gctgcaaaag 3300
ctccccacac atgaccccag cctctacag cggtaacgtg aggacccac agtacccttg 3360
cccttttgaga ctgatggcta cgttgcctcc ctgacctgca gccccagcc tgaatatgtg 3420
naccagccag atgttcggcc ccagccccct tgcctccgag agggccctct gcctgtctgc 3480
cgacctgctg gtgcactctt ggaanggcc aagactctct cccaggggaa gaatggggtc 3540
gtcaaagacg tttttgcctt tgggggtgcc gtggagaacc ccgagtactt gacaccccag 3600
ggaggagcty cccctcagcc ccacccctct cctgccttca gccagcctt cgacaacctc 3660
tattactggg accaggaccc accagagcgg ggggtccac ccagcacctt caaagggaca 3720
cctacggcag agaaccaga gtacctgggt ccggacgtgc cagtgtga 3768

```

Fig. 10 (SEC ID NO: 21)

ccgggcccga	gccgcaatga	tcacatcgga	gctggcggcc	tgggtgccgt	gggggttcc	60
cctcgccctc	ctgccccccg	gaatcycggg	cacccaagt	tgtaccggca	cagacatgaa	120
gttgccggctc	cctgccagtc	ctgagaccca	cctggacatg	ctccgccacc	tgtaccagg	180
ctgtcaggta	gtgcagggca	acttggagct	tacctacgtg	cctgccaatg	ccagcctctc	240
attcctgcag	gacatccagg	aagtccagg	ttacatgctc	atcgctcaca	accaggtgaa	300
gcgcgtccca	ctgcaaggc	tgccgcatcg	gagagggacc	cagctctttg	aggacaagta	360
tgccctggct	gtgctagaca	accgagatcc	tcaggacaa	gtcgccgcct	ccaccccagg	420
cagaacccca	gaggggctgc	gggagctgca	gcttcgaagt	ctcacagaga	tcctgaagg	480
aggagttttg	atccgtggga	accctcagct	ctgctaccag	gacatgggtt	tgtggaagg	540
cgtctcccg	aagaataacc	aactggctcc	tgtcgatata	gacaccaatc	gttcccgggc	600
ctgtccacct	tgtgcccccg	cctgcnaaga	caatcactgt	tggggtgaga	gtccggaa	660
ctgtccagat	ttgactggca	ccatctgtac	cagtgggtgt	gcccgggtgc	agggccgggt	720
gcccactgac	tgactgcatg	agcagtggtg	cgagggtg	acggggccca	agcattctga	780
ctgctggcc	tgccctccact	ccaatccatg	tggatatctg	gagctgcact	gcccagccct	840
cgtccacctac	aacacagaca	cctttttagtc	catgcacaa	cctgagggtc	gttacacctt	900
tgggtgccagc	tgctgtacca	cctgcacctc	caactacctg	tctacggaa	tgggatctctg	960
cactctgggtg	gagcccccga	ataaccnaaga	ggtcacagct	gaggacggaa	cacagcgttg	1020
tgagaaatgc	agcaagocct	gtgctcagat	gtgctatgg	ctgggcatcg	agcaccctcg	1080
agggggcagg	gcoatcacca	gtgacnaatg	ccaggagttt	gatggctgca	agaagatctt	1140
tgggagcctg	gcatttttgc	cggagngctt	tgatggggac	ccctcctcog	gcattgctcc	1200
gctgaggctc	gagcagctcc	aagtgttcga	aacctggag	gagatcacag	gttacctgta	1260
catctcagca	tggccagaca	gtctccgtga	cctcagtgtc	ttccagaacc	ttcgaaatcat	1320
tcggggacag	attctccacg	atggcgcgta	ctcattgaca	ctgcaaggcc	tggggatcca	1380
ctcgctgggg	ctgcgtcac	tgccggagct	gggcagtgga	ttggctctga	ttcaccgcaa	1440
cgcccatctc	tgtctgtac	acactgtacc	ttgggaccag	ctcttccgga	accacatca	1500
ggccctgctc	cacagtggga	accggccgga	agaggacttg	tgctctcga	gcggcttgg	1560
ctgtaactca	ctgtgtgccc	acgggcactg	ctgggggcca	ggggccaccc	agtgtgtcaa	1620
ctgcagtcac	ttctctggg	gccaggagtg	tgtggaggag	tgccgagtat	ggaaggggct	1680
cccccgggag	tgtgtgagtg	acaagcgtg	cttgccgtgt	caccccgagt	gtcagcccca	1740
aaacagctca	gagacctgct	ttggatcgg	ggctgatcag	tgtgcagcct	gcgcccacta	1800
caaggactcg	tcctcctgtg	tggctcgtg	ccccagtggt	gtgnaaccgg	acctctccta	1860
catgcccac	tggaaagtacc	cggatgagga	gggcataatg	cagccgtgcc	ccatcaactc	1920
ccccacttc	tggatggaac	aggctgccca	ggcctgccca	gcagagcaga	gagccagccc	1980
gggtgacatc	atcattgcaa	ctgtagagg	cgtcctgctg	ttcctgatct	tagtggtgg	2040
cgttggaaac	ccaatcaaac	gaaggagaca	gaagatccgg	aagtatacga	tgcgtagcct	2100
gctgcaggaa	actgagttag	tggagccgct	gacgccacgc	ggagcaatgc	ccaaccaggc	2160
tcagctgggg	atctcaaaag	agacggagct	aaggaaagtg	aagggtgctt	gatcaggagc	2220
ttttggcac	gtctacaagg	gcattctggat	cccagatggg	gagaatgtga	aaatccccgt	2280
ggcraatca	gtgttgagag	aaaaacacac	tcctaaagcc	aacaaagaaa	ttctagatga	2340
agcgcatgtg	atggctgggtg	tgggtctctc	gtatgtgtcc	cgctcctgg	gcattctgct	2400
gcacatccca	gtacagctgg	tgacacagct	tatgccctac	ggctgccttc	tggaccatgt	2460
ccgagaacac	cgaggtcgcc	taggctccca	ggacctgctc	aactgggtgtg	ttcagattgc	2520
caaggggag	agctacctgg	aggacgtgcg	gcttgtagac	agggacctgg	ctgcccggaa	2580
tgtgctagtc	aagagtccca	accacgtcaa	gattacagat	ttcgggctgg	ctcggctgct	2640
agcattgag	gtacacagag	tgggggcaag	tgccccatca	aatggatggc	aatggatggc	2700
attggaatct	attctcagac	gccgggtcac	ccatcagagt	gatgtgtgga	gctatggagt	2760
gactgtgtgg	gagctgatga	cttttggggc	caaaccctac	gatggaatcc	cagcccggga	2820
gatccctgat	ttgttgsga	agggagaaag	cctacctcag	cctccaatct	gcaccattga	2880
tgtctacatg	atttatggta	aatgttggtg	gattgactct	gaatgtcgcc	cgagattccg	2940
ggagtgtgg	tcagaatttt	cacgtatggc	gagggaucce	cagcgttttg	tggctcatcca	3000
gaacgaggac	ttggggccat	ccagccccc	ggacagtacc	ttctaccgtt	cactgctgga	3060
agatgatgac	atgggtgacc	tggtagacgc	tgaagagtat	ctggtgcccc	agcagggtat	3120
cttctcccc	gacctaccc	caggcactgg	gagcacagcc	catagaaggc	accgacgtc	3180
gtccaccagg	agtggagggtg	gtgagctgac	actgggcttg	gagccctcgg	aagaaggggc	3240
cccagatct	ccactggctc	cctcggaagg	ggctggctcc	gatgtgtttg	atgggtgacct	3300
ggcaatgggg	gtaaccnaag	ggctgacag	cctctctcca	catgacctca	gccctctaca	3360
gcggacacag	gaggacccca	cattacctct	gccccccgag	actgatggct	atgttgctcc	3420
cctggcctgc	agcccccagc	ccgagtatgt	gaaccaatca	gaggttcagc	ctcagcctcc	3480
tttaacccca	gagggtcctc	tgccctctgt	ccggcctgct	ggtgctactc	tagaaagacc	3540
caagactctc	ctcctggga	agaatgggtg	tgtcaagac	gtttttgcct	tcgggggtgc	3600
tgtggagaac	cctgaatact	tagtacggag	agaaggcact	gcctctccgc	cccacucttc	3660
tcctgecttc	agcccgacct	ttgacnaacc	ctattactgg	gaccagaact	catcgagaca	3720
ggggcctcca	ccaagtaact	ttgaajggac	ccccactgca	gagaacccctg	agtacctagg	3780
cctggatgta	cctgtatgag	acgtgtgcag	acgtcctgtg	ctttcagagt	ggggaaggcc	3840
tgactcgtgg	ctccatcgc	cacaangcag	ggagagggtc	ctctggccac	attacatcca	3900
gggcagacgg	ctctaccagg	aacctgcccc	gaggaaacct	tccttgctgc	ttgaa	3955

Fig. 11A

Efecto anti-proliferativo de los anticuerpos policlonales anti-HER-2/neu en combinación con Lapatinib en la proliferación de células cancerígenas de seno BT474 humano.

Células BT474

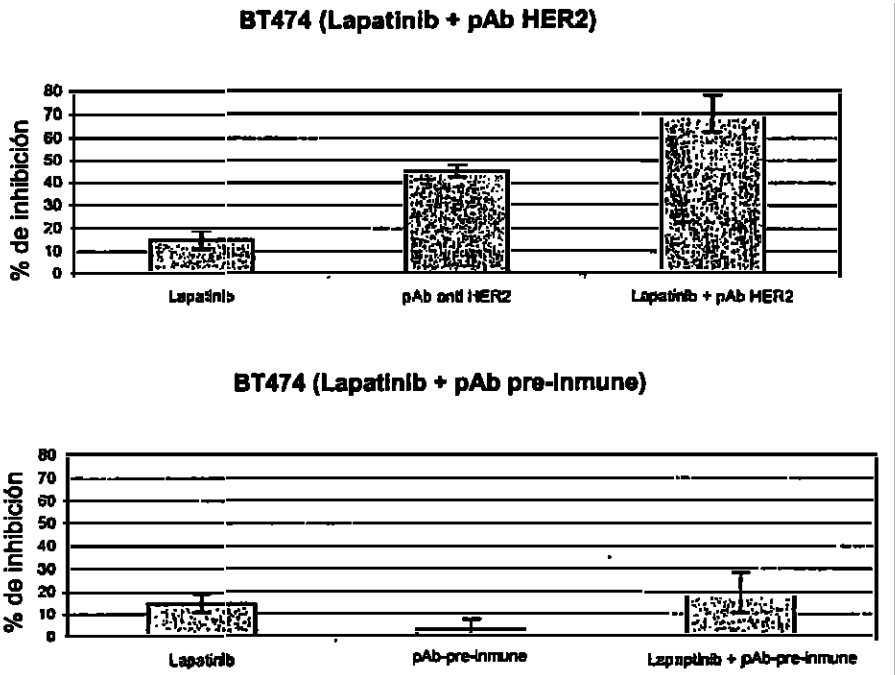


Fig. 11B

Efecto anti-proliferativo de anticuerpos policlonales anti-HER-2/neu en combinación con Lapatinib en la proliferación de células cancerígenas de seno SKBR3 humanas

Células SKBR3

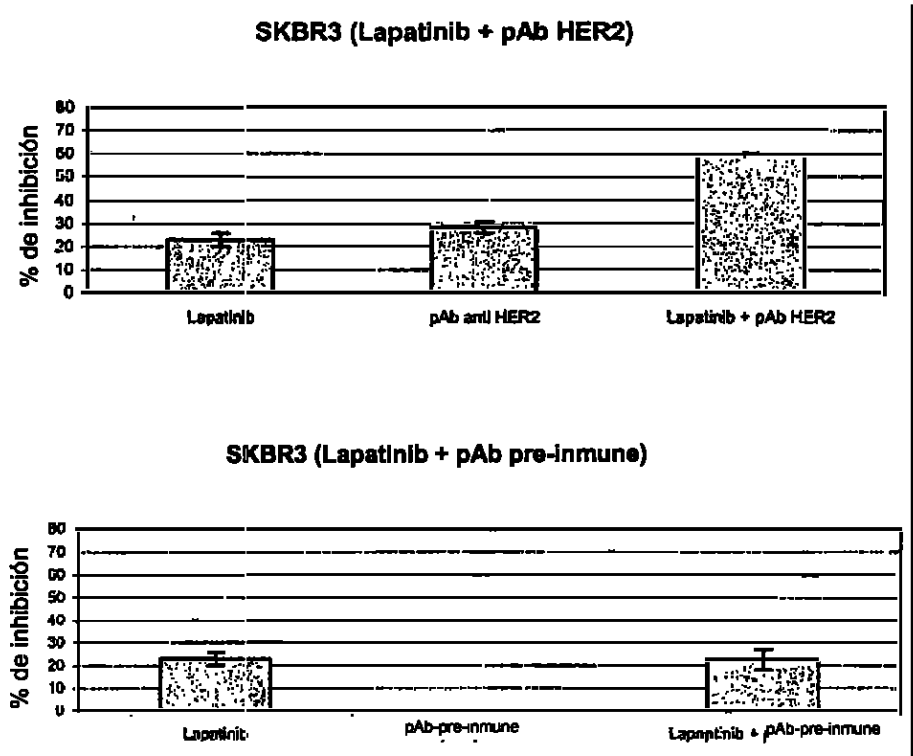


Fig. 12A

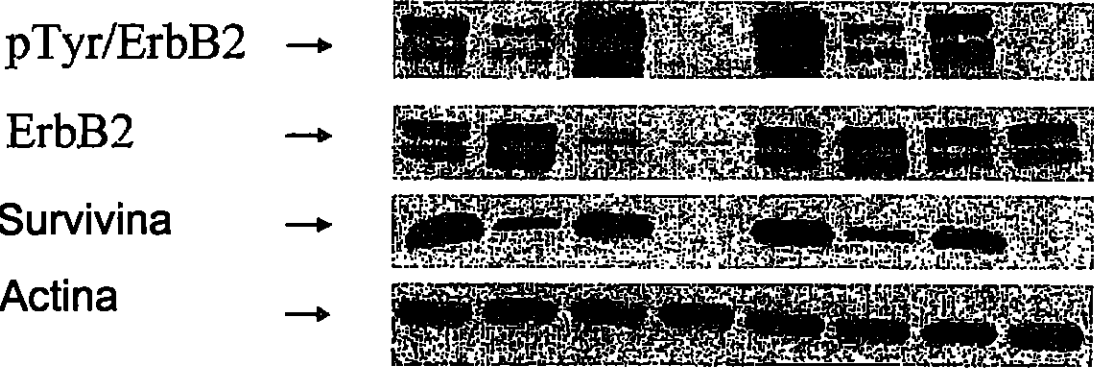
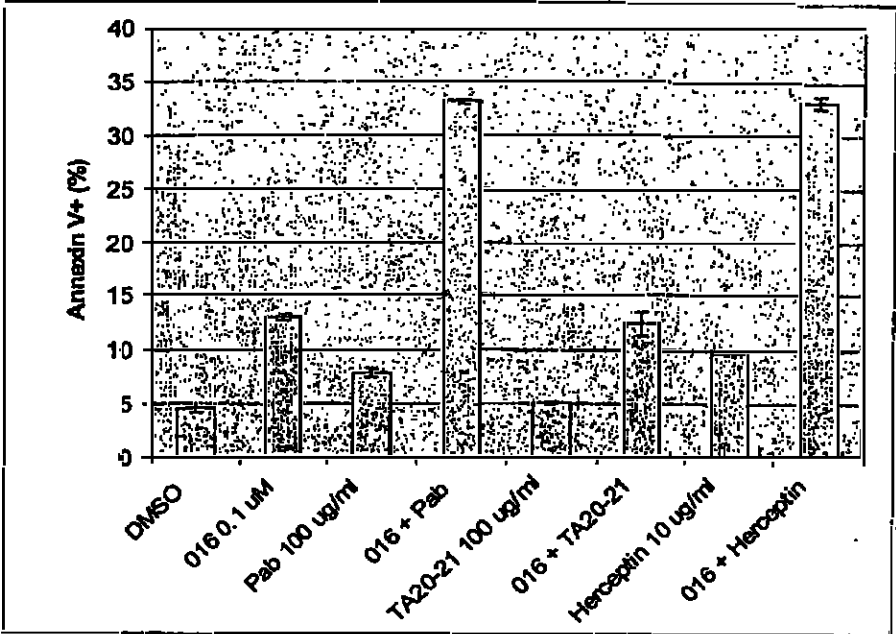


Fig. 12B

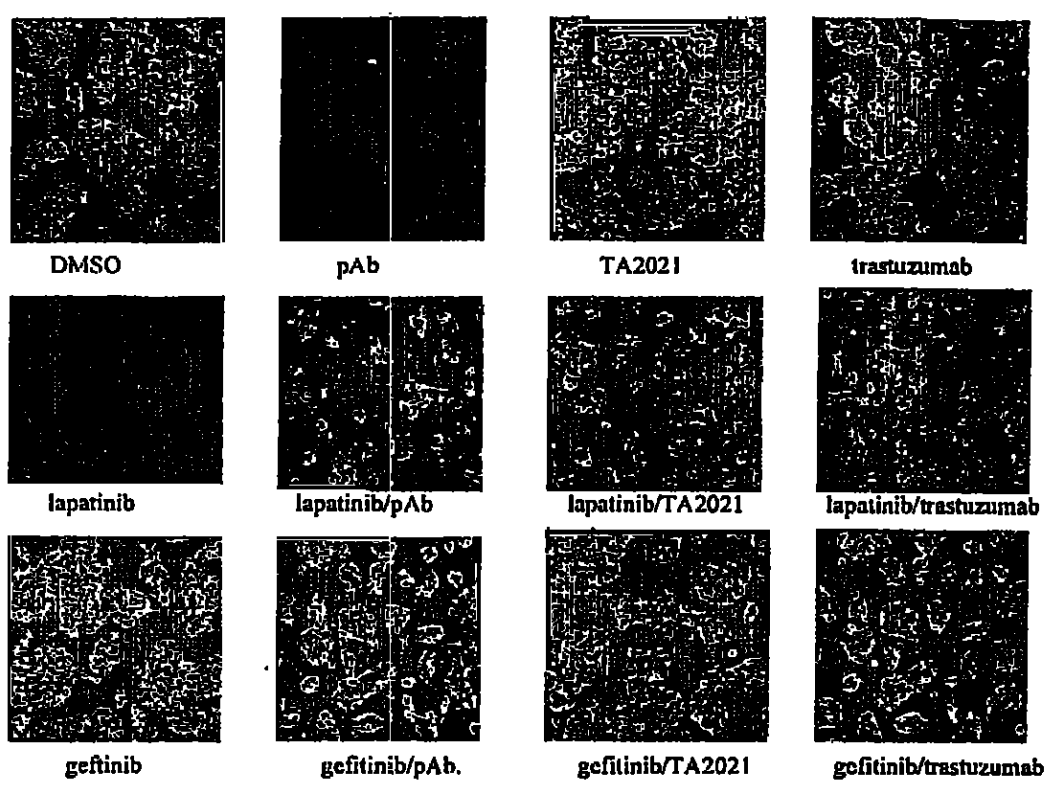


Fig. 12C

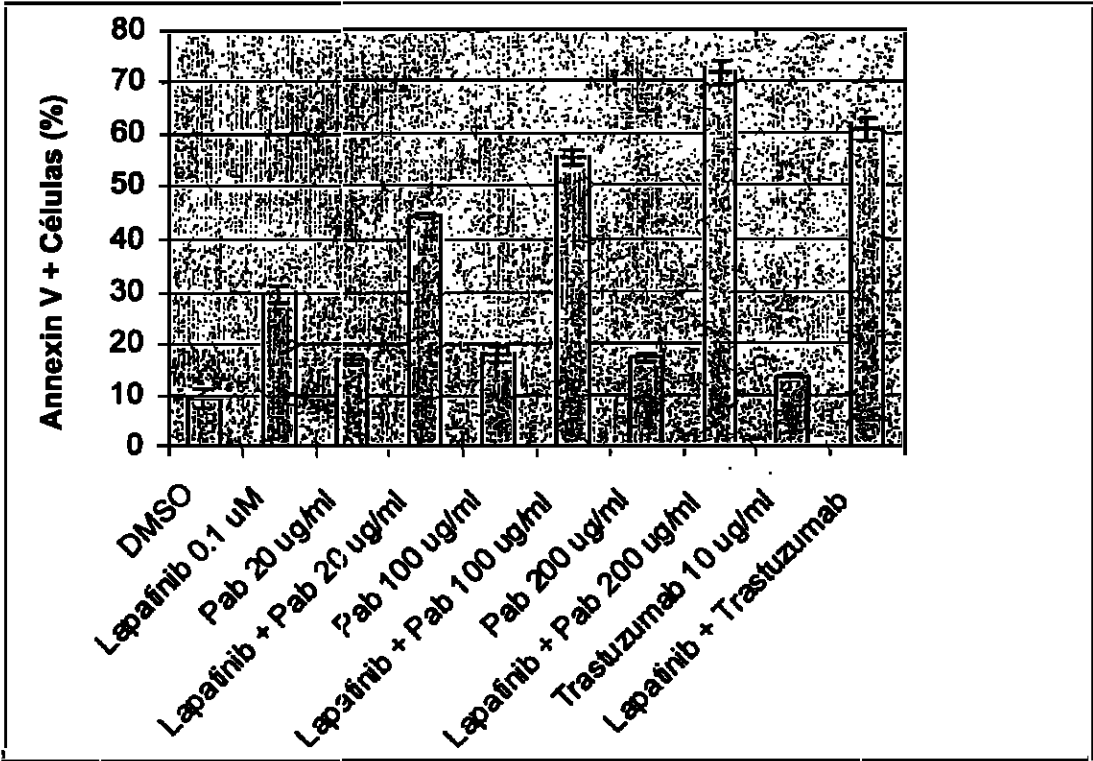


Fig. 12D

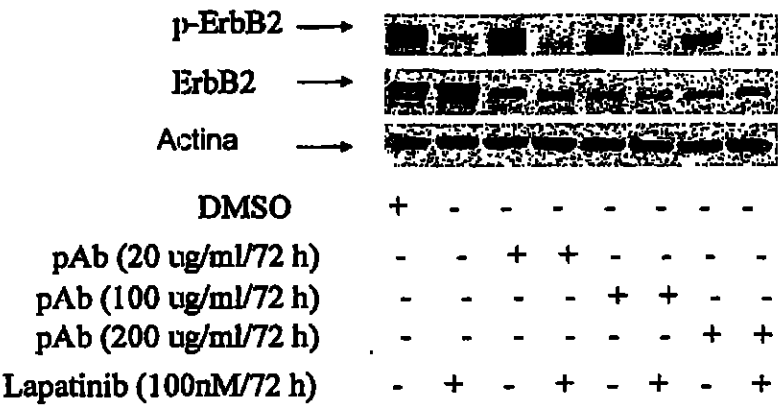


Fig. 12E

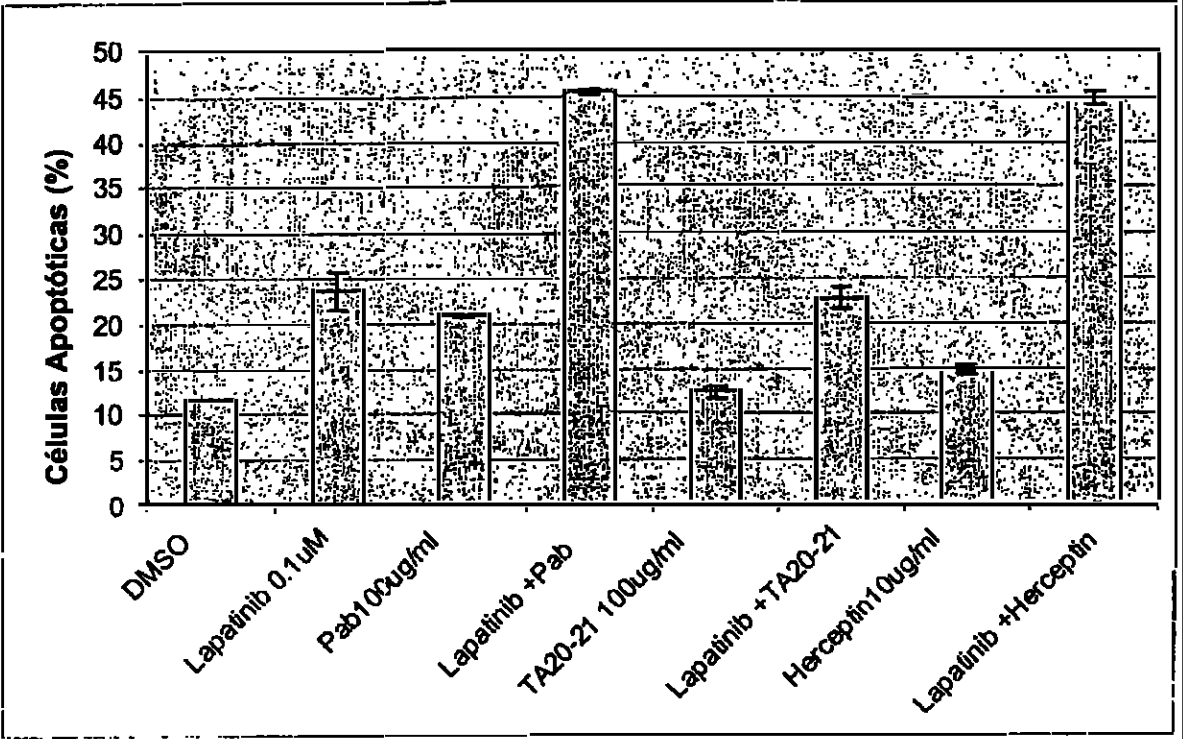


Fig. 13

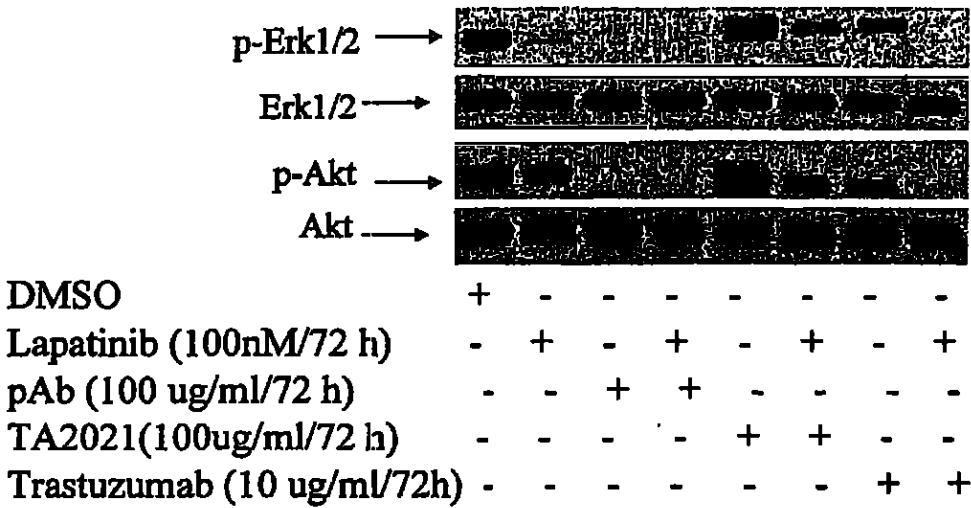
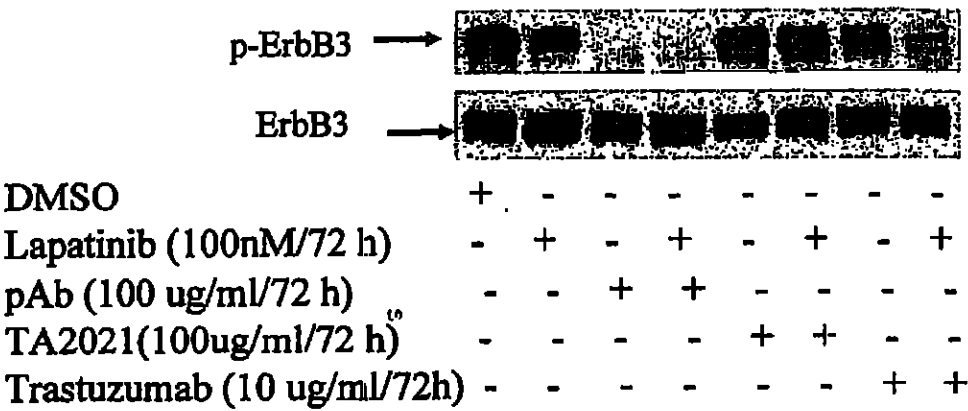
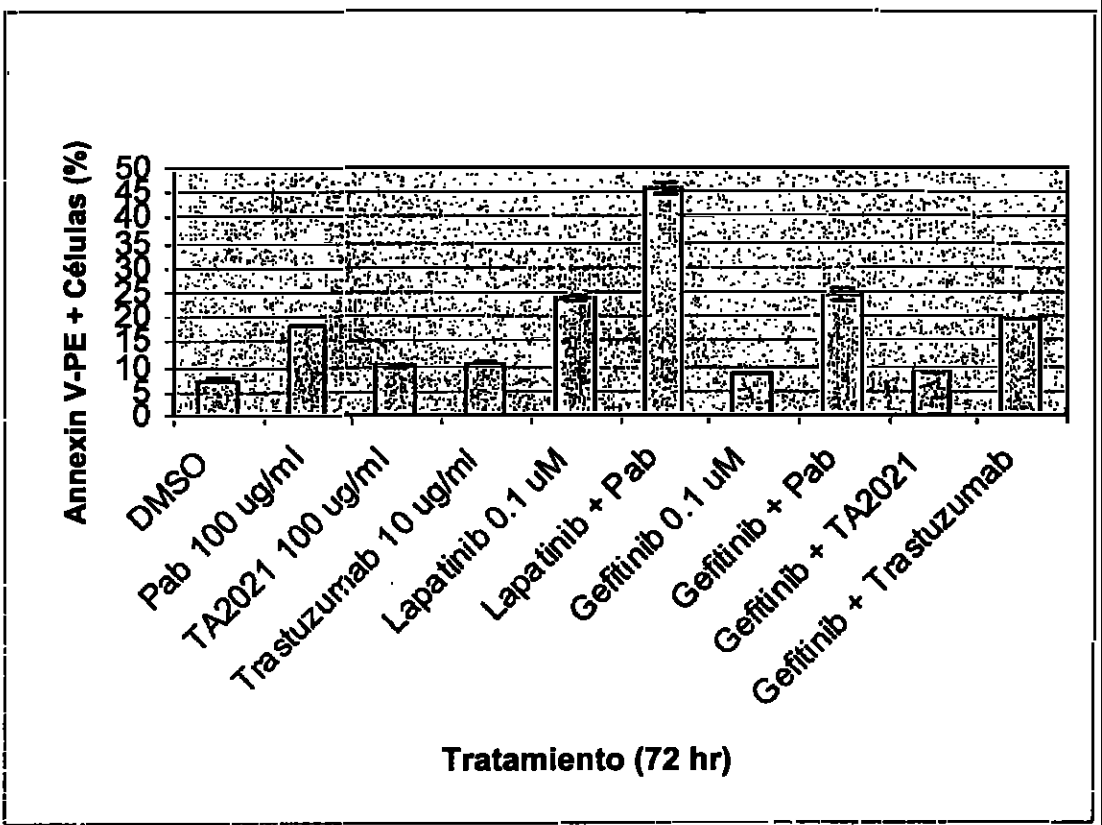


Fig. 14



170

Fig. 15A



|

Fig. 15B

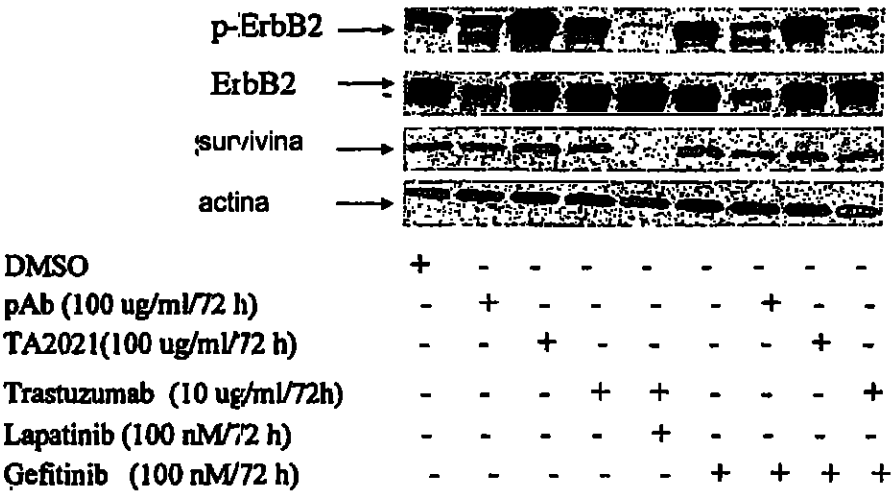


Fig. 15C

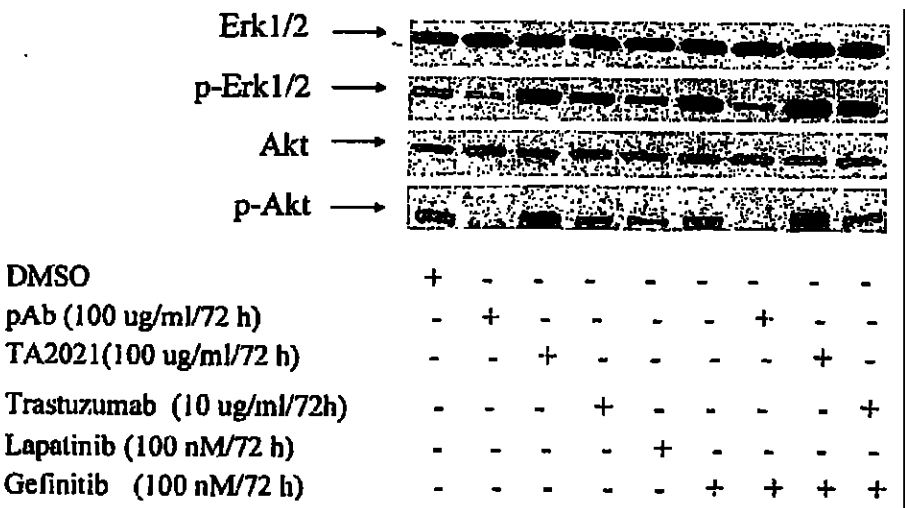


Fig. 16

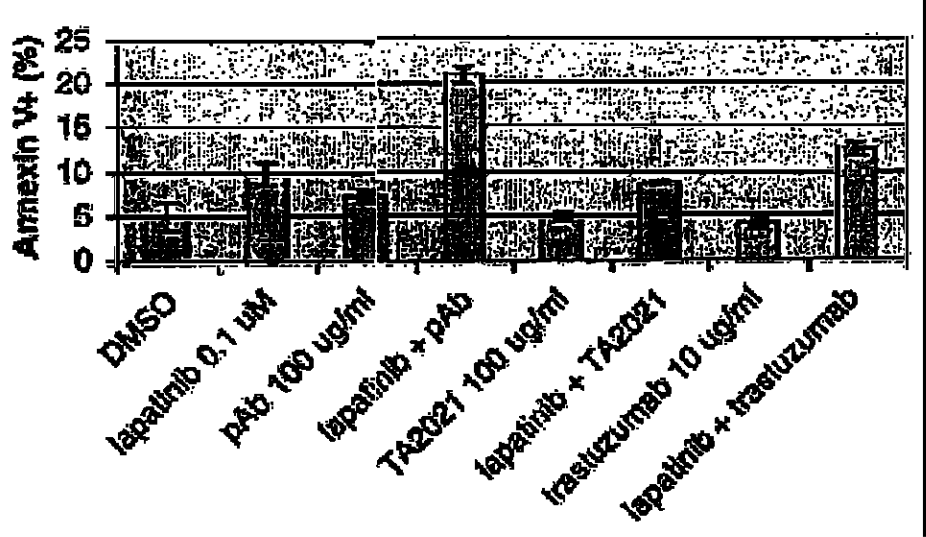
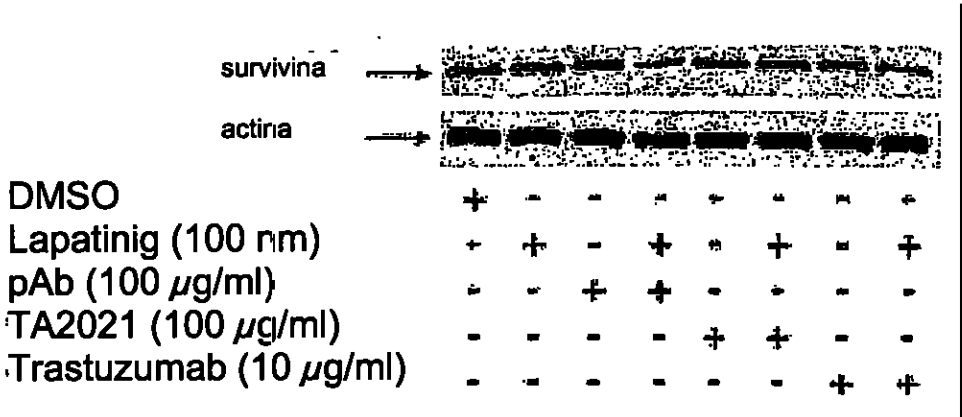
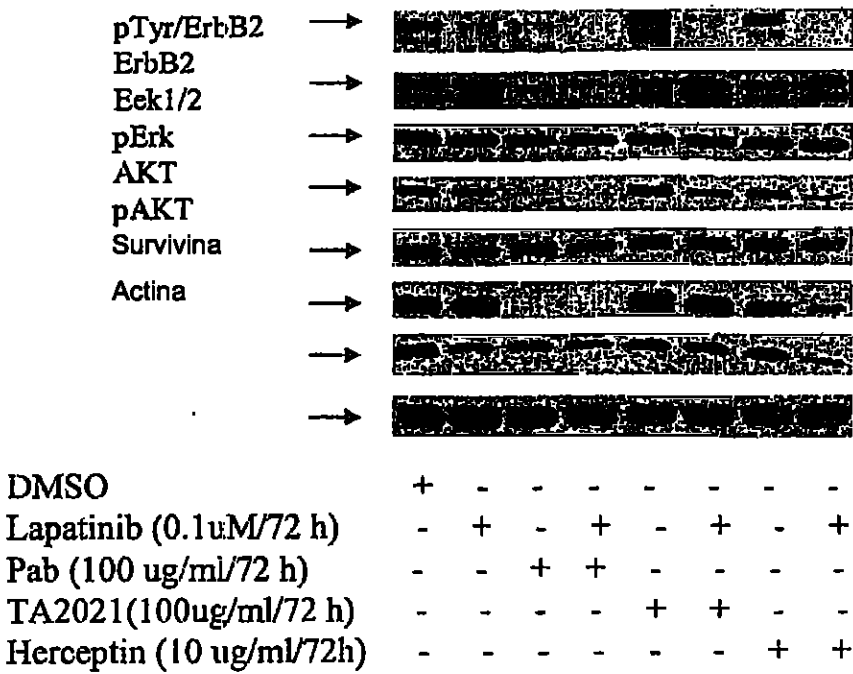


Fig. 17



175

Fig. 18



177

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-058594-00000-0000

Fecha: 2007-06-08 16:20:55 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 177



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

776

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 45
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 145
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Claudia M NENAC
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

777

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

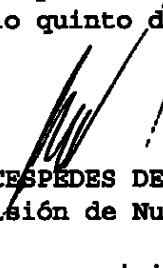
REFERENCIA	Radicación No.	7 58594
	Solicitud internacional	PCT/EP2005/013409
	Fecha inicio fase nacional	10/07/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	10969

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. (Art. 26-k) Decisión 486. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, deben legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.

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
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 07 SET. 2007
adpa11