

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No.

0755664

54. TITULO SELECCION DE PACIENTES PARA UNA TERAPIA CON UN INHIBIDOR DE HER

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE GENENTECH, INC.

DOMICILIO SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

AS: 103.694



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-055664-00000-0000

Fecha: 2007-06-01 16:10:18 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 313

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: GENENTECH, INC.

Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco, CA
94080-4990, Estados Unidos de América
Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América
Teléfono: Fax:
E-mail

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Carrera 7 # 71 - 21 Torre B - Piso 4
Bogotá, Colombia
Teléfono: 744-2200 Fax: 744-2700

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número 80.410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Lukas C. AMLER, Thomas E. JANUARIO.

Dirección: 845 Grenada Lane, Foster City, CA 94404 (US); 221 Clara Street, Apartment 14, San Francisco, CA 94107 (US). (Respectivamente)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América (Respectivamente)

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/044247 Fecha 06-12-2005

Publicación Internacional No. WO/2006/063042 A3 Fecha 15-06-2006

6 Título (54): SELECCIÓN DE PACIENTES PARA UNA TERAPIA CON UN INHIBIDOR DE HER

7 Clasificación Internacional (51):

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

07-12-2004

(31) Número de Solicitud

60/633.941

9 Comprobante de pago No. 07-37.169

Fecha 01-06-2007

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

2020-F06 (01-11-15)

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$482.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia Autenticada**
- ☐ 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 examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: Listado de Secuencias
Tarjeta de Propietarios
Documentos PCT

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:

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

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-055664- -00000-0000

Fecha: 2007-06-01 16:10:18 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Ene: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 313

A 103.89x

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 37,169
FECHA : MAYO 11 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	34944483	10/05/2007	48,112,000.00

***** CONCEPTO *****

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. _____

X

4

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



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

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/063042 A3

(51) International Patent Classification:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/044247

(22) International Filing Date:
6 December 2005 (06.12.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/633,941 7 December 2004 (07.12.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENEN-
TECH, INC. [US/US]; MS 49, 1 Dna Way, South San
Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): AMLER, Lukas,
C. [DE/US]; 845 Grenada Lane, Foster City, CA 94404
(US). JANUARIO, Thomas, E. [US/US]; 221 Clara street,
Apartment 14, San Francisco, CA 94107 (US).

(74) Agents: LEE, Wendy, M. et al.; c/o Genentech, INC., 1
DNA Way MS 49, South San Francisco, CA 94080 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
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, NL,
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).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
8 February 2007

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

(54) Title: SELECTING PATIENTS FOR THERAPY WITH A HER INHIBITOR

(57) Abstract: A method for selecting patients for therapy with a HER inhibitor, such as pertuzumab, based on gene expression analysis is described. A method for assessing HER phosphorylation or activation in a biological sample via gene expression analysis is also described.



WO 2006/063042 A3

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



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

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/063042 A2

(51) International Patent Classification:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/044247

(22) International Filing Date:
6 December 2005 (06.12.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/633,941 7 December 2004 (07.12.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENENTECH, INC. [US/US]; MS 49, 1 Dna Way, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): AMIER, Lukas, C. [DE/US]; 845 Grenada Lane, Foster City, CA 94404 (US). JANUARIO, Thomas, E. [US/US]; 221 Clara street, Apartment 14, San Francisco, CA 94107 (US).

(74) Agents: LEE, Wendy, M. et al.; c/o Genentech, INC., 1 DNA Way MS 49, South San Francisco, CA 94080 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, 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, SI, 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).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that 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.

(54) Title: SELECTING PATIENTS FOR THERAPY WITH A HER INHIBITOR

(57) Abstract: A method for selecting patients for therapy with a HER inhibitor, such as pertuzumab, based on gene expression analysis is described. A method for assessing HER phosphorylation or activation in a biological sample via gene expression analysis is also described.

WO 2006/063042 A2

5 SELECTING PATIENTS FOR THERAPY WITH A HER INHIBITOR

Field of the Invention

The present invention concerns a method for selecting patients for therapy with a HER inhibitor, such as pertuzumab, based on gene expression analysis. The invention also concerns a method for assessing HER phosphorylation or activation in a biological sample via gene expression analysis.

Background of the Invention

HER Receptors and Antibodies Thereagainst

The HER family of receptor tyrosine kinases are important mediators of cell growth, differentiation and survival. The receptor family includes four distinct members including epidermal growth factor receptor (EGFR, ErbB1, or HER1), HER2 (ErbB2 or p185^{neu}), HER3 (ErbB3) and HER4 (ErbB4 or tyro2).

EGFR, encoded by the *erbB1* gene, has been causally implicated in human malignancy. In particular, increased expression of EGFR has been observed in breast, bladder, lung, head, neck and stomach cancer as well as glioblastomas. Increased EGFR receptor expression is often associated with increased production of the EGFR ligand, transforming growth factor alpha (TGF- α), by the same tumor cells resulting in receptor activation by an autocrine stimulatory pathway. Baselga and Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994). Monoclonal antibodies directed against the EGFR or its ligands, TGF- α and EGF, have been evaluated as therapeutic agents in the treatment of such malignancies. See, e.g., Baselga and Mendelsohn, *supra*; Masui *et al. Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); and Wu *et al. J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995).

The second member of the HER family, p185^{neu}, was originally identified as the product of the transforming gene from neuroblastomas of chemically treated rats. The activated form of the *neu* proto-oncogene results from a point mutation (valine to glutamic acid) in the transmembrane region of the encoded protein. Amplification of the human homolog of *neu* is observed in breast and ovarian cancers and correlates with a poor prognosis (Slamon *et al., Science*, 235:177-182 (1987); Slamon *et al., Science*, 244:707-712 (1989); and US Pat No. 4,968,603). To date, no point mutation analogous to that in the *neu* proto-oncogene has been reported for human tumors. Overexpression of HER2 (frequently but not uniformly due to gene amplification) has also been observed in other carcinomas including carcinomas of the stomach, endometrium, salivary gland, lung, kidney, colon, thyroid, pancreas and bladder. See, among others, King *et al., Science*, 229:974 (1985); Yokota *et al., Lancet*: 1:765-767 (1986); Fukushige *et al., Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Guerin *et al., Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen *et al., Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura *et al., Cancer Res.*, 51:1034 (1991); Borst *et al., Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990); Weiner *et al., Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern *et al., Cancer Res.*, 50:5184 (1990); Park *et al., Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau *et al., Mol. Carcinog.*, 3:254-257 (1990); Aasland *et al. Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988); Williams *et al. Pathobiology* 59:46-52 (1991); and McCann *et al., Cancer*, 65:88-92 (1990). HER2 may be overexpressed in prostate cancer (Gu *et al. Cancer Lett.* 99:185-9 (1996); Ross *et al. Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997); Ross *et al. Cancer* 79:2162-70 (1997); and Sadasivan *et al. J. Urol.* 150:126-31 (1993)).

5 Antibodies directed against the rat p185^{neu} and human HER2 protein products have been described.

Drebin and colleagues have raised antibodies against the rat *neu* gene product, p185^{neu}. See, for example, Drebin *et al.*, *Cell* 41:695-706 (1985); Myers *et al.*, *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991); and WO94/22478. Drebin *et al.* *Oncogene* 2:273-277 (1988) report that mixtures of antibodies reactive with two distinct regions of p185^{neu} result in synergistic anti-tumor effects on *neu*-transformed NIH-3T3 cells implanted

10 into nude mice. See also U.S. Patent 5,824,311 issued October 20, 1998.

- Hudziak *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989) describe the generation of a panel of HER2 antibodies which were characterized using the human breast tumor cell line SK-BR-3. Relative cell proliferation of the SK-BR-3 cells following exposure to the antibodies was determined by crystal violet staining of the monolayers after 72 hours. Using this assay, maximum inhibition was obtained with the antibody called 4D5 which inhibited cellular proliferation by 56%. Other antibodies in the panel reduced cellular proliferation to a lesser extent in this assay. The antibody 4D5 was further found to sensitize HER2-overexpressing breast tumor cell lines to the cytotoxic effects of TNF- α . See also U.S. Patent No. 5,677,171 issued October 14, 1997. The HER2 antibodies discussed in Hudziak *et al.* are further characterized in Fendly *et al.* *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts *et al.* *In Vitro* 26(3):59A (1990); Sarup *et al.* *Growth Regulation* 1:72-82 (1991); Shepard *et al.* *J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127 (1991); Kumar *et al.* *Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986 (1991); Lewis *et al.* *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras *et al.* *Oncogene* 9:1829-1838 (1994); Vitetta *et al.* *Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski *et al.* *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994); Scott *et al.* *J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991); D'souza *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994); Lewis *et al.* *Cancer Research* 56:1457-1465 (1996); and Schaefer *et al.* *Oncogene* 15:1385-1394 (1997).

15 A recombinant humanized version of the murine HER2 antibody 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, trastuzumab or HERCEPTIN[®]; U.S. Patent No. 5,821,337) is clinically active in patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancers that have received extensive prior anti-cancer therapy (Baselga *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996)). trastuzumab received marketing approval from the Food and Drug Administration September 25, 1998 for the treatment of patients with metastatic breast cancer whose tumors overexpress the HER2 protein.

20 Other HER2 antibodies with various properties have been described in Tagliabue *et al.* *Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991); McKenzie *et al.* *Oncogene* 4:543-548 (1989); Maier *et al.* *Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991); Bacus *et al.* *Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990); Stancovski *et al.* *PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991); Bacus *et al.* *Cancer Research* 52:2580-2589 (1992); Xu *et al.* *Int. J. Cancer* 53:401-408 (1993); WO94/00136; Kasprzyk *et al.* *Cancer Research* 52:2771-2776 (1992); Hancock *et al.* *Cancer Res.* 51:4575-4580 (1991); Shawver *et al.* *Cancer Res.* 54:1367-1373 (1994); Arteaga *et al.* *Cancer Res.* 54:3758-3765 (1994); Harwerth *et al.* *J. Biol. Chem.* 267:15160-15167 (1992); U.S. Patent No. 5,783,186; and Klapper *et al.* *Oncogene* 14:2099-2109 (1997).

35 Homology screening has resulted in the identification of two other HER receptor family members; HER3 (US Pat. Nos. 5,183,884 and 5,480,968 as well as Kraus *et al.* *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)) and

5 HER4 (EP Pat Appln No 599,274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); and Plowman *et al.*, *Nature*, 366:473-475 (1993)). Both of these receptors display increased expression on at least some breast cancer cell lines.

The HER receptors are generally found in various combinations in cells and heterodimerization is thought to increase the diversity of cellular responses to a variety of HER ligands (Earp *et al. Breast Cancer Research and Treatment* 35: 115-132 (1995)). EGFR is bound by six different ligands; epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor alpha (TGF- α), amphiregulin, heparin binding epidermal growth factor (HB-EGF), betacellulin and epiregulin (Groenen *et al. Growth Factors* 11:235-257 (1994)). A family of heregulin proteins resulting from alternative splicing of a single gene are ligands for HER3 and HER4. The heregulin family includes alpha, beta and gamma heregulins (Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205-1210 (1992); U.S. Patent No. 5,641,869; and Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394 (1997)); neu differentiation factors (NDFs), glial growth factors (GGFs); acetylcholine receptor inducing activity (ARIA); and sensory and motor neuron derived factor (SMDF). For a review, see Groenen *et al. Growth Factors* 11:235-257 (1994); Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247-262 (1996) and Lee *et al. Pharm. Rev.* 47:51-85 (1995). Recently three additional HER ligands were identified; neuregulin-2 (NRG-2) which is reported to bind either HER3 or HER4 (Chang *et al. Nature* 387 509-512 (1997); and Carraway *et al. Nature* 387:512-516 (1997)); neuregulin-3 which binds HER4 (Zhang *et al. PNAS (USA)* 94(18):9562-7 (1997)); and neuregulin-4 which binds HER4 (Harari *et al. Oncogene* 18:2681-89 (1999)) HB-EGF, betacellulin and epiregulin also bind to HER4.

While EGF and TGF α do not bind HER2, EGF stimulates EGFR and HER2 to form a heterodimer, which activates EGFR and results in transphosphorylation of HER2 in the heterodimer. Dimerization and/or transphosphorylation appears to activate the HER2 tyrosine kinase. See Earp *et al.*, *supra*. Likewise, when HER3 is co-expressed with HER2, an active signaling complex is formed and antibodies directed against HER2 are capable of disrupting this complex (Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)). Additionally, the affinity of HER3 for heregulin (HRG) is increased to a higher affinity state when co-expressed with HER2. See also, Levi *et al.*, *Journal of Neuroscience* 15: 1329-1340 (1995); Morrissey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1431-1435 (1995); and Lewis *et al.*, *Cancer Res.*, 56:1457-1465 (1996) with respect to the HER2-HER3 protein complex. HER4, like HER3, forms an active signaling complex with HER2 (Carraway and Cantley, *Cell* 78:5-8 (1994)).

Ovarian Cancer

35 Ovarian cancer is the most common cause of death from malignancy of the female reproductive tract. There are an estimated 24,000 new diagnoses per year in the United States, with approximately 13,000 deaths from the disease. Patients with advanced ovarian cancer are frequently treated with platinum-based chemotherapy, often combined with a taxane. After these agents have failed, there are few therapeutic options. Patients with platinum-sensitive disease are often re-treated with platinum, but a substantial proportion of patients have a short duration of response after re-treatment. For those with platinum-resistant disease outcome is less favorable. Topotecan is approved by the Food and Drug Administration (FDA) for patients who have have

5 failed initial or subsequent chemotherapy; liposomal doxorubicin is approved only for patients with ovarian cancer that is refractory to both platinum- and paclitaxel-based chemotherapy regimens. Topotecan and liposomal doxorubicin have shown a partial response rate of 6% and 12% respectively in patients with platinum-resistant disease, with a median progression-free survival of 14 –18 weeks. More recently, promising results with gemcitabine have been reported in platinum-resistant ovarian cancer with partial responses at 16%, leading to increasing use of this agent as 2nd line therapy. However, there is a clear need for new and improved therapeutic options for patients with advanced ovarian cancer for whom existing therapies have failed.

The HER family of receptor tyrosine kinases are implicated in the pathogenesis of ovarian cancer. To target the HER signaling pathway, pertuzumab (rhuMAb 2C4) was developed as a humanized antibody that inhibits the dimerization of HER2 with other HER receptors, thereby inhibiting ligand-driven phosphorylation and activation, and downstream activation of the RAS and AKT pathways.

Gemcitabine has been used in a variety of tumors and is indicated for use in pancreatic and lung cancer. The most common toxicities with use of single agent gemcitabine include cytopenias, with an incidence of anemia and neutropenia of 68% and 63%, respectively. Another common toxicity is nausea and vomiting, with a combined incidence of 69%, with a 13% grade III and a 1% grade IV incidence. Diarrhea occurs less frequently at 19%. Rash occurs more commonly at 30%, with only a 1% grade III incidence. Gemcitabine has been combined with many other chemotherapeutic agents, such as the taxanes, anthracyclines, and platinum without any significant increases or unexpected toxicities.

Trastuzumab has been combined with gemcitabine in several combinations of different chemotherapies in phase II trials and was also well tolerated with no observed cardiac or unexpected toxicities. Safran *et al.* *Proc Am. Soc. Clin. Oncol.* 20:130a (2001), Miller *et al.* *Oncology* 15(2): 38-40 (2001). See, also, Zinner *et al.* *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20:328a (2001), Nagourney *et al.* *Breast Cancer Res. Treat.* 57:116, Abstract 475 (1999), Bun *et al.* *Proc. Am. Assoc. Canc. Res.* 41:719, Abstract #4571 (2000), Konecny *et al.* *Breast Cancer Res Treat* 57: 114, Abstract 467 (1999), O'Shaughnessy *et al.* *Sem. Oncol* 2(suppl3):22-26 (2004), Sledge *et al.* *Sem. Oncol* 2(suppl3):19-21 (2003), Zinner *et al.* *Lung Cancer* 44(1):99-110 (2004), Gatzemeier *et al.* *Ann of Oncol.* 15:19-27 (2004), concerning the combination of trastuzumab and Gemcitabine.

In a phase I trial of Omnitarg as a single agent for treating solid tumors, 3 subjects with advanced ovarian cancer were treated with pertuzumab. One had a durable partial response, and an additional subject had stable disease for 15 weeks. Agus *et al.* *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: 192, Abstract 771 (2003).

Diagnostics

Patients treated with the HER2 antibody trastuzumab are generally selected for therapy based on HER2 overexpression/amplification. See, for example, WO99/31140 (Paton *et al.*), US2003/0170234A1 (Hellmann, S.), and US2003/0147884 (Paton *et al.*); as well as WO01/89566, US2002/0064785, and US2003/0134344 (Mass *et al.*). See, also, US2003/0152987, Cohen *et al.*, concerning immunohistochemistry (IHC) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for detecting HER2 overexpression and amplification.

WO2004/053497 (Bacus *et al.*) refers to determining or predicting response to HERCEPTIN® therapy.

5 US2004/013297A1 (Bacus *et al.*) concerns determining or predicting response to ABX0303 EGFR antibody therapy. WO2004/000094 (Bacus *et al.*) is directed to determining response to GW572016, a small molecule, EGFR-HER2 tyrosine kinase inhibitor. WO2004/063709, Amler *et al.*, refers to biomarkers and methods for determining sensitivity to EGFR inhibitor, erlotinib HCl. US2004/0209290, Cobleigh *et al.*, concerns gene expression markers for breast cancer prognosis.

10 Patent publications concerning pertuzumab and selection of patients for therapy therewith include: WO01/00245 (Adams *et al.*); US2003/0086924 (Sliwkowski, M.); US2004/0013667A1 (Sliwkowski, M.); as well as WO2004/008099A2, and US2004/0106161 (Bossenmaier *et al.*).

15 Cronin *et al. Am. J. Path.* 164(1): 35-42 (2004) describes measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues. Ma *et al. Cancer Cell* 5:607-616 (2004) describes gene profiling by gene oligonucleotide microarray using isolated RNA from tumor-tissue sections taken from archived primary biopsies.

Summary of the Invention

20 The present invention relates, at least in part, to the discovery that expression profiling of certain genes can serve as a surrogate to determining HER phosphorylation or activation. This is particularly advantageous where the sample being tested is a fixed specimen, as there are technical challenges to reliably assessing HER2 phosphorylation in fixed tissue or tumor samples. Screening patients who show the desired expression profiling will lead to the identification of a subpopulation of patients who can derive greater clinical benefit from a HER inhibitor such as pertuzumab.

25 Accordingly, in a first embodiment, the invention provides a method for treating cancer comprising administering to a patient a HER inhibitor in an amount effective to treat the cancer, wherein a tumor sample from the patient expresses two or more HER receptors and one or more HER ligand.

30 In addition, the invention provides a method for treating cancer comprising administering to a patient a HER inhibitor in an amount effective to treat the cancer, wherein a tumor sample from the patient expresses betacellulin or amphiregulin.

In another embodiment, the invention concerns a method for treating cancer, comprising administering to a patient a HER2 antibody that binds to Domain II of HER2 in an amount effective to treat the cancer, wherein a tumor sample from the patient expresses HER2 and EGFR or HER3, as well as betacellulin or amphiregulin.

35 The invention also relates to a method of assessing HER phosphorylation or activation in a biological sample, comprising determining expression of two or more HER receptors and one or more HER ligand in the sample, wherein expression of the two or more HER receptors and one or more HER ligand indicates HER phosphorylation or activation in the sample.

40 Also, the invention pertains to a method of assessing HER phosphorylation or activation in a biological sample, comprising determining expression of betacellulin or amphiregulin in the sample, wherein expression of betacellulin or amphiregulin indicates HER phosphorylation or activation in the sample.

5 In yet another aspect, the invention provides a method of identifying a patient for therapy with a HER dimerization inhibitor comprising determining expression of two or more HER receptors and one or more HER ligand in a sample from the patient, wherein expression of the HER receptors and HER ligand indicates the patient is likely to respond to therapy with the HER dimerization inhibitor.

10 The invention also relates, in yet another aspect, to a method for treating ovarian cancer comprising administering to a patient a HER inhibitor in an amount effective to treat the ovarian cancer, wherein a tumor sample from the patient expresses betacellulin or amphiregulin.

Brief Description of the Drawings

15 Figure 1 provides a schematic of the HER2 protein structure, and amino acid sequences for Domains I-IV (SEQ ID Nos.19-22, respectively) of the extracellular domain thereof.

20 Figures 2A and 2B depict alignments of the amino acid sequences of the variable light (V_L) (Fig. 2A) and variable heavy (V_H) (Fig. 2B) domains of murine monoclonal antibody 2C4 (SEQ ID Nos. 1 and 2, respectively); V_L and V_H domains of humanized 2C4 version 574 (SEQ ID Nos. 3 and 4, respectively), and human V_L and V_H consensus frameworks (hum κ 1, light kappa subgroup I; humIII, heavy subgroup III) (SEQ ID Nos. 5 and 6, respectively). Asterisks identify differences between humanized 2C4 version 574 and murine monoclonal antibody 2C4 or between humanized 2C4 version 574 and the human framework. Complementarity Determining Regions (CDRs) are in brackets.

25 Figures 3A and 3B show the amino acid sequences of pertuzumab light chain and heavy chain (SEQ ID Nos. 13 and 14, respectively). CDRs are shown in bold. Calculated molecular mass of the light chain and heavy chain are 23,526.22 Da and 49,216.56 Da (cysteines in reduced form). The carbohydrate moiety is attached to Asn 299 of the heavy chain.

Figure 4 depicts, schematically, binding of 2C4 at the heterodimeric binding site of HER2, thereby preventing heterodimerization with activated EGFR or HER3.

Figure 5 depicts coupling of HER2/HER3 to the MAPK and Akt pathways.

30 Figure 6 compares various activities of trastuzumab and pertuzumab.

Figures 7A and 7B show the amino acid sequences of trastuzumab light chain (Fig. 7A; SEQ ID No. 15) and heavy chain (Fig. 7B; SEQ ID No. 16), respectively.

Figures 8A and 8B depict a variant pertuzumab light chain sequence (Fig. 8A; SEQ ID No. 17) and a variant pertuzumab heavy chain sequence (Fig. 8B; SEQ ID No. 18), respectively.

35 Figures 9A and 9B show oligosaccharide structures commonly observed in IgG antibodies.

Figure 10 shows hierarchical clustering of 25 tumors from ovarian cancer patients with known HER2 phosphorylation status using the mRNA expression values of HER2, EGFR, HER3, and betacellulin determined by AFFYMETRIX® microarray expression profiling.

40 Figure 11 depicts the use of HER2, EGFR, HER3 and betacellulin mRNA expression determined by AFFYMETRIX® microarray expression profiling to predict HER2 phosphorylation status.

Figure 12 depicts the correlation of betacellulin mRNA expression determined by AFFYMETRIX®

5 microarray expression profiling to the HER2 phosphorylation status.

Figure 13 shows the assay characteristics for the qRT-PCR measurements. Cycle Threshold (CT) quantifies absolute mRNA expression.

Figure 14 shows hierarchical clustering of 25 tumors from ovarian cancer patients with known HER2 phosphorylation status using the mRNA expression values of HER2, EGFR, HER3 and betacellulin, determined by qRT-PCR.

Figure 15 depicts the use of HER2, EGFR, HER3 and betacellulin mRNA expression determined by qRT-PCR to predict HER2 phosphorylation status.

Figure 16 depicts the correlation of betacellulin mRNA expression determined by qRT-PCR to the HER2 phosphorylation status.

Figure 17 depicts the correlation of amphiregulin mRNA expression determined by qRT-PCR to the HER2 phosphorylation status.

Detailed Description of the Preferred Embodiments

I. Definitions

A "HER receptor" is a receptor protein tyrosine kinase which belongs to the HER receptor family and includes EGFR, HER2, HER3 and HER4 receptors. The HER receptor will generally comprise an extracellular domain, which may bind an HER ligand and/or dimerize with another HER receptor molecule; a lipophilic transmembrane domain; a conserved intracellular tyrosine kinase domain; and a carboxyl-terminal signaling domain harboring several tyrosine residues which can be phosphorylated. The HER receptor may be a "native sequence" HER receptor or an "amino acid sequence variant" thereof. Preferably the HER receptor is native sequence human HER receptor.

The terms "ErbB1," "HER1", "epidermal growth factor receptor" and "EGFR" are used interchangeably herein and refer to EGFR as disclosed, for example, in Carpenter *et al. Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987), including naturally occurring mutant forms thereof (e.g. a deletion mutant EGFR as in Humphrey *et al. PNAS (USA)* 87:4207-4211 (1990)). *erbB1* refers to the gene encoding the EGFR protein product.

The expressions "ErbB2" and "HER2" are used interchangeably herein and refer to human HER2 protein described, for example, in Semba *et al., PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985) and Yamamoto *et al. Nature* 319:230-234 (1986) (Genebank accession number X03363). The term "*erbB2*" refers to the gene encoding human ErbB2 and "*neu*" refers to the gene encoding rat p185^{neu}. Preferred HER2 is native sequence human HER2.

The extracellular domain of HER2 comprises four domains: "Domain I" (amino acid residues from about 1-195; SEQ ID NO:19), "Domain II" (amino acid residues from about 196-319; SEQ ID NO:20), "Domain III" (amino acid residues from about 320-488; SEQ ID NO:21), and "Domain IV" (amino acid residues from about 489-630; SEQ ID NO:22) (residue numbering without signal peptide). See Garrett *et al. Mol. Cell.* 11: 495-505 (2003), Cho *et al. Nature* 421: 756-760 (2003), Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328

5 (2004), and Plowman *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1746-1750 (1993), as well as Fig. 1 herein.

"ErbB3" and "HER3" refer to the receptor polypeptide as disclosed, for example, in US Pat. Nos. 5,183,884 and 5,480,968 as well as Kraus *et al. PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989).

The terms "ErbB4" and "HER4" herein refer to the receptor polypeptide as disclosed, for example, in EP Pat Appln No 599,274; Plowman *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); and Plowman *et al., Nature*, 366:473-475 (1993), including isoforms thereof, *e.g.*, as disclosed in WO99/19488, published April 22, 1999.

By "HER ligand" is meant a polypeptide which binds to and/or activates a HER receptor. The HER ligand of particular interest herein is a native sequence human HER ligand such as epidermal growth factor (EGF) (Savage *et al., J. Biol. Chem.* 247:7612-7621 (1972)); transforming growth factor alpha (TGF- α) (Marquardt *et al., Science* 223:1079-1082 (1984)); amphiregulin also known as schwannoma or keratinocyte autocrine growth factor (Shoyab *et al. Science* 243:1074-1076 (1989); Kimura *et al. Nature* 348:257-260 (1990); and Cook *et al. Mol. Cell. Biol.* 11:2547-2557 (1991)); betacellulin (Shing *et al., Science* 259:1604-1607 (1993); and Sasada *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:1173 (1993)); heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) (Higashiyama *et al., Science* 251:936-939 (1991)); epiregulin (Toyoda *et al., J. Biol. Chem.* 270:7495-7500 (1995); and Komurasaki *et al. Oncogene* 15:2841-2848 (1997)); a heregulin (see below); neuregulin-2 (NRG-2) (Carraway *et al., Nature* 387:512-516 (1997)); neuregulin-3 (NRG-3) (Zhang *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9562-9567 (1997)); neuregulin-4 (NRG-4) (Harari *et al. Oncogene* 18:2681-89 (1999)); and cripto (CR-1) (Kannan *et al. J. Biol. Chem.* 272(6):3330-3335 (1997)). HER ligands which bind EGFR include EGF, TGF- α , amphiregulin, betacellulin, HB-EGF and epiregulin. HER ligands which bind HER3 include heregulins. HER ligands capable of binding HER4 include betacellulin, epiregulin, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4, and heregulins.

"Heregulin" (HRG) when used herein refers to a polypeptide encoded by the heregulin gene product as disclosed in U.S. Patent No. 5,641,869, or Marchionni *et al., Nature*, 362:312-318 (1993). Examples of heregulins include heregulin- α , heregulin- β 1, heregulin- β 2 and heregulin- β 3 (Holmes *et al., Science*, 256:1205-1210 (1992); and U.S. Patent No. 5,641,869); *neu* differentiation factor (NDF) (Peles *et al. Cell* 69: 205-216 (1992)); acetylcholine receptor-inducing activity (ARIA) (Fells *et al. Cell* 72:801-815 (1993)); glial growth factors (GGFs) (Marchionni *et al., Nature*, 362:312-318 (1993)); sensory and motor neuron derived factor (SMDF) (Ho *et al. J. Biol. Chem.* 270:14523-14532 (1995)); γ -heregulin (Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394 (1997)).

Protein "expression" refers to conversion of the information encoded in a gene into messenger RNA (mRNA) and then to the protein.

Herein, a sample or cell that "expresses" a protein of interest (such as a HER receptor or HER ligand) is one in which mRNA encoding the protein, or the protein, is determined to be present in the sample or cell.

Exemplary "housekeeping" genes which can be used to normalize genes are glucuronidase (GUS), B-actin, and PRL19, with GUS being preferred as exhibiting the least variation of expression across samples tested herein.

2/14

5 The technique of "polymerase chain reaction" or "PCR" as used herein generally refers to a procedure wherein minute amounts of a specific piece of nucleic acid, RNA and/or DNA, are amplified as described in U.S. Pat. No. 4,683,195 issued 28 July 1987. Generally, sequence information from the ends of the region of interest or beyond needs to be available, such that oligonucleotide primers can be designed; these primers will be identical or similar in sequence to opposite strands of the template to be amplified. The 5' terminal nucleotides of the two primers may coincide with the ends of the amplified material. PCR can be used to amplify specific RNA sequences, specific DNA sequences from total genomic DNA, and cDNA transcribed from total cellular RNA, bacteriophage or plasmid sequences, etc. See generally Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263 (1987); Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989). As used herein, PCR is considered to be one, but not the only, example of a nucleic acid polymerase reaction method for amplifying a nucleic acid test sample, comprising the use of a known nucleic acid (DNA or RNA) as a primer and utilizes a nucleic acid polymerase to amplify or generate a specific piece of nucleic acid or to amplify or generate a specific piece of nucleic acid which is complementary to a particular nucleic acid.

15 "Quantitative real time polymerase chain reaction" or "qRT-PCR" refers to a form of PCR wherein the amount of PCR product is measured at each step in a PCR reaction. This technique has been described in various publications including Cronin *et al.*, *supra*, and Ma *et al.*, *supra*.

20 The term "microarray" refers to an ordered arrangement of hybridizable array elements, preferably polynucleotide probes, on a substrate.

25 The term "polynucleotide," when used in singular or plural, generally refers to any polyribonucleotide or polydeoxribonucleotide, which may be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA. Thus, for instance, polynucleotides as defined herein include, without limitation, single- and double-stranded DNA, DNA including single- and double-stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA including single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded or include single- and double-stranded regions. In addition, the term "polynucleotide" as used herein refers to triple- stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. The strands in such regions may be from the same molecule or from different molecules. The regions may include all of one or more of the molecules, but more typically involve only a region of some of the molecules. One of the molecules of a triple-helical region often is an oligonucleotide. The term "polynucleotide" specifically includes cDNAs. The term includes DNAs (including cDNAs) and RNAs that contain one or more modified bases. Thus, DNAs or RNAs with backbones modified for stability or for other reasons are "polynucleotides" as that term is intended herein. Moreover, DNAs or RNAs comprising unusual bases, such as inosine, or modified bases, such as tritiated bases, are included within the term "polynucleotides" as defined herein. In general, the term "polynucleotide" embraces all chemically, enzymatically and/or metabolically modified forms of unmodified polynucleotides, as well as the chemical forms of DNA and RNA characteristic of viruses and cells, including simple and complex cells.

40 The term "oligonucleotide" refers to a relatively short polynucleotide, including, without limitation,

5 single-stranded deoxyribonucleotides, single- or double-stranded ribonucleotides, RNA:DNA hybrids and double-stranded DNAs. Oligonucleotides, such as single-stranded DNA probe oligonucleotides, are often synthesized by chemical methods, for example using automated oligonucleotide synthesizers that are commercially available. However, oligonucleotides can be made by a variety of other methods, including in vitro recombinant DNA-mediated techniques and by expression of DNAs in cells and organisms.

10 The phrase "gene amplification" refers to a process by which multiple copies of a gene or gene fragment are formed in a particular cell or cell line. The duplicated region (a stretch of amplified DNA) is often referred to as "amplicon." Usually, the amount of the messenger RNA (mRNA) produced also increases in the proportion of the number of copies made of the particular gene expressed.

15 "Stringency" of hybridization reactions is readily determinable by one of ordinary skill in the art, and generally is an empirical calculation dependent upon probe length, washing temperature, and salt concentration. In general, longer probes require higher temperatures for proper annealing, while shorter probes need lower temperatures. Hybridization generally depends on the ability of denatured DNA to reanneal when complementary strands are present in an environment below their melting temperature. The higher the degree of desired homology between the probe and hybridizable sequence, the higher the relative temperature which can be used. As a result, it follows that higher relative temperatures would tend to make the reaction conditions more stringent, while lower temperatures less so. For additional details and explanation of stringency of hybridization reactions, see Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

20 "Stringent conditions" or "high stringency conditions", as defined herein, typically: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50° C.; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50 mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42° C.; or (3) employ 50% formamide, 5×SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5× Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 &ggr;g/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42° C., with washes at 42° C. in 0.2×SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55° C., followed by a high-stringency wash consisting of 0.1×SSC containing EDTA at 55° C.

25 "Moderately stringent conditions" may be identified as described by Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, and include the use of washing solution and hybridization conditions (e.g., temperature, ionic strength and % SDS) less stringent than those described above. An example of moderately stringent conditions is overnight incubation at 37° C. in a solution comprising: 20% formamide, 5×SSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5× Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 mg/ml denatured sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 1×SSC at about 37-50° C. The skilled artisan will recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc. as necessary to accommodate factors such as probe length and the like.

5 A "HER dimer" herein is a noncovalently associated dimer comprising at least two different HER receptors. Such complexes may form when a cell expressing two or more HER receptors is exposed to an HER ligand and can be isolated by immunoprecipitation and analyzed by SDS-PAGE as described in Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994), for example. Examples of such HER dimers include EGFR-HER2, HER2-HER3 and HER3-HER4 heterodimers. Moreover, the HER dimer may comprise two or more
10 HER2 receptors combined with a different HER receptor, such as HER3, HER4 or EGFR. Other proteins, such as a cytokine receptor subunit (*e.g.* gp130) may be associated with the dimer.

A "HER inhibitor" is an agent which interferes with HER activation or function. Examples of HER inhibitors include HER antibodies (*e.g.* EGFR, HER2, HER3, or HER4 antibodies); EGFR-targeted drugs; small molecule HER antagonists; HER tyrosine kinase inhibitors; antisense molecules (see, for example,
15 WO2004/87207); and/or agents that bind to, or interfere with function of, downstream signaling molecules, such as MAPK or Akt (see Fig. 5). Preferably, the HER inhibitor is an antibody or small molecule which binds to a HER receptor.

As used herein, the term "EGFR-targeted drug" refers to a therapeutic agent that binds to EGFR and, optionally, inhibits EGFR activation. Examples of such agents include antibodies and small molecules that bind
20 to EGFR. Examples of antibodies which bind to EGFR include MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (see, US Patent No. 4,943, 533, Mendelsohn *et al.*) and variants thereof, such as chimerized 225 (C225 or Cetuximab; ERBUTIX®) and reshaped human 225 (H225) (see, WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); antibodies that bind type II mutant EGFR (US Patent No. 5,212,290); humanized and chimeric antibodies that bind EGFR as described in US
25 Patent No. 5,891,996; and human antibodies that bind EGFR, such as ABX-EGF (see WO98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto *et al.*, *Eur. J. Cancer* 32A:636-640 (1996)); and mAb 806 or humanized mAb 806 (Johns *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)). The anti-EGFR antibody may be conjugated with a cytotoxic agent, thus generating an immunoconjugate (see, *e.g.*, EP659,439A2, Merck Patent GmbH). Examples of small molecules that bind to EGFR include ZD1839 or Gefitinib (IRESSA™; Astra Zeneca); CP-
30 358774 or Erlotinib HCL (TARCEVA™; Genentech/OSI); and AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen).

A "tyrosine kinase inhibitor" is a molecule which inhibits tyrosine kinase activity of a tyrosine kinase such as a HER receptor. Examples of such inhibitors include the EGFR-targeted drugs noted in the preceding paragraph; small molecule HER2 tyrosine kinase inhibitor such as TAK165 available from Takeda; dual-HER
35 inhibitors such as EKB-569 (available from Wyeth) which preferentially binds EGFR but inhibits both HER2 and EGFR-overexpressing cells; GW572016 (available from Glaxo) an oral HER2 and EGFR tyrosine kinase inhibitor; PKI-166 (available from Novartis); pan-HER inhibitors such as canertinib (CI-1033; Pharmacia); Raf-1 inhibitors such as antisense agent ISIS-5132 available from ISIS Pharmaceuticals which inhibits Raf-1 signaling; non-HER targeted TK inhibitors such as Imatinib mesylate (Gleevec™) available from Glaxo; MAPK extracellular regulated kinase I inhibitor CI-1040 (available from Pharmacia); quinazolines, such as PD
40 153035,4-(3-chloroanilino) quinazoline; pyridopyrimidines; pyrimidopyrimidines; pyrrolopyrimidines, such as

5 CGP 59326, CGP 60261 and CGP 62706; pyrazolopyrimidines, 4-(phenylamino)-7H-pyrrolo[2,3-d]
pyrimidines; curcumin (diferuloyl methane, 4,5-bis (4-fluoroanilino)phthalimide); tyrphostines containing
nitrothiophene moieties; PD-0183805 (Warner-Lambert); antisense molecules (e.g. those that bind to HER-
encoding nucleic acid); quinoxalines (US Patent No. 5,804,396); tryphostins (US Patent No. 5,804,396);
10 ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); pan-HER inhibitors such as CI-1033 (Pfizer);
Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); Imatinib mesylate (Gleevec; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo
SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787
(Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); or as described in any of the following patent publications: US
Patent No. 5,804,396; WO99/09016 (American Cyanamid); WO98/43960 (American Cyanamid); WO97/38983
(Warner Lambert); WO99/06378 (Warner Lambert); WO99/06396 (Warner Lambert); WO96/30347 (Pfizer,
15 Inc); WO96/33978 (Zeneca); WO96/3397 (Zeneca); and WO96/33980 (Zeneca).

A "HER dimerization inhibitor" is an agent which inhibits formation of a HER dimer. Preferably, the
HER dimerization inhibitor is an antibody, for example an antibody which binds to HER2 at the heterodimeric
binding site thereof. The most preferred dimerization inhibitor herein is pertuzumab or MAb 2C4. Binding of
2C4 to the heterodimeric binding site of HER2 is illustrated in Fig. 4. Other examples of HER dimerization
20 inhibitors include antibodies which bind to EGFR and inhibit dimerization thereof with one or more other HER
receptors (for example EGFR monoclonal antibody 806, MAb 806, which binds to activated or "untethered"
EGFR; see Johns *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)); antibodies which bind to HER3 and
inhibit dimerization thereof with one or more other HER receptors; antibodies which bind to HER4 and inhibit
dimerization thereof with one or more other HER receptors; peptide dimerization inhibitors (US Patent No.
25 6,417,168); antisense dimerization inhibitors; etc.

A "heterodimeric binding site" on HER2, refers to a region in the extracellular domain of HER2 that
contacts, or interfaces with, a region in the extracellular domain of EGFR, HER3 or HER4 upon formation of a
dimer therewith. The region is found in Domain II of HER2. Franklin *et al.* *Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

"HER activation" refers to activation, or phosphorylation, of any one or more HER receptors.
30 Generally, HER activation results in signal transduction (e.g. that caused by an intracellular kinase domain of a
HER receptor phosphorylating tyrosine residues in the HER receptor or a substrate polypeptide). HER
activation may be mediated by HER ligand binding to a HER dimer comprising the HER receptor of interest.
HER ligand binding to a HER dimer may activate a kinase domain of one or more of the HER receptors in the
dimer and thereby results in phosphorylation of tyrosine residues in one or more of the HER receptors and/or
35 phosphorylation of tyrosine residues in additional substrate polypeptides(s), such as Akt or MAPK intracellular
kinases. See, Fig. 5, for example.

"Phosphorylation" refers to the addition of one or more phosphate group(s) to a protein, such as a HER
receptor, or substrate thereof.

A "native sequence" polypeptide is one which has the same amino acid sequence as a polypeptide (e.g.,

HER receptor or HER ligand) derived from nature. Such native sequence polypeptides can be isolated from nature or can be produced by recombinant or synthetic means. Thus, a native sequence polypeptide can have the amino acid sequence of naturally occurring human polypeptide, murine polypeptide, or polypeptide from any other mammalian species.

The term "antibody" herein is used in the broadest sense and specifically covers intact monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, multispecific antibodies (*e.g.* bispecific antibodies) formed from at least two intact antibodies, and antibody fragments, so long as they exhibit the desired biological activity.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical and/or bind the same epitope, except for possible variants that may arise during production of the monoclonal antibody, such variants generally being present in minor amounts. In contrast to polyclonal antibody preparations that typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they are uncontaminated by other immunoglobulins. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), for example.

The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Patent No. 4,816,567; and Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Chimeric antibodies of interest herein include "primatized" antibodies comprising variable domain antigen-binding sequences derived from a non-human primate (*e.g.* Old World Monkey, Ape etc) and human constant region sequences.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably comprising the antigen binding region thereof. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragment(s).

An "intact antibody" herein is one which comprises two antigen binding regions, and an Fc region.

5 Preferably, the intact antibody has one or more effector functions.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, intact antibodies can be assigned to different "classes". There are five major classes of intact antibodies: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into "subclasses" (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, and IgA2. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of antibodies are called α , δ , ϵ , γ , and μ , respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

Antibody "effector functions" refer to those biological activities attributable to an Fc region (a native sequence Fc region or amino acid sequence variant Fc region) of an antibody. Examples of antibody effector functions include C1q binding; complement dependent cytotoxicity; Fc receptor binding; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC); phagocytosis; down regulation of cell surface receptors (e.g. B cell receptor; BCR), etc.

"Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity" and "ADCC" refer to a cell-mediated reaction in which nonspecific cytotoxic cells that express Fc receptors (FcRs) (e.g. Natural Killer (NK) cells, neutrophils, and macrophages) recognize bound antibody on a target cell and subsequently cause lysis of the target cell. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express Fc γ RIII only, whereas monocytes express Fc γ RI, Fc γ RII and Fc γ RIII. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). To assess ADCC activity of a molecule of interest, an *in vitro* ADCC assay, such as that described in US Patent No. 5,500,362 or 5,821,337 may be performed. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, e.g., in a animal model such as that disclosed in Clynes *et al. PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Human effector cells" are leukocytes which express one or more FcRs and perform effector functions. Preferably, the cells express at least Fc γ RIII and perform ADCC effector function. Examples of human leukocytes which mediate ADCC include peripheral blood mononuclear cells (PBMC), natural killer (NK) cells, monocytes, cytotoxic T cells and neutrophils; with PBMCs and NK cells being preferred. The effector cells may be isolated from a native source thereof, e.g. from blood or PBMCs as described herein.

The terms "Fc receptor" or "FcR" are used to describe a receptor that binds to the Fc region of an antibody. The preferred FcR is a native sequence human FcR. Moreover, a preferred FcR is one which binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the Fc γ RI, Fc γ RII, and Fc γ RIII subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. Fc γ RII receptors include Fc γ RIIA (an "activating receptor") and Fc γ RIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. Activating receptor Fc γ RIIA contains an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in its cytoplasmic domain. Inhibiting receptor Fc γ RIIB contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its cytoplasmic domain. (see

review M. in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); and de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Other FcRs, including those to be identified in the future, are encompassed by the term "FcR" herein. The term also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

"Complement dependent cytotoxicity" or "CDC" refers to the ability of a molecule to lyse a target in the presence of complement. The complement activation pathway is initiated by the binding of the first component of the complement system (C1q) to a molecule (e.g. an antibody) complexed with a cognate antigen. To assess complement activation, a CDC assay, e.g. as described in Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), may be performed.

"Native antibodies" are usually heterotetrameric glycoproteins of about 150,000 daltons, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages varies among the heavy chains of different immunoglobulin isotypes. Each heavy and light chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain (V_H) followed by a number of constant domains. Each light chain has a variable domain at one end (V_L) and a constant domain at its other end. The constant domain of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light-chain variable domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light chain and heavy chain variable domains.

The term "variable" refers to the fact that certain portions of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies and are used in the binding and specificity of each particular antibody for its particular antigen. However, the variability is not evenly distributed throughout the variable domains of antibodies. It is concentrated in three segments called hypervariable regions both in the light chain and the heavy chain variable domains. The more highly conserved portions of variable domains are called the framework regions (FRs). The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FRs, largely adopting a β -sheet configuration, connected by three hypervariable regions, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β -sheet structure. The hypervariable regions in each chain are held together in close proximity by the FRs and, with the hypervariable regions from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies (see Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

The term "hypervariable region" when used herein refers to the amino acid residues of an antibody which are responsible for antigen-binding. The hypervariable region generally comprises amino acid residues from a "complementarity determining region" or "CDR" (e.g. residues 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3) in

the light chain variable domain and 31-35 (H1), 50-65 (H2) and 95-102 (H3) in the heavy chain variable domain; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) and/or those residues from a "hypervariable loop" (e.g. residues 26-32 (L1), 50-52 (L2) and 91-96 (L3) in the light chain variable domain and 26-32 (H1), 53-55 (H2) and 96-101 (H3) in the heavy chain variable domain; Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). "Framework Region" or "FR" residues are those variable domain residues other than the hypervariable region residues as herein defined.

Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, whose name reflects its ability to crystallize readily. Pepsin treatment yields an $F(ab')_2$ fragment that has two antigen-binding sites and is still capable of cross-linking antigen.

"Fv" is the minimum antibody fragment which contains a complete antigen-recognition and antigen-binding site. This region consists of a dimer of one heavy chain and one light chain variable domain in tight, non-covalent association. It is in this configuration that the three hypervariable regions of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the V_H - V_L dimer. Collectively, the six hypervariable regions confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three hypervariable regions specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH1) of the heavy chain. Fab' fragments differ from Fab fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear at least one free thiol group. $F(ab')_2$ antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

The "light chains" of antibodies from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa (κ) and lambda (λ), based on the amino acid sequences of their constant domains.

"Single-chain Fv" or "scFv" antibody fragments comprise the V_H and V_L domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Preferably, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V_H and V_L domains which enables the scFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of scFv see Plückthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). HER2 antibody scFv fragments are described in WO93/16185; U.S. Patent No. 5,571,894; and U.S. Patent No. 5,587,458.

The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a variable heavy domain (V_H) connected to a variable light domain (V_L) in the same

5 polypeptide chain ($V_H - V_L$). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; and Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

10 "Humanized" forms of non-human (*e.g.*, rodent) antibodies are chimeric antibodies that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or nonhuman primate having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues.

15 Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FRs are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally

20 also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (F_c), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Humanized HER2 antibodies include huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 and huMAb4D5-8 or trastuzumab (HERCEPTIN®) as described in

25 Table 3 of U.S. Patent 5,821,337 expressly incorporated herein by reference; humanized 520C9 (WO93/21319); and humanized 2C4 antibodies as described herein.

For the purposes herein, "trastuzumab," "HERCEPTIN®," and "huMAb4D5-8" refer to an antibody comprising the light and heavy chain amino acid sequences in SEQ ID NOS. 15 and 16, respectively.

Herein, "pertuzumab" and "OMNITARG™" refer to an antibody comprising the light and heavy chain amino acid sequences in SEQ ID NOS. 13 and 14, respectively.

30

Differences between trastuzumab and pertuzumab functions are illustrated in Fig. 6.

A "naked antibody" is an antibody that is not conjugated to a heterologous molecule, such as a cytotoxic moiety or radiolabel.

35 An "isolated" antibody is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid

sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody *in situ* within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

An "affinity matured" antibody is one with one or more alterations in one or more hypervariable regions thereof which result an improvement in the affinity of the antibody for antigen, compared to a parent antibody which does not possess those alteration(s). Preferred affinity matured antibodies will have nanomolar or even picomolar affinities for the target antigen. Affinity matured antibodies are produced by procedures known in the art. Marks *et al. Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describes affinity maturation by VH and VL domain shuffling. Random mutagenesis of CDR and/or framework residues is described by: Barbas *et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al. Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al. J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al., J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins *et al, J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

A HER2 antibody which "inhibits HER dimerization more effectively than trastuzumab" is one which reduces or eliminates HER dimers more effectively (for example at least about 2-fold more effectively) than trastuzumab. Preferably, such an antibody inhibits HER2 dimerization at least about as effectively as an antibody selected from the group consisting of murine monoclonal antibody 2C4, a Fab fragment of murine monoclonal antibody 2C4, pertuzumab, and a Fab fragment of pertuzumab. One can evaluate HER dimerization inhibition by studying HER dimers directly, or by evaluating HER activation, or downstream signaling, which results from HER dimerization, and/or by evaluating the antibody-HER2 binding site, etc. Assays for screening for antibodies with the ability to inhibit HER dimerization more effectively than trastuzumab are described in Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002) and WO01/00245 (Adams *et al.*). By way of example only, one may assay for inhibition of HER dimerization by assessing, for example, inhibition of HER dimer formation (see, *e.g.*, Fig. 1A-B of Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002); and WO01/00245); reduction in HER ligand activation of cells which express HER dimers (WO01/00245 and Fig. 2A-B of Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), for example); blocking of HER ligand binding to cells which express HER dimers (WO01/00245, and Fig. 2E of Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), for example); cell growth inhibition of cancer cells (*e.g.* MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D cells) which express HER dimers in the presence (or absence) of HER ligand (WO01/00245 and Figs. 3A-D of Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), for instance); inhibition of downstream signaling (for instance, inhibition of HRG-dependent AKT phosphorylation or inhibition of HRG- or TGF α - dependent MAPK phosphorylation) (see, WO01/00245, and Fig. 2C-D of Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), for example). One may also assess whether the antibody inhibits HER dimerization by studying the antibody-HER2 binding site, for instance, by evaluating a structure or model, such as a crystal structure, of the antibody bound to HER2 (See, for example, Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004)).

The HER2 antibody may "inhibit HRG-dependent AKT phosphorylation" and/or inhibit "HRG- or

5 TGF α -dependent MAPK phosphorylation" more effectively (for instance at least 2-fold more effectively) than trastuzumab (see Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002) and WO01/00245, by way of example).

The HER2 antibody may be one which does "not inhibit HER2 ectodomain cleavage" (Molina *et al. Cancer Res.* 61:4744-4749(2001)).

10 A HER2 antibody that "binds to a heterodimeric binding site" of HER2, binds to residues in domain II (and optionally also binds to residues in other of the domains of the HER2 extracellular domain, such as domains I and III), and can sterically hinder, at least to some extent, formation of a HER2-EGFR, HER2-HER3, or HER2-HER4 heterodimer. Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004) characterize the HER2-pertuzumab crystal structure, deposited with the RCSB Protein Data Bank (ID Code 1S78), illustrating an exemplary antibody that binds to the heterodimeric binding site of HER2.

15 An antibody that "binds to domain II" of HER2 binds to residues in domain II and optionally residues in other domain(s) of HER2, such as domains I and III. Preferably the antibody that binds to domain II binds to the junction between domains I, II and III of HER2.

20 The term "main species antibody" herein refers to the antibody structure in a composition which is the quantitatively predominant antibody molecule in the composition. In one embodiment, the main species antibody is a HER2 antibody, such as an antibody that binds to Domain II of HER2, antibody that inhibits HER dimerization more effectively than trastuzumab, and/or an antibody which binds to a heterodimeric binding site of HER2. The preferred embodiment herein of the main species antibody is one comprising the variable light and variable heavy amino acid sequences in SEQ ID Nos. 3 and 4, and most preferably comprising the light chain and heavy chain amino acid sequences in SEQ ID Nos. 13 and 14 (pertuzumab).

25 An "amino acid sequence variant" antibody herein is an antibody with an amino acid sequence which differs from a main species antibody. Ordinarily, amino acid sequence variants will possess at least about 70% homology with the main species antibody, and preferably, they will be at least about 80%, more preferably at least about 90% homologous with the main species antibody. The amino acid sequence variants possess substitutions, deletions, and/or additions at certain positions within or adjacent to the amino acid sequence of the main species antibody. Examples of amino acid sequence variants herein include acidic variant (*e.g.* deamidated antibody variant), basic variant, the antibody with an amino-terminal leader extension (*e.g.* VHS-) on one or two light chains thereof, antibody with a C-terminal lysine residue on one or two heavy chains thereof, etc, and includes combinations of variations to the amino acid sequences of heavy and/or light chains. The antibody variant of particular interest herein is the antibody comprising an amino-terminal leader extension on one or two light chains thereof, optionally further comprising other amino acid sequence and/or glycosylation differences relative to the main species antibody.

30 A "glycosylation variant" antibody herein is an antibody with one or more carbohydrate moieties attached thereto which differ from one or more carbohydrate moieties attached to a main species antibody. Examples of glycosylation variants herein include antibody with a G1 or G2 oligosaccharide structure, instead a

25

5 G0 oligosaccharide structure, attached to an Fc region thereof, antibody with one or two carbohydrate moieties attached to one or two light chains thereof, antibody with no carbohydrate attached to one or two heavy chains of the antibody, etc, and combinations of glycosylation alterations.

Where the antibody has an Fc region, an oligosaccharide structure such as that shown in Fig. 9 herein may be attached to one or two heavy chains of the antibody, e.g. at residue 299 (298, Eu numbering of residues).

10 For pertuzumab, G0 was the predominant oligosaccharide structure, with other oligosaccharide structures such as G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) and G2 being found in lesser amounts in the pertuzumab composition.

Unless indicated otherwise, a "G1 oligosaccharide structure" herein includes G-1, G1-1, G1(1-6) and G1(1-3) structures.

15 An "amino-terminal leader extension" herein refers to one or more amino acid residues of the amino-terminal leader sequence that are present at the amino-terminus of any one or more heavy or light chains of an antibody. An exemplary amino-terminal leader extension comprises or consists of three amino acid residues, VHS, present on one or both light chains of an antibody variant.

20 A "deamidated" antibody is one in which one or more asparagine residues thereof has been derivitized, e.g. to an aspartic acid, a succinimide, or an iso-aspartic acid.

"Homology" is defined as the percentage of residues in the amino acid sequence variant that are identical after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent homology. Methods and computer programs for the alignment are well known in the art. One such computer program is "Align 2", authored by Genentech, Inc., which was filed with user documentation in the United States Copyright Office, Washington, DC 20559, on December 10, 1991.

25 For the purposes herein, "cation exchange analysis" refers to any method by which a composition comprising two or more compounds is separated based on charge differences using a cation exchanger. A cation exchanger generally comprises covalently bound, negatively charged groups. Preferably, the cation exchanger herein is a weak cation-exchanger and/or comprises a carboxylate functional group, such as the PROPAC WCX-10™ cation exchange column sold by Dionex.

30 An "ovary" is one of the two small, almond-shaped organs located on either side of the uterus in a female.

A "fallopian tube" or "oviduct" is one of the two fine tubes leading from the ovaries of female mammals into the uterus.

35 The "peritoneum" is the epithelial lining of a body cavity such as the abdomen.

The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include, but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma (including medulloblastoma and retinoblastoma), sarcoma (including

5 liposarcoma and synovial cell sarcoma), neuroendocrine tumors (including carcinoid tumors, gastrinoma, and
islet cell cancer), mesothelioma, schwannoma (including acoustic neuroma), meningioma, adenocarcinoma,
melanoma, and leukemia or lymphoid malignancies. More particular examples of such cancers include
10 squamous cell cancer (e.g. epithelial squamous cell cancer), lung cancer including small-cell lung cancer
(SCLC), non-small cell lung cancer (NSCLC), adenocarcinoma of the lung and squamous carcinoma of the lung,
cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer including gastrointestinal cancer,
pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast
cancer (including metastatic breast cancer), colon cancer, rectal cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine
carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer,
15 hepatic carcinoma, anal carcinoma, penile carcinoma, testicular cancer, esophageal cancer, tumors of the biliary
tract, as well as head and neck cancer.

"Ovarian cancer" is a potentially life-threatening malignancy, that develops in one or both ovaries. By
the time symptoms of ovarian cancer appear, the ovarian tumor may have grown large enough to shed cancer
cells throughout the abdomen. Ovarian cancer cells that have spread outside the ovaries are referred to as
metastatic ovarian cancers. Ovarian tumors tend to spread to the diaphragm, intestine and/or omentum (a fatty
20 layer that covers and pads organs in the abdomen). Cancer cells can also spread to other organs through lymph
channels and the bloodstream. Ovarian cancer to be treated herein includes the three primary classes of
malignant ovarian tumors, namely, epithelial tumor, germ cell tumor, and stromal tumor.

"Primary peritoneal carcinoma" refers to a cancer that arises in the peritoneum. Primary peritoneal
carcinoma may be very similar to epithelial ovarian cancer in terms of microscopic appearance, symptoms,
25 pattern of spread, and prognosis. A woman who has had her ovaries removed can still get primary peritoneal
carcinoma.

"Fallopian tube carcinoma" refers to cancer of the fallopian tube and/or broad ligament.

An "epithelial tumor" develops in a layer of cube-shaped cells known as the germinal epithelium, which
surrounds the outside of the ovaries. Epithelial tumors account for up to 90% of all ovarian cancers.

30 A "germ cell tumor" is found in egg-maturation cell(s) of the ovary. Germ cell tumors, which account
for
about 3% of all ovarian cancers, occur most often in teenagers and young women.

A "stromal tumor" develops from connective tissue cells that hold the ovary together and that produce
the female hormones, estrogen and progesterone. Stromal tumors account for 6% of all ovarian cancers.

35 Herein, a "patient" is a human patient. The patient may be a "cancer patient," i.e. one who is suffering
or at risk for suffering from one or more symptoms of cancer, or other patient who could benefit from therapy
with a HER dimerization inhibitor.

A "biological sample" refers to a sample, generally cells or tissue derived from a biological source.

5 A "patient sample" refers to a sample obtained from a patient, such as a cancer patient.

A "tumor sample" herein is a sample derived from, or comprising tumor cells from, a patient's tumor. Examples of tumor samples herein include, but are not limited to, tumor biopsies, circulating tumor cells, circulating plasma proteins, ascitic fluid, primary cell cultures or cell lines derived from tumors or exhibiting tumor-like properties, as well as preserved tumor samples, such as formalin-fixed, paraffin-embedded tumor
10 samples or frozen tumor samples.

A "fixed" tumor sample is one which has been histologically preserved using a fixative.

A "formalin-fixed" tumor sample is one which has been preserved using formaldehyde as the fixative.

An "embedded" tumor sample is one surrounded by a firm and generally hard medium such as paraffin, wax, celloidin, or a resin. Embedding makes possible the cutting of thin sections for microscopic examination or
15 for generation of tissue microarrays (TMAs).

A "paraffin-embedded" tumor sample is one surrounded by a purified mixture of solid hydrocarbons derived from petroleum.

Herein, a "frozen" tumor sample refers to a tumor sample which is, or has been, frozen.

A "growth inhibitory agent" when used herein refers to a compound or composition which inhibits
20 growth of a cell, especially a HER expressing cancer cell either *in vitro* or *in vivo*. Thus, the growth inhibitory agent may be one which significantly reduces the percentage of HER expressing cells in S phase. Examples of growth inhibitory agents include agents that block cell cycle progression (at a place other than S phase), such as agents that induce G1 arrest and M-phase arrest. Classical M-phase blockers include the vincas (vincristine and vinblastine), taxanes, and topo II inhibitors such as doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposide, and
25 bleomycin. Those agents that arrest G1 also spill over into S-phase arrest, for example, DNA alkylating agents such as tamoxifen, prednisone, dacarbazine, mechlorethamine, cisplatin, methotrexate, 5-fluorouracil, and ara-C. Further information can be found in *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13.

30 Examples of "growth inhibitory" antibodies are those which bind to HER2 and inhibit the growth of cancer cells overexpressing HER2. Preferred growth inhibitory HER2 antibodies inhibit growth of SK-BR-3 breast tumor cells in cell culture by greater than 20%, and preferably greater than 50% (*e.g.* from about 50% to about 100%) at an antibody concentration of about 0.5 to 30 μ g/ml, where the growth inhibition is determined
35 six days after exposure of the SK-BR-3 cells to the antibody (see U.S. Patent No. 5,677,171 issued October 14, 1997). The SK-BR-3 cell growth inhibition assay is described in more detail in that patent and hereinbelow. The preferred growth inhibitory antibody is a humanized variant of murine monoclonal antibody 4D5, *e.g.*, trastuzumab.

An antibody which "induces apoptosis" is one which induces programmed cell death as determined by

5 binding of annexin V, fragmentation of DNA, cell shrinkage, dilation of endoplasmic reticulum, cell
fragmentation, and/or formation of membrane vesicles (called apoptotic bodies). The cell is usually one which
overexpresses the HER2 receptor. Preferably the cell is a tumor cell, *e.g.* a breast, ovarian, stomach,
endometrial, salivary gland, lung, kidney, colon, thyroid, pancreatic or bladder cell. *In vitro*, the cell may be a
10 SK-BR-3, BT474, Calu 3 cell, MDA-MB-453, MDA-MB-361 or SKOV3 cell. Various methods are available
for evaluating the cellular events associated with apoptosis. For example, phosphatidyl serine (PS) translocation
can be measured by annexin binding; DNA fragmentation can be evaluated through DNA laddering; and
nuclear/chromatin condensation along with DNA fragmentation can be evaluated by any increase in hypodiploid
cells. Preferably, the antibody which induces apoptosis is one which results in about 2 to 50 fold, preferably
about 5 to 50 fold, and most preferably about 10 to 50 fold, induction of annexin binding relative to untreated
15 cell in an annexin binding assay using BT474 cells (see below). Examples of HER2 antibodies that induce
apoptosis are 7C2 and 7F3.

The "epitope 2C4" is the region in the extracellular domain of HER2 to which the antibody 2C4 binds.
In order to screen for antibodies which bind to the 2C4 epitope, a routine cross-blocking assay such as that
described in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane
20 (1988), can be performed. Preferably the antibody blocks 2C4's binding to HER2 by about 50% or more.
Alternatively, epitope mapping can be performed to assess whether the antibody binds to the 2C4 epitope of
HER2. Epitope 2C4 comprises residues from Domain II in the extracellular domain of HER2. 2C4 and
pertuzumab binds to the extracellular domain of HER2 at the junction of domains I, II and III. Franklin *et al.*
Cancer Cell 5:317-328 (2004).

25 The "epitope 4D5" is the region in the extracellular domain of HER2 to which the antibody 4D5
(ATCC CRL 10463) and trastuzumab bind. This epitope is close to the transmembrane domain of HER2, and
within Domain IV of HER2. To screen for antibodies which bind to the 4D5 epitope, a routine cross-blocking
assay such as that described in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow
and David Lane (1988), can be performed. Alternatively, epitope mapping can be performed to assess whether
30 the antibody binds to the 4D5 epitope of HER2 (*e.g.* any one or more residues in the region from about residue
529 to about residue 625, inclusive of the HER2 ECD, residue numbering including signal peptide).

The "epitope 7C2/7F3" is the region at the N terminus, within Domain I, of the extracellular domain of
HER2 to which the 7C2 and/or 7F3 antibodies (each deposited with the ATCC, see below) bind. To screen for
antibodies which bind to the 7C2/7F3 epitope, a routine cross-blocking assay such as that described in
35 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), can be
performed. Alternatively, epitope mapping can be performed to establish whether the antibody binds to the
7C2/7F3 epitope on HER2 (*e.g.* any one or more of residues in the region from about residue 22 to about residue
53 of the HER2 ECD, residue numbering including signal peptide).

"Treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. Those in
40 need of treatment include those already with the disease as well as those in which the disease is to be prevented.

29

Hence, the patient to be treated herein may have been diagnosed as having the disease or may be predisposed or susceptible to the disease.

The term "effective amount" refers to an amount of a drug effective to treat cancer in the patient. The effective amount of the drug may reduce the number of cancer cells; reduce the tumor size; inhibit (*i.e.*, slow to some extent and preferably stop) cancer cell infiltration into peripheral organs; inhibit (*i.e.*, slow to some extent and preferably stop) tumor metastasis; inhibit, to some extent, tumor growth; and/or relieve to some extent one or more of the symptoms associated with the cancer. To the extent the drug may prevent growth and/or kill existing cancer cells, it may be cytostatic and/or cytotoxic. The effective amount may extend progression free survival (*e.g.* as measured by Response Evaluation Criteria for Solid Tumors, RECIST, or CA-125 changes), result in an objective response (including a partial response, PR, or complete response, CR), increase overall survival time, and/or improve one or more symptoms of cancer (*e.g.* as assessed by FOSI).

"Overall survival" refers to the patient remaining alive for a defined period of time, such as 1 year, 5 years, etc, *e.g.*, from the time of diagnosis or treatment.

"Progression free survival" refers to the patient remaining alive, without the cancer getting worse.

An "objective response" refers to a measurable response, including complete response (CR) or partial response (PR).

By "complete response" or "complete remission" is intended the disappearance of all signs of cancer in response to treatment. This does not always mean the cancer has been cured.

"Partial response" refers to a decrease in the size of one or more tumors or lesions, or in the extent of cancer in the body, in response to treatment.

A cancer with "HER receptor overexpression or amplification" is one which has significantly higher levels of a HER receptor protein or gene compared to a noncancerous cell of the same tissue type. Such overexpression may be caused by gene amplification or by increased transcription or translation. HER receptor overexpression or amplification may be determined in a diagnostic or prognostic assay by evaluating increased levels of the HER protein present on the surface of a cell (*e.g.* via an immunohistochemistry assay; IHC). Alternatively, or additionally, one may measure levels of HER-encoding nucleic acid in the cell, *e.g.* via fluorescent *in situ* hybridization (FISH; see WO98/45479 published October, 1998), southern blotting, or polymerase chain reaction (PCR) techniques, such as quantitative real time PCR (qRT-PCR). One may also study HER receptor overexpression or amplification by measuring shed antigen (*e.g.*, HER extracellular domain) in a biological fluid such as serum (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,933,294 issued June 12, 1990; WO91/05264 published April 18, 1991; U.S. Patent 5,401,638 issued March 28, 1995; and Sias *et al. J. Immunol. Methods* 132: 73-80 (1990)). Aside from the above assays, various *in vivo* assays are available to the skilled practitioner. For example, one may expose cells within the body of the patient to an antibody which is optionally labeled with a detectable label, *e.g.* a radioactive isotope, and binding of the antibody to cells in the patient can be evaluated, *e.g.* by external scanning for radioactivity or by analyzing a biopsy taken from a patient previously exposed to

5 the antibody.

Conversely, a cancer which "does not overexpress or amplify HER2 receptor" is one which does not have higher than normal levels of HER2 receptor protein or gene compared to a noncancerous cell of the same tissue type.

10 The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes (e.g. At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² and radioactive isotopes of Lu), chemotherapeutic agents, and toxins such as small molecule toxins or enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin, including fragments and/or variants thereof.

15 A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer. Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and CYTOXAN® cyclophosphamide; alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, triethylenephosphoramide, triethylenethiophosphoramide and trimethylolomelamine; TLK 286 (TELCYTA™); acetogenins (especially bullatacin and bullatacinone); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®);
 20 beta-lapachone; lapachol; colchicines; betulinic acid; a camptothecin (including the synthetic analogue topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetylcamptothecin, scoplectin, and 9-aminocamptothecin); bryostatin; calystatin; CC-1065 (including its adozelesin, carzelesin and bizelesin synthetic analogues); podophyllotoxin; podophyllinic acid; teniposide; cryptophycins (particularly cryptophycin 1 and cryptophycin 8); dolastatin; duocarmycin (including the synthetic analogues, KW-2189 and CB1-TM1);
 25 eleutherobin; pancratistatin; a sarcodictyin; spongistatin; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, and ranimustine; bisphosphonates, such as clodronate; antibiotics such as the enediyne antibiotics (e. g., calicheamicin, especially calicheamicin
 30 gammaII and calicheamicin omegaII (see, e.g., Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)) and anthracyclines such as annamycin, AD 32, alcarubicin, daunorubicin, dexrazoxane, DX-52-1, epirubicin, GPX-100, idarubicin, KRN5500, menogaril, dynemicin, including dynemicin A, an esperamicin, neocarzinostatin chromophore and related chromoprotein enediyne antiobiotic chromophores, aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, carabacin, carminomycin, carzinophilin, chromomycinis, dactinomycin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, ADRIAMYCIN® doxorubicin (including morpholino-doxorubicin, cyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrrolino-doxorubicin, liposomal doxorubicin, and
 35 deoxydoxorubicin), esorubicin, marcellomycin, mitomycins such as mitomycin C, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, and zorubicin; folic acid analogues such as denopterin, pteropterin, and trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, and
 40

5 thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine,
 dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, and floxuridine; androgens such as calusterone, dromostanolone
 propionate, epitio stanol, mepitio stan, and testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, and
 trilostane; folic acid replenisher such as folinic acid (leucovorin); aceglatone; anti-folate anti-neoplastic agents
 10 such as ALIMTA®, LY231514 pemetrexed, dihydrofolate reductase inhibitors such as methotrexate, anti-
 metabolites such as 5-fluorouracil (5-FU) and its prodrugs such as UFT, S-1 and capecitabine, and thymidylate
 synthase inhibitors and glycinamide ribonucleotide formyltransferase inhibitors such as raltitrexed
 (TOMUDEX™, TDX); inhibitors of dihydropyrimidine dehydrogenase such as eniluracil; aldophosphamide
 glycoside; aminolevulinic acid; amsacrine; bestabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine;
 15 diazi quone; elformithine; elliptinium acetate; an epothilone; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan;
 lonidainine; maytansinoids such as maytansine and ansamitocins; mitoguazone; mitoxantrone; mopidanmol;
 nitraerine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; losoxantrone; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK®
 polysaccharide complex (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxane; rhizoxin; sizofiran; spirogermanium;
 tenuazonic acid; tria zi quone; 2,2',2"-trichlorotriethylamine; trichothecenes (especially T-2 toxin, verracurin A,
 roridin A and anguidine); urethan; vindesine (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazine; mannomustine;
 20 mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); cyclophosphamide; thiotepa; taxoids
 and taxanes, e.g., TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™
 Cremophor-free, albumin-engineered nanoparticle formulation of paclitaxel (American Pharmaceutical
 Partners, Schaumburg, Illinois), and TAXOTERE® docetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France);
 chloranbucil; gemcitabine (GEMZAR®); 6-thioguanine; mercaptopurine; platinum; platinum analogs or
 25 platinum-based analogs such as cisplatin, oxaliplatin and carboplatin; vinblastine (VELBAN®); etoposide (VP-
 16); ifosfamide; mitoxantrone; vincristine (ONCOVIN®); vinca alkaloid; vinorelbine (NAVELBINE®);
 novantrone; edatrexate; daunomycin; aminopterin; xeloda; itandronate; topoisomerase inhibitor RFS 2000;
 difluoromethylornithine (DMFO); retinoids such as retinoic acid; pharmaceutically acceptable salts, acids or
 30 derivatives of any of the above; as well as combinations of two or more of the above such as CHOP, an
 abbreviation for a combined therapy of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone, and
 FOLFOX, an abbreviation for a treatment regimen with oxaliplatin (ELOXATIN™) combined with 5-FU and
 leucovorin.

Also included in this definition are anti-hormonal agents that act to regulate or inhibit hormone action
 on tumors such as anti-estrogens and selective estrogen receptor modulators (SERMs), including, for example,
 35 tamoxifen (including NOLVADEX® tamoxifen), raloxifene, droloxifene, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene,
 keoxifene, LY117018, onapristone, and FARESTON® toremifene; aromatase inhibitors that inhibit the enzyme
 aromatase, which regulates estrogen production in the adrenal glands, such as, for example, 4(5)-imidazoles,
 aminoglutethimide, MEGASE® megestrol acetate, AROMASIN® exemestane, formestane, fadrozole,
 RIVISOR® vorozole, FEMARA® letrozole, and ARIMIDEX® anastrozole; and anti-androgens such as
 40 flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide, and goserelin; as well as troxacitabine (a 1,3-dioxolane

5 nucleoside cytosine analog); antisense oligonucleotides, particularly those that inhibit expression of genes in signaling pathways implicated in aberrant cell proliferation, such as, for example, PKC-alpha, Raf, H-Ras, and epidermal growth factor receptor (EGF-R); vaccines such as gene therapy vaccines, for example, ALLOVECTIN® vaccine, LEUVECTIN® vaccine, and VAXID® vaccine; PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN® topoisomerase 1 inhibitor; ABARELIX® rmrH; and pharmaceutically acceptable salts, acids
10 or derivatives of any of the above.

A "antimetabolite chemotherapeutic agent" is an agent which is structurally similar to a metabolite, but can not be used by the body in a productive manner. Many antimetabolite chemotherapeutic agents interfere with the production of the nucleic acids, RNA and DNA. Examples of antimetabolite chemotherapeutic agents include gemcitabine (GEMZAR®), 5-fluorouracil (5-FU), capecitabine (XELODA™), 6-mercaptopurine, methotrexate, 6-thioguanine, pemetrexed, raltitrexed, arabinosylcytosine ARA-C cytarabine (CYTOSAR-U®), dacarbazine (DTIC-DOME®), azocytosine, deoxycytosine, pyrimidine, fludarabine (FLUDARA®), cladribine, 2-deoxy-D-glucose etc. The preferred antimetabolite chemotherapeutic agent is gemcitabine.
15

"Gemcitabine" or "2'-deoxy-2', 2'-difluorocytidine monohydrochloride (b-isomer)" is a nucleoside analogue that exhibits antitumor activity. The empirical formula for gemcitabine HCl is C₉H₁₁F₂N₃O₄ · HCl. Gemcitabine HCl is sold by Eli Lilly under the trademark GEMZAR®.
20

A "platinum-based chemotherapeutic agent" comprises an organic compound which contains platinum as an integral part of the molecule. Examples of platinum-based chemotherapeutic agents include carboplatin, cisplatin, and oxaliplatin.

By "platinum-based chemotherapy" is intended therapy with one or more platinum-based chemotherapeutic agents, optionally in combination with one or more other chemotherapeutic agents.
25

By "platinum resistant" cancer is meant that the cancer patient has progressed while receiving platinum-based chemotherapy (i.e. the patient is "platinum refractory"), or the patient has progressed within 12 months (for instance, within 6 months) after completing a platinum-based chemotherapy regimen.

An "anti-angiogenic agent" refers to a compound which blocks, or interferes with to some degree, the development of blood vessels. The anti-angiogenic factor may, for instance, be a small molecule or antibody that binds to a growth factor or growth factor receptor involved in promoting angiogenesis. The preferred anti-angiogenic factor herein is an antibody that binds to vascular endothelial growth factor (VEGF), such as Bevacizumab (AVASTIN®).
30

The term "cytokine" is a generic term for proteins released by one cell population which act on another cell as intercellular mediators. Examples of such cytokines are lymphokines, monokines, and traditional polypeptide hormones. Included among the cytokines are growth hormone such as human growth hormone, N-methionyl human growth hormone, and bovine growth hormone; parathyroid hormone; thyroxine; insulin; proinsulin; relaxin; prolaxin; glycoprotein hormones such as follicle stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH), and luteinizing hormone (LH); hepatic growth factor; fibroblast growth factor;
35

5 prolactin; placental lactogen; tumor necrosis factor- α and - β ; mullerian-inhibiting substance; mouse
gonadotropin-associated peptide; inhibin; activin; vascular endothelial growth factor; integrin; thrombopoietin
(TPO); nerve growth factors such as NGF- β ; platelet-growth factor; transforming growth factors (TGFs) such as
TGF- α and TGF- β ; insulin-like growth factor-I and -II; erythropoietin (EPO); osteoinductive factors; interferons
such as interferon- α , - β , and - γ ; colony stimulating factors (CSFs) such as macrophage-CSF (M-CSF);
10 granulocyte-macrophage-CSF (GM-CSF); and granulocyte-CSF (G-CSF); interleukins (ILs) such as IL-1, IL-1 α ,
IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; a tumor necrosis factor such as TNF- α or
TNF- β ; and other polypeptide factors including LIF and kit ligand (KL). As used herein, the term cytokine
includes proteins from natural sources or from recombinant cell culture and biologically active equivalents of the
native sequence cytokines.

15 An "autoimmune disease" herein is a disease or disorder arising from and directed against an
individual's own tissues or a co-segregate or manifestation thereof or resulting condition therefrom. Examples
of autoimmune diseases or disorders include, but are not limited to arthritis (rheumatoid arthritis, juvenile-onset
rheumatoid arthritis, osteoarthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis), psoriasis, dermatitis including
atopic dermatitis, chronic idiopathic urticaria, including chronic autoimmune urticaria,
20 polymyositis/dermatomyositis, toxic epidermal necrolysis, scleroderma (including systemic scleroderma),
sclerosis such as progressive systemic sclerosis, inflammatory bowel disease (IBD) (for example, Crohn's
disease, ulcerative colitis, autoimmune inflammatory bowel disease), pyoderma gangrenosum, erythema
nodosum, primary sclerosing cholangitis, episcleritis), respiratory distress syndrome, including adult respiratory
distress syndrome (ARDS), meningitis, IgE-mediated diseases such as anaphylaxis and allergic and atopic
25 rhinitis, encephalitis such as Rasmussen's encephalitis, uveitis or autoimmune uveitis, colitis such as microscopic
colitis and collagenous colitis, glomerulonephritis (GN) such as membranous GN (membranous nephropathy),
idiopathic membranous GN, membranous proliferative GN (MPGN), including Type I and Type II, and rapidly
progressive GN, allergic conditions, allergic reaction, eczema, asthma, conditions involving infiltration of T
cells and chronic inflammatory responses, atherosclerosis, autoimmune myocarditis, leukocyte adhesion
30 deficiency, systemic lupus erythematosus (SLE) such as cutaneous SLE, subacute cutaneous lupus
erythematosus, lupus (including nephritis, cerebritis, pediatric, non-renal, discoid, alopecia), juvenile onset
(Type I) diabetes mellitus, including pediatric insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), adult onset diabetes
mellitus (Type II diabetes), multiple sclerosis (MS) such as spino-optical MS, immune responses associated with
acute and delayed hypersensitivity mediated by cytokines and T-lymphocytes, tuberculosis, sarcoidosis,
35 granulomatosis including lymphomatoid granulomatosis, Wegener's granulomatosis, agranulocytosis, vasculitis
(including large vessel vasculitis (including polymyalgia rheumatica and giant cell (Takayasu's) arteritis),
medium vessel vasculitis (including Kawasaki's disease and polyarteritis nodosa), CNS vasculitis, systemic
necrotizing vasculitis, and ANCA-associated vasculitis, such as Churg-Strauss vasculitis or syndrome (CSS)),
temporal arteritis, aplastic anemia, Coombs positive anemia, Diamond Blackfan anemia, hemolytic anemia or
40 immune hemolytic anemia including autoimmune hemolytic anemia (AIHA), pernicious anemia, pure red cell

5 aplasia (PRCA), Factor VIII deficiency, hemophilia A, autoimmune neutropenia, pancytopenia, leukopenia,
diseases involving leukocyte diapedesis, CNS inflammatory disorders, multiple organ injury syndrome, antigen-
antibody complex mediated diseases, anti-glomerular basement membrane disease, anti-phospholipid antibody
syndrome, allergic neuritis, Bechet's or Behcet's disease, Castleman's syndrome, Goodpasture's syndrome,
10 Reynaud's syndrome, Sjogren's syndrome, Stevens-Johnson syndrome, pemphigoid such as pemphigoid bullous,
pemphigus (including vulgaris, foliaceus, and pemphigus mucus-membrane pemphigoid), autoimmune
polyendocrinopathies, Reiter's disease, immune complex nephritis, chronic neuropathy such as IgM
polyneuropathies or IgM-mediated neuropathy, thrombocytopenia (as developed by myocardial infarction
patients, for example), including thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) and autoimmune or immune-
15 mediated thrombocytopenia such as idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) including chronic or acute ITP,
autoimmune disease of the testis and ovary including autoimmune orchitis and oophoritis, primary
hypothyroidism, hypoparathyroidism, autoimmune endocrine diseases including thyroiditis such as autoimmune
thyroiditis, chronic thyroiditis (Hashimoto's thyroiditis), or subacute thyroiditis, autoimmune thyroid disease,
idiopathic hypothyroidism, Addison's disease, Grave's disease, polyglandular syndromes such as autoimmune
20 polyglandular syndromes (or polyglandular endocrinopathy syndromes), paraneoplastic syndromes, including
neurologic paraneoplastic syndromes such as Lambert-Eaton myasthenic syndrome or Eaton-Lambert syndrome,
stiff-man or stiff-person syndrome, encephalomyelitis such as allergic encephalomyelitis, myasthenia gravis,
cerebellar degeneration, limbic and/or brainstem encephalitis, neuromyotonia, opsoclonus or opsoclonus
myoclonus syndrome (OMS), and sensory neuropathy, Sheehan's syndrome, autoimmune hepatitis, chronic
hepatitis, lupoid hepatitis, chronic active hepatitis or autoimmune chronic active hepatitis, lymphoid interstitial
25 pneumonitis, bronchiolitis obliterans (non-transplant) vs NSIP, Guillain-Barré syndrome, Berger's disease (IgA
nephropathy), primary biliary cirrhosis, celiac sprue (gluten enteropathy), refractory sprue, dermatitis
herpetiformis, cryoglobulinemia, amyotrophic lateral sclerosis (ALS; Lou Gehrig's disease), coronary artery
disease, autoimmune inner ear disease (AIED); or autoimmune hearing loss, opsoclonus myoclonus syndrome
(OMS), polychondritis such as refractory polychondritis, pulmonary alveolar proteinosis, amyloidosis, giant cell
30 hepatitis, scleritis, a non-cancerous lymphocytosis, a primary lymphocytosis, which includes monoclonal B cell
lymphocytosis (e.g., benign monoclonal gammopathy and monoclonal gammopathy of undetermined
significance, MGUS), peripheral neuropathy, paraneoplastic syndrome, channelopathies such as epilepsy,
migraine, arrhythmia, muscular disorders, deafness, blindness, periodic paralysis, and channelopathies of the
CNS, autism, inflammatory myopathy, focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), endocrine ophthalmopathy,
35 uveoretinitis, autoimmune hepatological disorder, fibromyalgia, multiple endocrine failure, Schmidt's syndrome,
adrenalitis, gastric atrophy, presenile dementia, demyelinating diseases, Dressler's syndrome, alopecia arcata,
CREST syndrome (calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly, and
telangiectasia), male and female autoimmune infertility, ankylosing spondylitis, mixed connective tissue disease,
Chagas' disease, rheumatic fever, recurrent abortion, farmer's lung, erythema multiforme, post-cardiotomy
40 syndrome, Cushing's syndrome, bird-fancier's lung, Alport's syndrome, alveolitis such as allergic alveolitis and
fibrosing alveolitis, interstitial lung disease, transfusion reaction, leprosy, malaria, leishmaniasis,

kypanosomiasis, schistosomiasis, ascariasis, aspergillosis, Sampter's syndrome, Caplan's syndrome, dengue, endocarditis, endomyocardial fibrosis, endophthalmitis, erythema elevatum et diutinum, erythroblastosis fetalis, eosinophilic facitis, Shulman's syndrome, Felty's syndrome, flariasis, cyclitis such as chronic cyclitis, heterochronic cyclitis, or Fuch's cyclitis, Henoch-Schonlein purpura, human immunodeficiency virus (HIV) infection, echovirus infection, cardiomyopathy, Alzheimer's disease, parvovirus infection, rubella virus infection, post-vaccination syndromes, congenital rubella infection, Epstein-Barr virus infection, mumps, Evan's syndrome, autoimmune gonadal failure, Sydenham's chorea, post-streptococcal nephritis, thromboangitis obliterans, thyrotoxicosis, tabes dorsalis, and giant cell polymyalgia.

A "benign hyperproliferative disorder" is meant a state in a patient that relates to cell proliferation and which is recognized as abnormal by members of the medical community. An abnormal state is characterized by a level of a property that is statistically different from the level observed in organisms not suffering from the disorder. Cell proliferation refers to growth or extension by multiplication of cells and includes cell division. The rate of cell proliferation may be measured by counting the number of cells produced in a given unit of time. Examples of benign hyperproliferative disorders include psoriasis and polyps.

A "respiratory disease" involves the respiratory system and includes chronic bronchitis, asthma including acute asthma and allergic asthma, cystic fibrosis, bronchiectasis, allergic or other rhinitis or sinusitis, α 1-antitrypsin deficiency, coughs, pulmonary emphysema, pulmonary fibrosis or hyper-reactive airways, chronic obstructive pulmonary disease, and chronic obstructive lung disorder.

"Psoriasis" is a condition characterized by the eruption of circumscribed, discrete and confluent, reddish, silvery-scaled maculopapules. Psoriatic lesions generally occur predominantly on the elbows, knees, scalp, and trunk, and microscopically show characteristic parakeratosis and elongation of rete ridges. The term includes the various forms of psoriasis, including erythrodermic, pustular, moderate-severe and recalcitrant forms of the disease.

"Endometriosis" refers to the ectopic occurrence of endometrial tissue, frequently forming cysts containing altered blood.

The term "vascular disease or disorder" herein refers to the various diseases or disorders which impact the vascular system, including the cardiovascular system. Examples of such diseases include arteriosclerosis, vascular reobstruction, atherosclerosis, postsurgical vascular stenosis, restenosis, vascular occlusion or carotid obstructive disease, coronary artery disease, angina, small vessel disease, hypercholesterolemia, hypertension, and conditions involving abnormal proliferation or function of vascular epithelial cells.

The term "stenosis" refers to narrowing or stricture of a hollow passage (e.g., a duct or canal) in the body.

The term "vascular stenosis" refers to occlusion or narrowing of blood vessels. Vascular stenosis often results from fatty deposit (as in the case of atherosclerosis) or excessive migration and proliferation of vascular smooth muscle cells and endothelial cells. Arteries are particularly susceptible to stenosis. The term "stenosis"

as used herein specifically includes initial stenosis and restenosis.

The term "restenosis" refers to recurrence of stenosis after treatment of initial stenosis with apparent success. For example, "restenosis" in the context of vascular stenosis, refers to the reoccurrence of vascular stenosis after it has been treated with apparent success, *e.g.* by removal of fatty deposit by angioplasty (*e.g.* percutaneous transluminal coronary angioplasty), direction coronary atherectomy or stent etc. One of the contributing factors in restenosis is intimal hyperplasia. The term "intimal hyperplasia", used interchangeably with "neointimal hyperplasia" and "neointima formation", refers to thickening of the inner most layer of blood vessels, intima, as a consequence of excessive proliferation and migration of vascular smooth muscle cells and endothelial cells. The various changes taking place during restenosis are often collectively referred to as "vascular wall remodeling."

The terms "balloon angioplasty" and "percutaneous transluminal coronary angioplasty" (PTCA) are often used interchangeably, and refer to a non-surgical catheter-based treatment for removal of plaque from the coronary artery. Stenosis or restenosis often lead to hypertension as a result of increased resistance to blood flow.

The term "hypertension" refers to abnormally high blood pressure, *i.e.* beyond the upper value of the normal range.

"Polyps" refers to a mass of tissue that bulges or projects outward or upward from the normal surface level, thereby being macroscopically visible as a hemispheroidal, spheroidal, or irregular moundlike structure growing from a relatively broad base or a slender stalk. Examples include colon, rectal and nasal polyps.

"Fibroadenoma" references a benign neoplasm derived from glandular epithelium, in which there is a conspicuous stroma of proliferating fibroblasts and connective tissue elements. This commonly occurs in breast tissue.

"Asthma" is a condition which results in difficulty in breathing. Bronchial asthma refers to a condition of the lungs in which there is widespread narrowing of airways, which may be due to contraction (spasm) of smooth muscle, edema of the mucosa, or mucus in the lumen of the bronchi and bronchioles.

"Bronchitis" refers to inflammation of the mucous membrane of the bronchial tubes.

II. Gene Expression Analysis

The present invention provides a method for selecting patients for therapy with a HER inhibitor, wherein a sample from the patient is tested for expression of two or more HER receptors (preferably selected from EGFR, HER2, and HER3) and one or more HER ligands (preferably selected from betacellulin, amphiregulin, epiregulin, and TGF- α , most preferably betacellulin or amphiregulin). For example, the two or more HER receptors may be EGFR and HER2, or HER2 and HER3. In one embodiment, expression of HER2 and EGFR or HER3, as well as betacellulin or amphiregulin is determined. The sample may be tested for expression of betacellulin or amphiregulin, alone or in combination with testing for expression of two or more

HER receptors. Positive expression of the identified gene(s) indicates the patient is a candidate for therapy with a HER inhibitor, HER dimerization inhibitor, or pertuzumab. Moreover, positive expression of the gene(s) indicates the patient is more likely to respond favorably to therapy with the HER inhibitor than a patient who does not have such positive expression.

The sample may be obtained from a patient in need of therapy with a HER inhibitor. Where the subject has cancer, the sample is a tumor sample. In the preferred embodiment, the tumor sample is ovarian, peritoneal, fallopian tube cancer, metastatic breast cancer (MBC), or non-small cell lung cancer (NSCLC) tumor sample. However, various other non-malignant therapeutic indications for HER inhibitors are available and described herein. Where the patient is to be treated for those non-malignant indications, a suitable sample can be obtained from the patient and analyzed for gene expression analysis as described herein.

The biological sample herein is preferably a fixed sample, *e.g.* a formalin fixed, paraffin-embedded (FFPE) sample, or a frozen sample.

Preferably, the HER inhibitor is a HER dimerization inhibitor, and/or a HER antibody (*e.g.* a HER2 antibody, such as HER2 antibody which binds to Domain II of HER2, for example pertuzumab).

Various methods for determining expression of mRNA or protein are described in more detail below. Preferably mRNA is quantified. Such mRNA analysis is preferably performed using the technique of polymerase chain reaction (PCR), or by microarray analysis. Where PCR is employed, a preferred form of PCR is quantitative real time PCR (qRT-PCR). In one embodiment, expression of one or more of the above noted genes is deemed positive expression if it is at the median or above, *e.g.* compared to other samples of the same tumor-type. The median expression level can be determined essentially contemporaneously with measuring gene expression, or may have been determined previously.

The present gene expression analyses serve as surrogates for HER phosphorylation or activation. This is particularly useful where the sample is a fixed sample (*e.g.* paraffin-embedded, formalin fixed tumor sample) where HER phosphorylation may be difficult to reliably quantify. Thus, the invention provides a method of assessing HER phosphorylation or activation in a biological sample comprising determining expression of two or more HER receptors and one or more HER ligand in the sample, wherein expression of the two or more HER receptors and one or more HER ligand indicates positive HER phosphorylation or activation in the sample. The invention also provides a method of assessing HER phosphorylation or activation in a biological sample comprising determining expression of betacellulin and/or amphiregulin in the sample, wherein betacellulin and/or amphiregulin expression indicates positive HER phosphorylation or activation in the sample.

The invention provides a method of identifying a patient for therapy with a HER inhibitor comprising determining expression of two or more HER receptors and one or more HER ligand in a sample from the patient, wherein expression of the HER receptors and HER ligand indicates the patient is likely to respond to therapy with the HER inhibitor. The patient may be identified as being more likely to respond to the HER inhibitor, than a patient who does not express two or more HER receptors and one or more HER ligand. In another

5 embodiment, the method of identifying the patient for therapy with a HER inhibitor comprises determining expression of betacellulin or amphiregulin in the sample, alone or in combination with determining expression of two or more HER receptors.

The invention further provides a method for selecting an ovarian cancer patient for therapy with a HER inhibitor by determining betacellulin or amphiregulin expression, alone or in combination with determining
10 expression of two or more HER receptors in an ovarian cancer sample from the patient.

Various exemplary methods for determining gene expression will now be described in more detail.

(i) *Gene Expression Profiling*

In general, methods of gene expression profiling can be divided into two large groups: methods based on hybridization analysis of polynucleotides, and methods based on sequencing of polynucleotides. The most
15 commonly used methods known in the art for the quantification of mRNA expression in a sample include northern blotting and *in situ* hybridization (Parker & Barnes, *Methods in Molecular Biology* 106:247-283 (1999)); RNase protection assays (Hod, *Biotechniques* 13:852-854 (1992)); and polymerase chain reaction (PCR) (Weis *et al.*, *Trends in Genetics* 8:263-264 (1992)). Alternatively, antibodies may be employed that can
20 recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes. Representative methods for sequencing-based gene expression analysis include Serial Analysis of Gene Expression (SAGE), and gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS).

(ii) *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Of the techniques listed above, a sensitive and flexible quantitative method is PCR, which can be used to compare mRNA levels in different sample populations, in normal and tumor tissues, with or without drug
25 treatment, to characterize patterns of gene expression; to discriminate between closely related mRNAs, and to analyze RNA structure.

The first step is the isolation of mRNA from a target sample. The starting material is typically total RNA isolated from human tumors or tumor cell lines, and corresponding normal tissues or cell lines, respectively. Thus RNA can be isolated from a variety of primary tumors, including breast, lung, colon, prostate,
30 brain, liver, kidney, pancreas, spleen, thymus, testis, ovary, uterus, etc., tumor, or tumor cell lines, with pooled DNA from healthy donors. If the source of mRNA is a primary tumor, mRNA can be extracted, for example, from frozen or archived paraffin-embedded and fixed (*e.g.* formalin-fixed) tissue samples.

General methods for mRNA extraction are well known in the art and are disclosed in standard textbooks of molecular biology, including Ausubel *et al.*, *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley
35 and Sons (1997). Methods for RNA extraction from paraffin embedded tissues are disclosed, for example, in Rupp and Locker, *Lab Invest.* 56:A67 (1987), and De Andrés *et al.*, *BioTechniques* 18:42044 (1995). In particular, RNA isolation can be performed using purification kit, buffer set and protease from commercial manufacturers, such as Qiagen, according to the manufacturer's instructions. For example, total RNA from cells

in culture can be isolated using Qiagen RNeasy mini- columns. Other commercially available RNA isolation kits include MASTERPURE® Complete DNA and RNA Purification Kit (EPICENTRE®, Madison, Wis.), and Paraffin Block RNA Isolation Kit (Ambion, Inc.). Total RNA from tissue samples can be isolated using RNA Stat-60 (Tel-Test). RNA prepared from tumor can be isolated, for example, by cesium chloride density gradient centrifugation.

As RNA cannot serve as a template for PCR, the first step in gene expression profiling by PCR is the reverse transcription of the RNA template into cDNA, followed by its exponential amplification in a PCR reaction. The two most commonly used reverse transcriptases are avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (AMV-RT) and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT). The reverse transcription step is typically primed using specific primers, random hexamers, or oligo-dT primers, depending on the circumstances and the goal of expression profiling. For example, extracted RNA can be reverse-transcribed using a GENEAMP™ RNA PCR kit (Perkin Elmer, Calif., USA), following the manufacturer's instructions. The derived cDNA can then be used as a template in the subsequent PCR reaction.

Although the PCR step can use a variety of thermostable DNA-dependent DNA polymerases, it typically employs the Taq DNA polymerase, which has a 5'-3' nuclease activity but lacks a 3'-5' proofreading endonuclease activity. Thus, TAQMAN® PCR typically utilizes the 5'-nuclease activity of Taq or Tth polymerase to hydrolyze a hybridization probe bound to its target amplicon, but any enzyme with equivalent 5' nuclease activity can be used. Two oligonucleotide primers are used to generate an amplicon typical of a PCR reaction. A third oligonucleotide, or probe, is designed to detect nucleotide sequence located between the two PCR primers. The probe is non-extendible by Taq DNA polymerase enzyme, and is labeled with a reporter fluorescent dye and a quencher fluorescent dye. Any laser-induced emission from the reporter dye is quenched by the quenching dye when the two dyes are located close together as they are on the probe. During the amplification reaction, the Taq DNA polymerase enzyme cleaves the probe in a template-dependent manner. The resultant probe fragments disassociate in solution, and signal from the released reporter dye is free from the quenching effect of the second fluorophore. One molecule of reporter dye is liberated for each new molecule synthesized, and detection of the unquenched reporter dye provides the basis for quantitative interpretation of the data.

TAQMAN® PCR can be performed using commercially available equipment, such as, for example, ABI PRISM 7700® Sequence Detection System® (Perkin- Elmer-Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA), or Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). In a preferred embodiment, the 5' nuclease procedure is run on a real-time quantitative PCR device such as the ABI PRISM 7700® Sequence Detection System. The system consists of a thermocycler, laser, charge-coupled device (CCD), camera and computer. The system amplifies samples in a 96-well format on a thermocycler. During amplification, laser-induced fluorescent signal is collected in real-time through fiber optics cables for all 96 wells, and detected at the CCD. The system includes software for running the instrument and for analyzing the data.

5'-Nuclease assay data are initially expressed as Ct, or the threshold cycle. As discussed above,



5 fluorescence values are recorded during every cycle and represent the amount of product amplified to that point in the amplification reaction. The point when the fluorescent signal is first recorded as statistically significant is the threshold cycle (Ct).

To minimize errors and the effect of sample-to-sample variation, PCR is usually performed using an internal standard. The ideal internal standard is expressed at a constant level among different tissues, and is
10 unaffected by the experimental treatment. RNAs most frequently used to normalize patterns of gene expression are mRNAs for the housekeeping genes glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) and P-actin.

A more recent variation of the PCR technique is quantitative real time PCR (qRT-PCR), which measures PCR product accumulation through a dual-labeled fluorogenic probe (*i.e.*, TAQMAN® probe). Real time PCR is compatible both with quantitative competitive PCR, where internal competitor for each target
15 sequence is used for normalization, and with quantitative comparative PCR using a normalization gene contained within the sample, or a housekeeping gene for PCR. For further details see, *e.g.* Held *et al.*, *Genome Research* 6:986-994 (1996).

The steps of a representative protocol for profiling gene expression using fixed, paraffin-embedded tissues as the RNA source, including mRNA isolation, purification, primer extension and amplification are given
20 in various published journal articles (for example: Godfrey *et al.*, *J. Molec. Diagnostics* 2: 84-91 (2000); Specht *et al.*, *Am. J. Pathol.* 158: 419-29 (2001)). Briefly, a representative process starts with cutting about 10 microgram thick sections of paraffin-embedded tumor tissue samples. The RNA is then extracted, and protein and DNA are removed. After analysis of the RNA concentration, RNA repair and/or amplification steps may be included, if necessary, and RNA is reverse transcribed using gene specific promoters followed by PCR.

According to one aspect of the present invention, PCR primers and probes are designed based upon
25 intron sequences present in the gene to be amplified. In this embodiment, the first step in the primer/probe design is the delineation of intron sequences within the genes. This can be done by publicly available software, such as the DNA BLAT software developed by Kent, W., *Genome Res.* 12(4):656-64 (2002), or by the BLAST software including its variations. Subsequent steps follow well established methods of PCR primer and probe
30 design.

In order to avoid non-specific signals, it is important to mask repetitive sequences within the introns when designing the primers and probes. This can be easily accomplished by using the Repeat Masker program available on-line through the Baylor College of Medicine, which screens DNA sequences against a library of repetitive elements and returns a query sequence in which the repetitive elements are masked. The masked intron
35 sequences can then be used to design primer and probe sequences using any commercially or otherwise publicly available primer/probe design packages, such as Primer Express (Applied Biosystems); MGB assay-by-design (Applied Biosystems); Primer3 (Rozen and Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, N.J., pp 365-386).

5 Factors considered in PCR primer design include primer length, melting temperature (T_m), and G/C content, specificity, complementary primer sequences, and 3'-end sequence. In general, optimal PCR primers are generally 17-30 bases in length, and contain about 20-80%, such as, for example, about 50-60% G+C bases. T_m 's between 50 and 80° C., e.g. about 50 to 70° C. are typically preferred.

10 For further guidelines for PCR primer and probe design see, e.g. Dieffenbach *et al.*, "General Concepts for PCR Primer Design" in: *PCR Primer, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995, pp. 133-155; Innis and Gelfand, "Optimization of PCRs" in: *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, CRC Press, London, 1994, pp. 5-11; and Plasterer, T. N. Primerselct: Primer and probe design. *Methods Mol. Biol.* 70:520- 527 (1997), the entire disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference.

15 (iii) Microarrays

Differential gene expression can also be identified, or confirmed using the microarray technique. Thus, the expression profile of breast cancer- associated genes can be measured in either fresh or paraffin-embedded tumor tissue, using microarray technology. In this method, polynucleotide sequences of interest (including cDNAs and oligonucleotides) are plated, or arrayed, on a microchip substrate. The arrayed sequences are then hybridized with specific DNA probes from cells or tissues of interest. Just as in the PCR method, the source of mRNA typically is total RNA isolated from human tumors or tumor cell lines, and corresponding normal tissues or cell lines. Thus RNA can be isolated from a variety of primary tumors or tumor cell lines. If the source of mRNA is a primary tumor, mRNA can be extracted, for example, from frozen or archived paraffin- embedded and fixed (e.g. formalin-fixed) tissue samples, which are routinely prepared and preserved in everyday clinical practice.

20 In a specific embodiment of the microarray technique, PCR amplified inserts of cDNA clones are applied to a substrate in a dense array. Preferably at least 10,000 nucleotide sequences are applied to the substrate. The microarrayed genes, immobilized on the microchip at 10,000 elements each, are suitable for hybridization under stringent conditions. Fluorescently labeled cDNA probes may be generated through incorporation of fluorescent nucleotides by reverse transcription of RNA extracted from tissues of interest. Labeled cDNA probes applied to the chip hybridize with specificity to each spot of DNA on the array. After stringent washing to remove non-specifically bound probes, the chip is scanned by confocal laser microscopy or by another detection method, such as a CCD camera. Quantitation of hybridization of each arrayed element allows for assessment of corresponding mRNA abundance. With dual color fluorescence, separately labeled cDNA probes generated from two sources of RNA are hybridized pairwise to the array. The relative abundance of the transcripts from the two sources corresponding to each specified gene is thus determined simultaneously. The miniaturized scale of the hybridization affords a convenient and rapid evaluation of the expression pattern for large numbers of genes. Such methods have been shown to have the sensitivity required to detect rare transcripts, which are expressed at a few copies per cell, and to reproducibly detect at least approximately two-fold differences in the expression levels (Schena *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(2):106-149 (1996)).

5 Microarray analysis can be performed by commercially available equipment, following manufacturer's protocols, such as by using the Affymetrix GENCHIP™ technology, or Incyte's microarray technology.

The development of microarray methods for large-scale analysis of gene expression makes it possible to search systematically for molecular markers of cancer classification and outcome prediction in a variety of tumor types.

10 (iv) *Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)*

Serial analysis of gene expression (SAGE) is a method that allows the simultaneous and quantitative analysis of a large number of gene transcripts, without the need of providing an individual hybridization probe for each transcript. First, a short sequence tag (about 10-14 bp) is generated that contains sufficient information to uniquely identify a transcript, provided that the tag is obtained from a unique position within each transcript. Then, many transcripts are linked together to form long serial molecules, that can be sequenced, revealing the identity of the multiple tags simultaneously. The expression pattern of any population of transcripts can be quantitatively evaluated by determining the abundance of individual tags, and identifying the gene corresponding to each tag. For more details see, e.g. Velculescu *et al.*, *Science* 270:484-487 (1995); and Velculescu *et al.*, *Cell* 88:243-51 (1997).

20 (v) *MassARRAY Technology*

The MassARRAY (Sequenom, San Diego, Calif.) technology is an automated, high-throughput method of gene expression analysis using mass spectrometry (MS) for detection. According to this method, following the isolation of RNA, reverse transcription and PCR amplification, the cDNAs are subjected to primer extension. The cDNA-derived primer extension products are purified, and dispensed on a chip array that is pre-loaded with the components needed for MALTI-TOF MS sample preparation. The various cDNAs present in the reaction are quantitated by analyzing the peak areas in the mass spectrum obtained.

25 (vi) *Gene Expression Analysis by Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS)*

This method, described by Brenner *et al.*, *Nature Biotechnology* 18:630-634 (2000), is a sequencing approach that combines non-gel-based signature sequencing with in vitro cloning of millions of templates on separate 5 microgram diameter microbeads. First, a microbead library of DNA templates is constructed by in vitro cloning. This is followed by the assembly of a planar array of the template-containing microbeads in a flow cell at a high density (typically greater than 3×10^6 microbeads/cm²). The free ends of the cloned templates on each microbead are analyzed simultaneously, using a fluorescence-based signature sequencing method that does not require DNA fragment separation. This method has been shown to simultaneously and accurately provide, in a single operation, hundreds of thousands of gene signature sequences from a yeast cDNA library.

35 (vii) *Immunohistochemistry*

Immunohistochemistry methods are also suitable for detecting the expression levels of the prognostic markers of the present invention. Thus, antibodies or antisera, preferably polyclonal antisera, and most

43

5 preferably monoclonal antibodies specific for each marker are used to detect expression. The antibodies can be detected by direct labeling of the antibodies themselves, for example, with radioactive labels, fluorescent labels, hapten labels such as, biotin, or an enzyme such as horse radish peroxidase or alkaline phosphatase. Alternatively, unlabeled primary antibody is used in conjunction with a labeled secondary antibody, comprising antisera, polyclonal antisera or a monoclonal antibody specific for the primary antibody. Immunohistochemistry
10 protocols and kits are well known in the art and are commercially available.

(viii) *Proteomics*

The term "proteome" is defined as the totality of the proteins present in a sample (e.g. tissue, organism, or cell culture) at a certain point of time. Proteomics includes, among other things, study of the global changes of protein expression in a sample (also referred to as "expression proteomics"). Proteomics typically includes the
15 following steps: (1) separation of individual proteins in a sample by 2-D gel electrophoresis (2-D PAGE); (2) identification of the individual proteins recovered from the gel, e.g. by mass spectrometry or N-terminal sequencing, and (3) analysis of the data using bioinformatics. Proteomics methods are valuable supplements to other methods of gene expression profiling, and can be used, alone or in combination with other methods, to detect the products of the prognostic markers of the present invention.

20 (ix) *General Description of the mRNA Isolation, Purification and Amplification*

The steps of a representative protocol for profiling gene expression using fixed, paraffin-embedded tissues as the RNA source, including mRNA isolation, purification, primer extension and amplification are given in various published journal articles (for example: Godfrey *et al. J. Molec. Diagnostics* 2: 84-91 (2000); Specht *et al., Am. J. Pathol.* 158: 419-29 (2001)). Briefly, a representative process starts with cutting about 10
25 microgram thick sections of paraffin-embedded tumor tissue samples. The RNA is then extracted, and protein and DNA are removed. After analysis of the RNA concentration, RNA repair and/or amplification steps may be included, if necessary, and RNA is reverse transcribed using gene specific promoters followed by PCR. Finally, the data are analyzed to identify the best treatment option(s) available to the patient on the basis of the characteristic gene expression pattern identified in the tumor sample examined.

30 **III. Production of Antibodies**

In the preferred embodiment, the HER inhibitor is a HER antibody. A description follows as to exemplary techniques for the production of the antibodies used in accordance with the present invention. The HER antigen to be used for production of antibodies may be, e.g., a soluble form of the extracellular domain of
35 HER or a portion thereof, containing the desired epitope. Alternatively, cells expressing HER at their cell surface (e.g. NIH-3T3 cells transformed to overexpress HER2; or a carcinoma cell line such as SK-BR-3 cells, see Stancovski *et al. PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991)) can be used to generate antibodies. Other forms of HER receptor useful for generating antibodies will be apparent to those skilled in the art.

5 (i) *Polyclonal antibodies*

Polyclonal antibodies are preferably raised in animals by multiple subcutaneous (sc) or intraperitoneal (ip) injections of the relevant antigen and an adjuvant. It may be useful to conjugate the relevant antigen to a protein that is immunogenic in the species to be immunized, e.g., keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor using a bifunctional or derivatizing agent, for example, maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester (conjugation through cysteine residues), N-hydroxysuccinimide (through lysine residues), glutaraldehyde, succinic anhydride, SOCl_2 , or $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, where R and R^1 are different alkyl groups.

Animals are immunized against the antigen, immunogenic conjugates, or derivatives by combining, e.g., 100 μg or 5 μg of the protein or conjugate (for rabbits or mice, respectively) with 3 volumes of Freund's complete adjuvant and injecting the solution intradermally at multiple sites. One month later the animals are boosted with 1/5 to 1/10 the original amount of peptide or conjugate in Freund's complete adjuvant by subcutaneous injection at multiple sites. Seven to 14 days later the animals are bled and the serum is assayed for antibody titer. Animals are boosted until the titer plateaus. Preferably, the animal is boosted with the conjugate of the same antigen, but conjugated to a different protein and/or through a different cross-linking reagent. Conjugates also can be made in recombinant cell culture as protein fusions. Also, aggregating agents such as alum are suitably used to enhance the immune response.

(ii) *Monoclonal antibodies*

Various methods for making monoclonal antibodies herein are available in the art. For example, the monoclonal antibodies may be made using the hybridoma method first described by Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), by recombinant DNA methods (U.S. Patent No. 4,816,567).

In the hybridoma method, a mouse or other appropriate host animal, such as a hamster, is immunized as hereinabove described to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the protein used for immunization. Alternatively, lymphocytes may be immunized *in vitro*. Lymphocytes then are fused with myeloma cells using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

The hybridoma cells thus prepared are seeded and grown in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, parental myeloma cells. For example, if the parental myeloma cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (HAT medium), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred myeloma cells are those that fuse efficiently, support stable high-level production of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. Among these, preferred myeloma cell lines are murine myeloma lines, such as those derived from MOPC-21 and MPC-11 mouse tumors available from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, and SP-2 or X63-Ag8-653 cells available from the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Human

5 myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); and Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Culture medium in which hybridoma cells are growing is assayed for production of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA).

The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

After hybridoma cells are identified that produce antibodies of the desired specificity, affinity, and/or activity, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Suitable culture media for this purpose include, for example, D-MEM or RPMI-1640 medium. In addition, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites tumors in an animal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones are suitably separated from the culture medium, ascites fluid, or serum by conventional antibody purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

DNA encoding the monoclonal antibodies is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce antibody protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. Review articles on recombinant expression in bacteria of DNA encoding the antibody include Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) and Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

In a further embodiment, monoclonal antibodies or antibody fragments can be isolated from antibody phage libraries generated using the techniques described in McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describe the isolation of murine and human antibodies, respectively, using phage libraries. Subsequent publications describe the production of high affinity (nM range) human antibodies by chain shuffling (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), as well as combinatorial infection and *in vivo* recombination as a strategy for constructing very large phage libraries (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Thus, these techniques are viable alternatives to traditional monoclonal antibody hybridoma techniques for isolation of monoclonal antibodies.

The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy chain and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences (U.S. Patent No.

5 4,816,567; and Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide.

Typically such non-immunoglobulin polypeptides are substituted for the constant domains of an antibody, or they are substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody to create a chimeric bivalent antibody comprising one antigen-combining site having specificity for an antigen and
10 another antigen-combining site having specificity for a different antigen.

(iii) *Humanized antibodies*

Methods for humanizing non-human antibodies have been described in the art. Preferably, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), by substituting hypervariable region sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567) wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the
15 corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some hypervariable region residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

The choice of human variable domains, both light and heavy, to be used in making the humanized antibodies is very important to reduce antigenicity. According to the so-called "best-fit" method, the sequence of the variable domain of a rodent antibody is screened against the entire library of known human variable-domain sequences. The human sequence which is closest to that of the rodent is then accepted as the human framework region (FR) for the humanized antibody (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Another method uses a particular framework region derived from the consensus sequence of all human antibodies of a particular subgroup of light or heavy chains. The same framework may be
20 used for several different humanized antibodies (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

It is further important that antibodies be humanized with retention of high affinity for the antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to a preferred method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, *i.e.*, the analysis of residues that influence
35 the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the recipient and import sequences so that the desired antibody characteristic, such as increased
40

5 affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the hypervariable region residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

WO01/00245 describes production of exemplary humanized HER2 antibodies which bind HER2 and block ligand activation of a HER receptor. The humanized antibody of particular interest herein blocks EGF, TGF- α and/or HRG mediated activation of MAPK essentially as effectively as murine monoclonal antibody 2C4 (or a Fab fragment thereof) and/or binds HER2 essentially as effectively as murine monoclonal antibody 2C4 (or a Fab fragment thereof). The humanized antibody herein may, for example, comprise nonhuman hypervariable region residues incorporated into a human variable heavy domain and may further comprise a framework region (FR) substitution at a position selected from the group consisting of 69H, 71H and 73H utilizing the variable domain numbering system set forth in Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). In one embodiment, the humanized antibody comprises FR substitutions at two or all of positions 69H, 71H and 73H.

An exemplary humanized antibody of interest herein comprises variable heavy domain complementarity determining residues GFTFTDYTMX, where X is preferably D or S (SEQ ID NO:7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID NO:8); and/or NLGPSFYFDY (SEQ ID NO:9), optionally comprising amino acid modifications of those CDR residues, *e.g.* where the modifications essentially maintain or improve affinity of the antibody. For example, the antibody variant of interest may have from about one to about seven or about five amino acid substitutions in the above variable heavy CDR sequences. Such antibody variants may be prepared by affinity maturation, *e.g.*, as described below. The most preferred humanized antibody comprises the variable heavy domain amino acid sequence in SEQ ID NO:4.

The humanized antibody may comprise variable light domain complementarity determining residues KASQDVSIGVA (SEQ ID NO:10); SASYX¹X²X³, where X¹ is preferably R or L, X² is preferably Y or E, and X³ is preferably T or S (SEQ ID NO:11); and/or QQYYIYPYT (SEQ ID NO:12), *e.g.* in addition to those variable heavy domain CDR residues in the preceding paragraph. Such humanized antibodies optionally comprise amino acid modifications of the above CDR residues, *e.g.* where the modifications essentially maintain or improve affinity of the antibody. For example, the antibody variant of interest may have from about one to about seven or about five amino acid substitutions in the above variable light CDR sequences. Such antibody variants may be prepared by affinity maturation, *e.g.*, as described below. The most preferred humanized antibody comprises the variable light domain amino acid sequence in SEQ ID NO:3.

The present application also contemplates affinity matured antibodies which bind HER2 and block ligand activation of a HER receptor. The parent antibody may be a human antibody or a humanized antibody, *e.g.*, one comprising the variable light and/or heavy sequences of SEQ ID Nos. 3 and 4, respectively (*i.e.* variant 574). The affinity matured antibody preferably binds to HER2 receptor with an affinity superior to that of murine 2C4 or variant 574 (*e.g.* from about two or about four fold, to about 100 fold or about 1000 fold improved affinity, *e.g.* as assessed using a HER2-extracellular domain (ECD) ELISA). Exemplary variable heavy CDR residues for substitution include H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, or combinations of two or more (*e.g.* two, three, four, five, six, or seven of these residues). Examples of variable light CDR residues for

5 alteration include L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 or combinations of two or more (e.g. two to three, four, five or up to about ten of these residues).

Various forms of the humanized antibody or affinity matured antibody are contemplated. For example, the humanized antibody or affinity matured antibody may be an antibody fragment, such as a Fab, which is optionally conjugated with one or more cytotoxic agent(s) in order to generate an immunoconjugate.

10 Alternatively, the humanized antibody or affinity matured antibody may be an intact antibody, such as an intact IgG1 antibody. The preferred intact IgG1 antibody comprises the light chain sequence in SEQ ID NO:13 and the heavy chain sequence in SEQ ID NO:14.

(iv) *Human antibodies*

15 As an alternative to humanization, human antibodies can be generated. For example, it is now possible to produce transgenic animals (e.g., mice) that are capable, upon immunization, of producing a full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy-chain joining region (J_H) gene in chimeric and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous antibody production. Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array in such germ-line mutant mice will result in the production of human antibodies upon antigen challenge. See, e.g., Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); and U.S. Patent Nos. 5,591,669, 5,589,369 and 5,545,807.

20 Alternatively, phage display technology (McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990)) can be used to produce human antibodies and antibody fragments *in vitro*, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors. According to this technique, antibody V domain genes are cloned in-frame into either a major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, such as M13 or fd, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. Thus, the phage mimics some of the properties of the B-cell. Phage display can be performed in a variety of formats; for their review see, e.g., Johnson, Kevin S. and Chiswell, David I., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Several sources of V-gene segments can be used for phage display. Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) isolated a diverse array of anti-oxazolone antibodies from a small random combinatorial library of V genes derived from the spleens of immunized mice. A repertoire of V genes from unimmunized human donors can be constructed and antibodies to a diverse array of antigens (including self-antigens) can be isolated essentially following the techniques described by Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), or Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). See, also, U.S. Patent Nos. 5,565,332 and 5,573,905.

35 As discussed above, human antibodies may also be generated by *in vitro* activated B cells (see U.S. Patents 5,567,610 and 5,229,275).

40 Human HER2 antibodies are described in U.S. Patent No. 5,772,997 issued June 30, 1998 and WO 97/00271 published January 3, 1997.

5 (v) *Antibody fragments*

Various techniques have been developed for the production of antibody fragments comprising one or more antigen binding regions. Traditionally, these fragments were derived via proteolytic digestion of intact antibodies (see, e.g., Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); and Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). However, these fragments can now be produced directly by recombinant host cells. For example, the antibody fragments can be isolated from the antibody phage libraries discussed above. Alternatively, Fab'-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form F(ab')₂ fragments (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). According to another approach, F(ab')₂ fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the skilled practitioner. In other embodiments, the antibody of choice is a single chain Fv fragment (scFv). See WO 93/16185; U.S. Patent No. 5,571,894; and U.S. Patent No. 5,587,458. The antibody fragment may also be a "linear antibody", e.g., as described in U.S. Patent 5,641,870 for example. Such linear antibody fragments may be monospecific or bispecific.

15 (vi) *Bispecific antibodies*

Bispecific antibodies are antibodies that have binding specificities for at least two different epitopes. Exemplary bispecific antibodies may bind to two different epitopes of the HER2 protein. Other such antibodies may combine a HER2 binding site with binding site(s) for EGFR, HER3 and/or HER4. Alternatively, a HER2 arm may be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (e.g. CD2 or CD3), or Fc receptors for IgG (FcγR), such as FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the HER2-expressing cell. Bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to cells which express HER2. These antibodies possess a HER2-binding arm and an arm which binds the cytotoxic agent (e.g. saporin, anti-interferon-α, vinca alkaloid, ricin A chain, methotrexate or radioactive isotope hapten). Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments (e.g. F(ab')₂ bispecific antibodies).

WO 96/16673 describes a bispecific HER2/FcγRIII antibody and U.S. Patent No. 5,837,234 discloses a bispecific HER2/FcγRI antibody IDM1 (Osidem). A bispecific HER2/Fcα antibody is shown in WO98/02463. U.S. Patent No. 5,821,337 teaches a bispecific HER2/CD3 antibody. MDX-210 is a bispecific HER2-FcγRIII Ab.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditional production of full length bispecific antibodies is based on the coexpression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two chains have different specificities (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of 10 different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. Purification of the correct molecule, which is usually done by affinity chromatography steps, is rather cumbersome, and the product yields are low. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829, and in Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

5 According to a different approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light chain binding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance.

15 In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain/light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule provides for a facile way of separation. This approach is disclosed in WO 94/04690. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

25 According to another approach described in U.S. Patent No. 5,731,168, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the C_H3 domain of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (e.g. tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g. alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

35 Bispecific antibodies include cross-linked or "heteroconjugate" antibodies. For example, one of the antibodies in the heteroconjugate can be coupled to avidin, the other to biotin. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells (U.S. Patent No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (WO 91/00360, WO 92/200373, and EP 03089). Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross-linking agents are well known in the art, and are disclosed in U.S. Patent No. 4,676,980, along with a number of cross-linking techniques.

40 Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have also been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate F(ab)₂ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite

5 to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

10 Recent progress has facilitated the direct recovery of Fab'-SH fragments from *E. coli*, which can be chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody F(ab')₂ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the HER2 receptor and normal human
15 T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody
20 homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain variable domain (V_L) by a linker which is too short to allow
25 pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V_H and V_L domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be
30 prepared. Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(vii) Other amino acid sequence modifications

Amino acid sequence modification(s) of the antibodies described herein are contemplated. For example, it may be desirable to improve the binding affinity and/or other biological properties of the antibody. Amino acid sequence variants of the antibody are prepared by introducing appropriate nucleotide changes into
35 the antibody nucleic acid, or by peptide synthesis. Such modifications include, for example, deletions from, and/or insertions into and/or substitutions of, residues within the amino acid sequences of the antibody. Any combination of deletion, insertion, and substitution is made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics. The amino acid changes also may alter post-translational processes of the antibody, such as changing the number or position of glycosylation sites.

40 A useful method for identification of certain residues or regions of the antibody that are preferred locations for mutagenesis is called "alanine scanning mutagenesis" as described by Cunningham and Wells

5 *Science*, 244:1081-1085 (1989). Here, a residue or group of target residues are identified (e.g., charged residues such as arg, asp, his, lys, and glu) and replaced by a neutral or negatively charged amino acid (most preferably alanine or polyalanine) to affect the interaction of the amino acids with antigen. Those amino acid locations demonstrating functional sensitivity to the substitutions then are refined by introducing further or other variants at, or for, the sites of substitution. Thus, while the site for introducing an amino acid sequence variation is
10 predetermined, the nature of the mutation *per se* need not be predetermined. For example, to analyze the performance of a mutation at a given site, ala scanning or random mutagenesis is conducted at the target codon or region and the expressed antibody variants are screened for the desired activity.

15 Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include antibody with an N-terminal methionyl residue or the antibody fused to a cytotoxic polypeptide. Other insertional variants of the antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the antibody to an enzyme (e.g. for ADEPT) or a polypeptide which increases the serum half-life of the antibody.

20 Another type of variant is an amino acid substitution variant. These variants have at least one amino acid residue in the antibody molecule replaced by a different residue. The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis include the hypervariable regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 1 under the heading of "preferred substitutions". If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions" in Table 1, or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced
25 and the products screened.

Table 1

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
35 Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg

Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

Substantial modifications in the biological properties of the antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Amino acids may be grouped according to similarities in the properties of their side chains (in A. L. Lehninger, in *Biochemistry*, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) non-polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) uncharged polar: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) acidic: Asp (D), Glu (E)

(4) basic: Lys (K), Arg (R), His(H)

Alternatively, naturally occurring residues may be divided into groups based on common side-chain properties:

(1) hydrophobic: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) acidic: Asp, Glu;

(4) basic: His, Lys, Arg;

(5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro;

(6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class.

5 Any cysteine residue not involved in maintaining the proper conformation of the antibody also may be substituted, generally with serine, to improve the oxidative stability of the molecule and prevent aberrant crosslinking. Conversely, cysteine bond(s) may be added to the antibody to improve its stability (particularly where the antibody is an antibody fragment such as an Fv fragment).

10 A particularly preferred type of substitutional variant involves substituting one or more hypervariable region residues of a parent antibody (e.g. a humanized or human antibody). Generally, the resulting variant(s) selected for further development will have improved biological properties relative to the parent antibody from which they are generated. A convenient way for generating such substitutional variants involves affinity maturation using phage display. Briefly, several hypervariable region sites (e.g. 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino substitutions at each site. The antibody variants thus generated are displayed in a monovalent fashion from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity (e.g. binding affinity) as herein disclosed. In order to identify candidate hypervariable region sites for modification, alanine scanning mutagenesis can be performed to identify hypervariable region residues contributing significantly to antigen binding. Alternatively, or additionally, it may be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and human HER2. Such contact residues and neighboring residues are candidates for substitution according to the techniques elaborated herein. Once such variants are generated, the panel of variants is subjected to screening as described herein and antibodies with superior properties in one or more relevant assays may be selected for further development.

25 Another type of amino acid variant of the antibody alters the original glycosylation pattern of the antibody. By altering is meant deleting one or more carbohydrate moieties found in the antibody, and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the antibody.

30 Glycosylation of antibodies is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine and asparagine-X-threonine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-acetylgalactosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

35 Addition of glycosylation sites to the antibody is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites). The alteration may also be made by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the sequence of the original antibody (for O-linked glycosylation sites).

40 Where the antibody comprises an Fc region, the carbohydrate attached thereto may be altered. For example, antibodies with a mature carbohydrate structure that lacks fucose attached to an Fc region of the antibody are described in US Pat Appl No US 2003/0157108 A1, Presta, L. See also US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Antibodies with a bisecting N-acetylglucosamine (GlcNAc) in the

5 carbohydrate attached to an Fc region of the antibody are referenced in WO03/011878, Jean-Mairet *et al.* and US Patent No. 6,602,684, Umana *et al.* Antibodies with at least one galactose residue in the oligosaccharide attached to an Fc region of the antibody are reported in WO97/30087, Patel *et al.* See, also, WO98/58964 (Raju, S.) and WO99/22764 (Raju, S.) concerning antibodies with altered carbohydrate attached to the Fc region thereof.

10 It may be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, *e.g.* so as to enhance antigen-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and/or complement dependent cytotoxicity (CDC) of the antibody. This may be achieved by introducing one or more amino acid substitutions in an Fc region of the antibody. Alternatively or additionally, cysteine residue(s) may be introduced in the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated
15 may have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) and Shopes, B. J. *Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity may also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff *et al. Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered which has dual Fc regions and may thereby have enhanced
20 complement lysis and ADCC capabilities. See Stevenson *et al. Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

WO00/42072 (Presta, L.) describes antibodies with improved ADCC function in the presence of human effector cells, where the antibodies comprise amino acid substitutions in the Fc region thereof. Preferably, the antibody with improved ADCC comprises substitutions at positions 298, 333, and/or 334 of the Fc region. Preferably the altered Fc region is a human IgG1 Fc region comprising or consisting of substitutions at one,
25 two or three of these positions.

Antibodies with altered C1q binding and/or complement dependent cytotoxicity (CDC) are described in WO99/51642, US Patent No. 6,194,551B1, US Patent No. 6,242,195B1, US Patent No. 6,528,624B1 and US Patent No. 6,538,124 (Idusogie *et al.*). The antibodies comprise an amino acid substitution at one or more of amino acid positions 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 and/or 334 of the Fc region thereof.

30 To increase the serum half life of the antibody, one may incorporate a salvage receptor binding epitope into the antibody (especially an antibody fragment) as described in US Patent 5,739,277, for example. As used herein, the term "salvage receptor binding epitope" refers to an epitope of the Fc region of an IgG molecule (*e.g.*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, or IgG₄) that is responsible for increasing the *in vivo* serum half-life of the IgG molecule.

Antibodies with improved binding to the neonatal Fc receptor (FcRn), and increased half-lives, are
35 described in WO00/42072 (Presta, L.). These antibodies comprise a Fc region with one or more substitutions therein which improve binding of the Fc region to FcRn. For example, the Fc region may have substitutions at one or more of positions 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 or 434. The preferred Fc region-comprising antibody variant with improved FcRn binding comprises amino acid substitutions at one, two or three of positions 307, 380 and 434 of the Fc region thereof.

5 Engineered antibodies with three or more (preferably four) functional antigen binding sites are also contemplated (US Appln No. US2002/0004587 A1, Miller *et al.*).

Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of the antibody are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared
10 variant or a non-variant version of the antibody.

(viii) Screening for antibodies with the desired properties

Techniques for generating antibodies have been described above. One may further select antibodies with certain biological characteristics, as desired.

15 To identify an antibody which blocks ligand activation of a HER receptor, the ability of the antibody to block HER ligand binding to cells expressing the HER receptor (*e.g.* in conjugation with another HER receptor with which the HER receptor of interest forms a HER hetero-oligomer) may be determined. For example, cells naturally expressing, or transfected to express, HER receptors of the HER hetero-oligomer may be incubated with the antibody and then exposed to labeled HER ligand. The ability of the antibody to block ligand binding
20 to the HER receptor in the HER hetero-oligomer may then be evaluated.

For example, inhibition of HRG binding to MCF7 breast tumor cell lines by HER2 antibodies may be performed using monolayer MCF7 cultures on ice in a 24-well-plate format essentially as described in WO01/00245. HER2 monoclonal antibodies may be added to each well and incubated for 30 minutes. ¹²⁵I-labeled rHRGβ1₁₇₇₋₂₂₄ (25 pm) may then be added, and the incubation may be continued for 4 to 16 hours.
25 Dose response curves may be prepared and an IC₅₀ value may be calculated for the antibody of interest. In one embodiment, the antibody which blocks ligand activation of a HER receptor will have an IC₅₀ for inhibiting HRG binding to MCF7 cells in this assay of about 50nM or less, more preferably 10nM or less. Where the antibody is an antibody fragment such as a Fab fragment, the IC₅₀ for inhibiting HRG binding to MCF7 cells in this assay may, for example, be about 100nM or less, more preferably 50nM or less.

30 Alternatively, or additionally, the ability of an antibody to block HER ligand-stimulated tyrosine phosphorylation of a HER receptor present in a HER hetero-oligomer may be assessed. For example, cells endogenously expressing the HER receptors or transfected to expressed them may be incubated with the antibody and then assayed for HER ligand-dependent tyrosine phosphorylation activity using an anti-phosphotyrosine monoclonal (which is optionally conjugated with a detectable label). The kinase receptor
35 activation assay described in U.S. Patent No. 5,766,863 is also available for determining HER receptor activation and blocking of that activity by an antibody.

In one embodiment, one may screen for an antibody which inhibits HRG stimulation of p180 tyrosine phosphorylation in MCF7 cells essentially as described in WO01/00245. For example, the MCF7 cells may be plated in 24-well plates and monoclonal antibodies to HER2 may be added to each well and incubated for 30

5 minutes at room temperature; then rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ may be added to each well to a final concentration of 0.2 nM, and the incubation may be continued for 8 minutes. Media may be aspirated from each well, and reactions may be stopped by the addition of 100 μ l of SDS sample buffer (5% SDS, 25 mM DTT, and 25 mM Tris-HCl, pH 6.8). Each sample (25 μ l) may be electrophoresed on a 4-12% gradient gel (Novex) and then electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membrane. Antiphosphotyrosine (at 1 μ g/ml) immunoblots may be developed, and the intensity of the predominant reactive band at M_r ~180,000 may be quantified by reflectance densitometry. The antibody selected will preferably significantly inhibit HRG stimulation of p180 tyrosine phosphorylation to about 0-35% of control in this assay. A dose-response curve for inhibition of HRG stimulation of p180 tyrosine phosphorylation as determined by reflectance densitometry may be prepared and an IC_{50} for the antibody of interest may be calculated. In one embodiment, the antibody which blocks ligand activation of a HER receptor will have an IC_{50} for inhibiting HRG stimulation of p180 tyrosine phosphorylation in this assay of about 50nM or less, more preferably 10nM or less. Where the antibody is an antibody fragment such as a Fab fragment, the IC_{50} for inhibiting HRG stimulation of p180 tyrosine phosphorylation in this assay may, for example, be about 100nM or less, more preferably 50nM or less.

One may also assess the growth inhibitory effects of the antibody on MDA-MB-175 cells, e.g., essentially as described in Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394 (1997). According to this assay, MDA-MB-175 cells may be treated with a HER2 monoclonal antibody (10 μ g/mL) for 4 days and stained with crystal violet. Incubation with a HER2 antibody may show a growth inhibitory effect on this cell line similar to that displayed by monoclonal antibody 2C4. In a further embodiment, exogenous HRG will not significantly reverse this inhibition. Preferably, the antibody will be able to inhibit cell proliferation of MDA-MB-175 cells to a greater extent than monoclonal antibody 4D5 (and optionally to a greater extent than monoclonal antibody 7F3), both in the presence and absence of exogenous HRG.

In one embodiment, the HER2 antibody of interest may block heregulin dependent association of HER2 with HER3 in both MCF7 and SK-BR-3 cells as determined in a co-immunoprecipitation experiment such as that described in WO01/00245 substantially more effectively than monoclonal antibody 4D5, and preferably substantially more effectively than monoclonal antibody 7F3.

To identify growth inhibitory HER2 antibodies, one may screen for antibodies which inhibit the growth of cancer cells which overexpress HER2. In one embodiment, the growth inhibitory antibody of choice is able to inhibit growth of SK-BR-3 cells in cell culture by about 20-100% and preferably by about 50-100% at an antibody concentration of about 0.5 to 30 μ g/ml. To identify such antibodies, the SK-BR-3 assay described in U.S. Patent No. 5,677,171 can be performed. According to this assay, SK-BR-3 cells are grown in a 1:1 mixture of F12 and DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, glutamine and penicillin streptomycin. The SK-BR-3 cells are plated at 20,000 cells in a 35mm cell culture dish (2mls/35mm dish). 0.5 to 30 μ g/ml of the HER2 antibody is added per dish. After six days, the number of cells, compared to untreated cells are counted using an electronic COULTER™ cell counter. Those antibodies which inhibit growth of the

5 SK-BR-3 cells by about 20-100% or about 50-100% may be selected as growth inhibitory antibodies. See US Pat No. 5,677,171 for assays for screening for growth inhibitory antibodies, such as 4D5 and 3E8.

10 In order to select for antibodies which induce apoptosis, an annexin binding assay using BT474 cells is available. The BT474 cells are cultured and seeded in dishes as discussed in the preceding paragraph. The medium is then removed and replaced with fresh medium alone or medium containing 10µg/ml of the
15 monoclonal antibody. Following a three day incubation period, monolayers are washed with PBS and detached by trypsinization. Cells are then centrifuged, resuspended in Ca^{2+} binding buffer and aliquoted into tubes as discussed above for the cell death assay. Tubes then receive labeled annexin (e.g. annexin V-FITC) (1µg/ml). Samples may be analyzed using a FACSCAN™ flow cytometer and FACSCONVERT™ CellQuest software (Becton Dickinson). Those antibodies which induce statistically significant levels of annexin binding relative to
20 control are selected as apoptosis-inducing antibodies. In addition to the annexin binding assay, a DNA staining assay using BT474 cells is available. In order to perform this assay, BT474 cells which have been treated with the antibody of interest as described in the preceding two paragraphs are incubated with 9µg/ml HOECHST 33342™ for 2 hr at 37°C, then analyzed on an EPICS ELITE™ flow cytometer (Coulter Corporation) using MODFIT LT™ software (Verity Software House). Antibodies which induce a change in the percentage of apoptotic cells which is 2 fold or greater (and preferably 3 fold or greater) than untreated cells (up to 100% apoptotic cells) may be selected as pro-apoptotic antibodies using this assay. See WO98/17797 for assays for screening for antibodies which induce apoptosis, such as 7C2 and 7F3.

25 To screen for antibodies which bind to an epitope on HER2 bound by an antibody of interest, a routine cross-blocking assay such as that described in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), can be performed to assess whether the antibody cross-blocks binding of an antibody, such as 2C4 or pertuzumab, to HER2. Alternatively, or additionally, epitope mapping can be performed by methods known in the art and/or one can study the antibody-HER2 structure (Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004)) to see what domain(s) of HER2 is/are bound by the antibody.

(ix) *Pertuzumab compositions*

30 In one embodiment, the HER2 antibody composition comprises a mixture of a main species pertuzumab antibody and one or more variants thereof. The preferred embodiment herein of a pertuzumab main species antibody is one comprising the variable light and variable heavy amino acid sequences in SEQ ID Nos. 3 and 4, and most preferably comprising a light chain amino acid sequence selected from SEQ ID No. 13 and 17, and a heavy chain amino acid sequence selected from SEQ ID No. 14 and 18 (including deamidated
35 and/or oxidized variants of those sequences). In one embodiment, the composition comprises a mixture of the main species pertuzumab antibody and an amino acid sequence variant thereof comprising an amino-terminal leader extension. Preferably, the amino-terminal leader extension is on a light chain of the antibody variant (e.g. on one or two light chains of the antibody variant). The main species HER2 antibody or the antibody variant may be an full length antibody or antibody fragment (e.g. Fab or F(ab')₂ fragments), but preferably both are full
40 length antibodies. The antibody variant herein may comprise an amino-terminal leader extension on any one or

5 more of the heavy or light chains thereof. Preferably, the amino-terminal leader extension is on one or two light chains of the antibody. The amino-terminal leader extension preferably comprises or consists of VHS-. Presence of the amino-terminal leader extension in the composition can be detected by various analytical techniques including, but not limited to, N-terminal sequence analysis, assay for charge heterogeneity (for instance, cation exchange chromatography or capillary zone electrophoresis), mass spectrometry, etc. The amount of the antibody variant in the composition generally ranges from an amount that constitutes the detection limit of any assay (preferably N-terminal sequence analysis) used to detect the variant to an amount less than the amount of the main species antibody. Generally, about 20% or less (e.g. from about 1% to about 15%, for instance from 5% to about 15%) of the antibody molecules in the composition comprise an amino-terminal leader extension. Such percentage amounts are preferably determined using quantitative N-terminal sequence analysis or cation exchange analysis (preferably using a high-resolution, weak cation-exchange column, such as a PROPAC WCX-10™ cation exchange column). Aside from the amino-terminal leader extension variant, further amino acid sequence alterations of the main species antibody and/or variant are contemplated, including but not limited to an antibody comprising a C-terminal lysine residue on one or both heavy chains thereof, a deamidated antibody variant, etc.

20 Moreover, the main species antibody or variant may further comprise glycosylation variations, non-limiting examples of which include antibody comprising a G1 or G2 oligosaccharide structure attached to the Fc region thereof, antibody comprising a carbohydrate moiety attached to a light chain thereof (e.g. one or two carbohydrate moieties, such as glucose or galactose, attached to one or two light chains of the antibody, for instance attached to one or more lysine residues), antibody comprising one or two non-glycosylated heavy chains, or antibody comprising a sialidated oligosaccharide attached to one or two heavy chains thereof etc.

25 The composition may be recovered from a genetically engineered cell line, e.g. a Chinese Hamster Ovary (CHO) cell line expressing the HBR2 antibody, or may be prepared by peptide synthesis.

(x) *Immunoconjugates*

30 The invention also pertains to immunoconjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, toxin (e.g. a small molecule toxin or an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant or animal origin, including fragments and/or variants thereof), or a radioactive isotope (i.e., a radioconjugate).

35 Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates have been described above. Conjugates of an antibody and one or more small molecule toxins, such as a calicheamicin, a maytansine (U.S. Patent No. 5,208,020), a trichothene, and CC1065 are also contemplated herein.

In one preferred embodiment of the invention, the antibody is conjugated to one or more maytansine molecules (e.g. about 1 to about 10 maytansine molecules per antibody molecule). Maytansine may, for example, be converted to May-SS-Me which may be reduced to May-SH3 and reacted with modified antibody (Chari *et al. Cancer Research* 52: 127-131 (1992)) to generate a maytansinoid-antibody immunoconjugate.

5 Another immunoconjugate of interest comprises an antibody conjugated to one or more calicheamicin molecules. The calicheamicin family of antibiotics are capable of producing double-stranded DNA breaks at sub-picomolar concentrations. Structural analogues of calicheamicin which may be used include, but are not limited to, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetyl- γ_1^1 , PSAG and θ^1 (Hinman *et al. Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993) and Lode *et al. Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)). See, also, US Patent Nos. 5,714,586; 5,712,374; 10 5,264,586; and 5,773,001 expressly incorporated herein by reference.

Enzymatically active toxins and fragments thereof which can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolaca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin and the tricothecenes. See, for 15 example, WO 93/21232 published October 28, 1993.

The present invention further contemplates an immunoconjugate formed between an antibody and a compound with nucleolytic activity (*e.g.* a ribonuclease or a DNA endonuclease such as a deoxyribonuclease; DNase).

20 A variety of radioactive isotopes are available for the production of radioconjugated HER2 antibodies. Examples include Al^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{213} , P^{32} and radioactive isotopes of Lu.

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent may be made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such 25 as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta *et al. Science* 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of 30 radionucleotide to the antibody. See WO94/11026. The linker may be a "cleavable linker" facilitating release of the cytotoxic drug in the cell. For example, an acid-labile linker, peptidase-sensitive linker, dimethyl linker or disulfide-containing linker (Chari *et al. Cancer Research* 52: 127-131 (1992)) may be used.

35 Alternatively, a fusion protein comprising the antibody and cytotoxic agent may be made, *e.g.* by recombinant techniques or peptide synthesis.

Other immunoconjugates are contemplated herein. For example, the antibody may be linked to one of a variety of nonproteinaceous polymers, *e.g.*, polyethylene glycol, polypropylene glycol, polyoxyalkylenes, or copolymers of polyethylene glycol and polypropylene glycol. The antibody also may be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization (for example,

5 hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively), in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules), or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

10 The antibodies disclosed herein may also be formulated as immunoliposomes. Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545; and WO97/38731 published October 23, 1997. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556.

15 Particularly useful liposomes can be generated by the reverse phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of the antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in Martin *et al.* *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) via a disulfide interchange reaction. A chemotherapeutic agent is optionally contained within the liposome. See Gabizon *et al.* *J. National Cancer Inst.* 81(19)1484 (1989).

20 IV. Pharmaceutical Formulations

25 Therapeutic formulations of the antibodies used in accordance with the present invention are prepared for storage by mixing an antibody having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Oslo, A. Ed. (1980)), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (*e.g.* Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEENTM, PLURONICSTM or polyethylene glycol (PEG). Lyophilized antibody formulations are described in WO 97/04801, expressly incorporated herein by reference. The preferred pertuzumab formulation for therapeutic use comprises 30mg/mL pertuzumab in 20mM histidine acetate, 120mM sucrose, 0.02% polysorbate 20, at pH 6.0. An alternate pertuzumab formulation comprises 25 mg/mL pertuzumab, 10 mM histidine-HCl buffer, 240 mM sucrose, 0.02% polysorbate 20, pH 6.0.

5 The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Various drugs which can be combined with the HER inhibitor are described in the method of treatment section below. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

10 The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

15 Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, e.g. films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and γ ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-
20 vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

25 V. Treatment with HER Inhibitors

A patient with an expression profile as noted above, is a candidate for therapy with a HER inhibitor, such as pertuzumab. Examples of various cancers that can be treated are listed in the definitions section above. The method is considered particularly applicable for therapy of ovarian, peritoneal or fallopian tube cancer; breast cancer, including metastatic breast cancer (MBC), non-HER2 overexpressing breast cancer; and non-
30 small cell lung cancer (NSCLC). In one embodiment, the cancer which is treated is chemotherapy-resistant cancer or platinum-resistant cancer. Treatment of the patient with the expression profile will result in an improvement in the signs or symptoms of cancer. For instance, such therapy may result in an improvement in survival (overall survival and/or progression free survival) relative to a patient without the expression profile, and/or may result in an objective clinical response (partial or complete).

35 Aside from cancer, the HER inhibitors may be used to treat various non-malignant diseases or disorders with the above-noted expression profiles. Such non-malignant diseases or disorders include autoimmune disease (e.g. psoriasis; see definition above); endometriosis; scleroderma; restenosis; polyps such as colon polyps, nasal polyps or gastrointestinal polyps; fibroadenoma; respiratory disease (see definition above); cholecystitis; neurofibromatosis; polycystic kidney disease; inflammatory diseases; skin disorders including psoriasis and

63

5 dermatitis; vascular disease (see definition above); conditions involving abnormal proliferation of vascular
epithelial cells; gastrointestinal ulcers; Menetrier's disease, secreting adenomas or protein loss syndrome; renal
disorders; angiogenic disorders; ocular disease such as age related macular degeneration, presumed ocular
histoplasmosis syndrome, retinal neovascularization from proliferative diabetic retinopathy, retinal
vascularization, diabetic retinopathy, or age related macular degeneration; bone associated pathologies such as
10 osteoarthritis, rickets and osteoporosis; damage following a cerebral ischemic event; fibrotic or edema diseases
such as hepatic cirrhosis, lung fibrosis, carcoidosis, thyroiditis, hyperviscosity syndrome systemic, Osler Weber-
Rendu disease, chronic occlusive pulmonary disease, or edema following burns, trauma, radiation, stroke,
hypoxia or ischemia; hypersensitivity reaction of the skin; diabetic retinopathy and diabetic nephropathy;
Guillain-Barre syndrome; graft versus host disease or transplant rejection; Paget's disease; bone or joint
15 inflammation; photoaging (e.g. caused by UV radiation of human skin); benign prostatic hypertrophy; certain
microbial infections including microbial pathogens selected from adenovirus, hantaviruses, Borrelia burgdorferi,
Yersinia spp. and Bordetella pertussis; thrombus caused by platelet aggregation; reproductive conditions such as
endometriosis, ovarian hyperstimulation syndrome, preeclampsia, dysfunctional uterine bleeding, or
menometrorrhagia; synovitis; atheroma; acute and chronic nephropathies (including proliferative
20 glomerulonephritis and diabetes-induced renal disease); eczema; hypertrophic scar formation; endotoxic shock
and fungal infection; familial adenomatosis polyposis; neurodegenerative diseases (e.g. Alzheimer's disease,
AIDS-related dementia, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, retinitis pigmentosa, spinal muscular
atrophy and cerebellar degeneration); myelodysplastic syndromes; aplastic anemia; ischemic injury; fibrosis of
the lung, kidney or liver; T-cell mediated hypersensitivity disease; infantile hypertrophic pyloric stenosis; urinary
25 obstructive syndrome; psoriatic arthritis; and Hashimoto's thyroiditis. Preferred non-malignant indications for
therapy herein include psoriasis, endometriosis, scleroderma, vascular disease (e.g. restenosis, arteriosclerosis,
coronary artery disease, or hypertension), colon polyps, fibroadenoma or respiratory disease (e.g. asthma,
chronic bronchitis, bronchiectasis or cystic fibrosis).

30 Preferably, the antibody administered is a naked antibody. However, the antibody administered may be
conjugated with a cytotoxic agent. Preferably, the immunoconjugate and/or antigen to which it is bound is/are
internalized by the cell, resulting in increased therapeutic efficacy of the immunoconjugate in killing the cancer
cell to which it binds. In a preferred embodiment, the cytotoxic agent targets or interferes with nucleic acid in
the cancer cell. Examples of such cytotoxic agents include maytansinoids, calicheamicins, ribonucleases and
DNA endonucleases.

35 The HER2 inhibitor is administered to a human patient in accord with known methods, such as
intravenous administration, e.g., as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular,
intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or
inhalation routes. Intravenous administration of the antibody is preferred.

40 For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of HER inhibitor will depend on the
type of disease to be treated, as defined above, the severity and course of the disease, whether the drug is

5 administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the drug, and the discretion of the attending physician. The HER inhibitor is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments. Depending on the type and severity of the disease, about 1 μ g/kg to 50 mg/kg (e.g. 0.1-20mg/kg) of HER inhibitor is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. The preferred
10 dosage of a HER antibody will be in the range from about 0.05mg/kg to about 10mg/kg. Thus, one or more doses of about 0.5mg/kg, 2.0mg/kg, 4.0mg/kg or 10mg/kg (or any combination thereof) may be administered to the patient. Such doses may be administered intermittently, e.g. every week or every three weeks (e.g. such that the patient receives from about two to about twenty, e.g. about six doses of the HER antibody). An initial higher loading dose, followed by one or more lower doses may be administered. In one embodiment, a HER antibody is
15 administered as a loading dose of approximately 840 mg followed by approximately 420 mg approximately every 3 weeks. In another embodiment, a HER antibody is administered as a dose of approximately 1050 mg administered approximately every 3 weeks.

Where the disease is cancer, the patient is preferably treated with a combination of the HER inhibitor, and one or more chemotherapeutic agent(s). Preferably at least one of the chemotherapeutic agents is an
20 antimetabolite chemotherapeutic agent such as gemcitabine. The combined administration includes coadministration or concurrent administration, using separate formulations or a single pharmaceutical formulation, and consecutive administration in either order, wherein preferably there is a time period while both (or all) active agents simultaneously exert their biological activities. Thus, the antimetabolite chemotherapeutic agent may be administered prior to, or following, administration of the HER inhibitor. In this embodiment, the
25 timing between at least one administration of the antimetabolite chemotherapeutic agent and at least one administration of the HER inhibitor is preferably approximately 1 month or less, and most preferably approximately 2 weeks or less. Alternatively, the antimetabolite chemotherapeutic agent and the HER inhibitor are administered concurrently to the patient, in a single formulation or separate formulations. Treatment with the combination of the chemotherapeutic agent (e.g. antimetabolite chemotherapeutic agent such as gemcitabine)
30 and the HER inhibitor (e.g. pertuzumab) may result in a synergistic, or greater than additive, therapeutic benefit to the patient.

An antimetabolite chemotherapeutic agent, if administered, is usually administered at dosages known therefor, or optionally lowered due to combined action of the drugs or negative side effects attributable to administration of the antimetabolite chemotherapeutic agent. Preparation and dosing schedules for such
35 chemotherapeutic agents may be used according to manufacturers' instructions or as determined empirically by the skilled practitioner. Where the antimetabolite chemotherapeutic agent is gemcitabine, preferably, it is administered at a dose between about 600mg/m² to 1250mg/m² (for example approximately 1000mg/m²), for instance, on days 1 and 8 of a 3-week cycle.

Aside from the HER inhibitor and antimetabolite chemotherapeutic agent, other therapeutic regimens
40 may be combined therewith. For example, a second (third, fourth, etc) chemotherapeutic agent(s) may be

5 administered, wherein the second chemotherapeutic agent is either another, different antimetabolite
chemotherapeutic agent, or a chemotherapeutic agent that is not an antimetabolite. For example, the second
chemotherapeutic agent may be a taxane (such as Paclitaxel or Docetaxel), capecitabine, or platinum-based
chemotherapeutic agent (such as Carboplatin, Cisplatin, or Oxaliplatin), anthracycline (such as doxorubicin,
10 including, liposomal doxorubicin), topotecan, pemetrexed, vinca alkaloid (such as vinorelbine), and TLK 286.
"Cocktails" of different chemotherapeutic agents may be administered.

Other therapeutic agents that may be combined with the HER inhibitor include any one or more of: a
second, different HER inhibitor (for example, a growth inhibitory HER2 antibody such as trastuzumab, or a
HER2 antibody which induces apoptosis of a HER2-overexpressing cell, such as 7C2, 7F3 or humanized
variants thereof); an antibody directed against a different tumor associated antigen, such as EGFR, HER3,
15 HER4; anti-hormonal compound, e.g., an anti-estrogen compound such as tamoxifen, or an aromatase inhibitor;
a cardioprotectant (to prevent or reduce any myocardial dysfunction associated with the therapy); a cytokine; an
EGFR-targeted drug (such as TARCEVA®, IRESSA® or Cetuximab); an anti-angiogenic agent (especially
Bevacizumab sold by Genentech under the trademark AVASTIN™); a tyrosine kinase inhibitor; a COX
inhibitor (for instance a COX-1 or COX-2 inhibitor); non-steroidal anti-inflammatory drug, Celecoxib
20 (CELEBREX®); farnesyl transferase inhibitor (for example, Tipifarnib/ZARNESTRA® R115777 available
from Johnson and Johnson or Lonafarnib SCH66336 available from Schering-Plough); antibody that binds
oncofetal protein CA 125 such as Oregovomab (MoAb B43.13); HER2 vaccine (such as HER2 AutoVac
vaccine from Pharmexia, or APC8024 protein vaccine from Dendreon, or HER2 peptide vaccine from
GSK/Corixa); another HER targeting therapy (e.g. trastuzumab, cetuximab, gefitinib, erlotinib, CI1033,
25 GW2016 etc); Raf and/or ras inhibitor (see, for example, WO 2003/86467); Doxil; Topotecan; taxane;
GW572016; TLK286; EMD-7200; a medicament that treats nausea such as a serotonin antagonist, steroid, or
benzodiazepine; a medicament that prevents or treats skin rash or standard acne therapies, including topical or
oral antibiotic; a body temperature-reducing medicament such as acetaminophen, diphenhydramine, or
meperidine; hematopoietic growth factor, etc.

30 Suitable dosages for any of the above coadministered agents are those presently used and may be
lowered due to the combined action (synergy) of the agent and HER inhibitor.

In addition to the above therapeutic regimes, the patient may be subjected to surgical removal of cancer
cells and/or radiation therapy.

Aside from administration of the antibody protein to the patient, the present application contemplates
35 administration of an antibody or protein inhibitor by gene therapy. See, for example, WO96/07321 published
March 14, 1996 concerning the use of gene therapy to generate intracellular antibodies.

There are two major approaches to getting the nucleic acid (optionally contained in a vector) into the
patient's cells; *in vivo* and *ex vivo*. For *in vivo* delivery the nucleic acid is injected directly into the patient,
usually at the site where the antibody is required. For *ex vivo* treatment, the patient's cells are removed, the

5 nucleic acid is introduced into these isolated cells and the modified cells are administered to the patient either directly or, for example, encapsulated within porous membranes which are implanted into the patient (see, e.g. U.S. Patent Nos. 4,892,538 and 5,283,187). There are a variety of techniques available for introducing nucleic acids into viable cells. The techniques vary depending upon whether the nucleic acid is transferred into cultured cells *in vitro*, or *in vivo* in the cells of the intended host. Techniques suitable for the transfer of nucleic acid into mammalian cells *in vitro* include the use of liposomes, electroporation, microinjection, cell fusion, DEAE-dextran, the calcium phosphate precipitation method, etc. A commonly used vector for *ex vivo* delivery of the gene is a retrovirus.

15 The currently preferred *in vivo* nucleic acid transfer techniques include transfection with viral vectors (such as adenovirus, Herpes simplex I virus, or adeno-associated virus) and lipid-based systems (useful lipids for lipid-mediated transfer of the gene are DOTMA, DOPE and DC-Chol, for example). In some situations it is desirable to provide the nucleic acid source with an agent that targets the target cells, such as an antibody specific for a cell surface membrane protein or the target cell, a ligand for a receptor on the target cell, etc. Where liposomes are employed, proteins which bind to a cell surface membrane protein associated with endocytosis may be used for targeting and/or to facilitate uptake, e.g. capsid proteins or fragments thereof tropic for a particular cell type, antibodies for proteins which undergo internalization in cycling, and proteins that target intracellular localization and enhance intracellular half-life. The technique of receptor-mediated endocytosis is described, for example, by Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987); and Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3410-3414 (1990). For review of the currently known gene marking and gene therapy protocols see Anderson *et al.*, *Science* 256:808-813 (1992). See also WO 93/25673 and the references cited therein.

VL Deposit of Materials

The following hybridoma cell lines have been deposited with the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

Antibody Designation	ATCC No.	Deposit Date
7C2	ATCC HB-12215	October 17, 1996
7F3	ATCC HB-12216	October 17, 1996
4D5	ATCC CRL 10463	May 24, 1990
2C4	ATCC HB-12697	April 8, 1999

Further details of the invention are illustrated by the following non-limiting Examples. The disclosures of all citations in the specification are expressly incorporated herein by reference.

67

Example 1

Gene expression profile associated with HER2 phosphorylation

Fresh ovarian tumor specimens from ovarian cancer patients treated with pertuzumab were profiled for gene expression using AFFYMETRIX® microarray analysis for a subset of selected genes. AFFYMETRIX® microarray analysis was performed according to the manufacturer's instructions.

The microarray expression data was analyzed to identify gene patterns which would be associated with HER2 phosphorylation status. Remarkably, a pattern emerged where tumors with relatively high levels of expression of EGFR, HER2, HER3, and the HER ligand betacellulin were also positive for HER2 phosphorylation. Fig. 10 shows a unsupervised clustering of the tumors with the aforementioned genes resulting in six of the six phosphorylation positive tumors clustering together. Fig. 11 shows that one can predict the phosphorylation status of the ovarian tumors by using an algorithm where a sample is predicted positive that has betacellulin and HER2 expression at the median or above and/or EGFR and/or HER3 expression at the median or above. The correlation was positive in six of the six HER2 phosphorylation positive cases, and none of the HER2 phosphorylation negative cases were predicted positive using microarray expression data as the basis for the algorithm.

In a second analysis, prediction of HER2 phosphorylation status was achieved by using a single gene only, namely betacellulin. Fig 12 shows that all six HER2 phosphorylation positive tumors had a betacellulin expression above the median, again using microarray expression data.

Example 2

Comparison of microarray analysis and qRT-PCR for measuring gene expression

In this example, a second method for quantifying gene expression, quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR), was used to validate, and was compared with, the microarray data. qRT-PCR would be a preferred method for measuring gene expression in the typical patient sample available in a clinical setting. Diagnostic technology platforms are already established for this method.

qRT-PCR was performed as described in Cronin *et al.*, *Am. J. Pathol.* 164(1):35-42 (2004); and Ma *et al.*, *Cancer Cell* 5:607-616 (2004). RNA was extracted from frozen ovarian tumors using commercially available reagents from Qiagen, Valencia, California. Primers and probes for TAQMAN™ qRT-PCR analysis were designed to give amplicon lengths of about 100 bases or less. Transcripts were quantitated by qRT-PCR using a TAQMAN™ instrument (Applied BioSystems), with expression levels of the test genes normalized to those of the reference genes. Fig. 13 shows the basic characteristics of the qRT-PCR assays established. The "house keeping" gene GUS was selected as the control gene because of its low variance and high expression.

To first validate the microarray measurements, the qRT-PCR results were compared to those obtained by microarray to evaluate whether a close correlation existed, and to determine whether one could predict HER2

5 phosphorylation by this alternate method also. For all comparisons of the genes discussed above, good correlations have been achieved.

Fig. 14 shows an unsupervised clustering of the tumors with EGFR, HER2, HER3 and betacellulin. Five of the six phosphorylation positive tumors clustered together using qRT-PCR data.

10 Fig. 15 shows that one can predict the phosphorylation status of the ovarian tumors by using an algorithm where a sample is predicted positive that has betacellulin and HER2 expression at the median or above and/or EGFR and/or HER3 expression at the median or above. The correlation was positive in four of the six
G HER2 phosphorylation positive cases. Only five of the nineteen HER2 phosphorylation negative cases were predicted being positive using qRT-PCR expression data as the basis for the algorithm.

15 In a second analysis depicted in Fig. 16, prediction of HER2 phosphorylation status was achieved using a single gene only, namely betacellulin. As shown in this figure, five out of six HER2 phosphorylation positive tumors had betacellulin expression above the median, again using qRT-PCR expression data.

By evaluating further HER ligands, namely epiregulin, amphiregulin and TGF-alpha, amphiregulin was identified as a second ligand with similar utility to betacellulin in correlating with HER2 phosphorylation status.
20 See Fig. 17.

Example 3

Therapy of patients with a gene expression profile associated with HER2 phosphorylation

Q Examples 1 and 2 above demonstrate that gene expression profiles can be used as a surrogate for HER2 phosphorylation. In this example, patients with tumors that have a specific gene expression profile associated with HER2 phosphorylation are treated with the HER inhibitor, pertuzumab.

qRT-PCR is performed as described in Cronin *et al.*, *Am. J. Pathol.* 164(1):35-42 (2004); and Ma *et al.*, *Cancer Cell* 5:607-616 (2004). RNA is extracted from frozen ovarian tumors using commercially available reagents from Qiagen, Valencia, California. Primers and probes for TAQMANTM qRT-PCR analysis are designed to give amplicon lengths of about 100 bases or less. Transcripts are quantitated by qRT-PCR using a
30 TAQMANTM instrument (Applied BioSystems), with expression levels of the test genes normalized to those of the reference genes.

An algorithm has been developed based on gene expression profiling data of tumors in Examples 1 and 2 with known HER2 phosphorylation status by ELISA. A tumor is deemed positive for a gene expression profile associated with HER2 phosphorylation that has betacellulin or amphiregulin and HER2 expression at the median or above and/or EGFR and/or HER3 expression at the median or above. Alternatively, expression of
35 betacellulin or amphiregulin alone can be measured by qRT-PCR to identify tumors with predicted phosphorylation of HER2.

5 Patients who have progressed while receiving a platinum-based chemotherapy regimen, or patients who have progressed within 6 months after completing a platinum-based regimen, will be eligible for this study. Patients will be randomized to either receive gemcitabine in combination with pertuzumab, or gemcitabine in combination with placebo.

10 Gemcitabine will be administered at 1000mg/m² on days 1 and 8 of a 21 day cycle for a maximum of 8 cycles. Gemcitabine will be infused first over 30 minutes. Dose reductions will be permitted for toxicity. Placebo or pertuzumab will be administered on day 1 of the 21 day cycle. Subjects randomized to receive pertuzumab will be administered an initial loading dose of 840 mg (Cycle 1) followed by 420 mg in Cycles 2 and beyond. Subjects randomized to receive placebo will be administered placebo in the same volume as administered with pertuzumab arm for Cycle 1, Cycles 2 and beyond. After 8 cycles of gemcitabine, pertuzumab or placebo will continue for up to 9 additional cycles (1 year total).

15 Patients will have standard gemcitabine dose reduction and held doses as a result of cytopenias. pertuzumab will also be held for any held Day 1 gemcitabine doses. Subsequent doses will be at the reduced doses and will not be increased. If dose reduction or holding a dose is required in more than 4 occasions, or if doses are held for more than 3 weeks, then gemcitabine will be discontinued and with the approval of the treating physician and medical monitor, blinded drug may be continued until disease progression. If Day 8 gemcitabine doses are held, then the Day 8 dose will be omitted and the subsequent treatment will commence with the next cycle (Day 22 of the previous cycle).

Gemcitabine will be held and dose reduced as recommended by the following table:

25

Absolute Granulocyte Count (x10 ⁶ /L)	Platelet Count (x10 ⁶ /L)	% full dose
>1000	>100,000	100
500-999	50,000-99,000	75
<500	<50,000	Hold

30 Subsequent doses for any patient requiring dose reduction will be at the reduced dose. If doses are held for more than 3 weeks as a result of cytopenias, patients will be assume to have unacceptable toxicity and will discontinue gemcitabine. If there are no other additional grade III or IV toxicities, continuation of blinded drug will be at the discretion of the physician and medical monitor. Hematological toxicity of gemcitabine has been related to rate of dose administration. Gemcitabine will be given over 30 minutes regardless of total dose. The use of colony-stimulating agents for NCI-CTC Grade 2 cytopenias may be used at the discretion of the treating physician. The option for crossover to single agent pertuzumab will be offered. A loading dose of 840mg will be administered at the next cycle due with continuation of 420mg with subsequent cycles every 21 days.

5 Response will be assessed at Cycles 3, 5, 7, 9, 13 and 17. Measurable disease will be assessed using the Response Evaluation Criteria for Solid Tumors (RECIST), by clinical evaluation and CT scan or equivalent. Response for subjects with evaluable disease will be assessed according to changes to CA-125 and clinical and radiologic evidence of disease. Responses should be confirmed 4-8 weeks after the initial documentation of response.

10 The following outcome measures will be assessed.

Primary Efficacy Endpoint

Progression free survival, as determined by investigator assessment using RECIST or CA-125 changes, following initiation of assigned study treatment of all subjects in each arm.

Secondary Efficacy Endpoints

15 Objective response (partial response, PR or complete response, CR)

Duration of response

Survival time

Freedom from progression at 4 months

Time to symptom improvement as assessed by FOSI

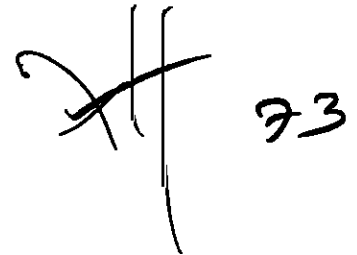
20 To prevent or treat possible nausea and vomiting, the patient may be premedicated with serotonin antagonists, steroids, and/or benzodiazepines. To prevent or treat possible rash, standard acne therapies, including topical and/or oral antibiotics may be used. Other possible concomitant medications are any prescription medications or over-the-counter preparations used by a subject in the interval beginning 7 days prior to Day 1 and continuing through the last day of the follow-up period. Subjects who experience infusion-associated temperature elevations to $>38.5^{\circ}\text{C}$ or other infusion-associated symptoms may be treated
25 symptomatically with acetaminophen, diphenhydramine, or meperidine. Non-experimental hematopoietic growth factors may be administered for NCI-CTC Grade 2 cytopenias.

The patient treated as described above will show improvement in the signs or symptoms of ovarian cancer, primary peritoneal carcinoma or fallopian tube carcinoma as evaluated by any one or more of the
30 primary or secondary efficacy endpoints. Patients with a gene expression profile associated with HER2 phosphorylation will show a greater clinical benefit from treatment with pertuzumab compared to patients who do not have this expression profile.

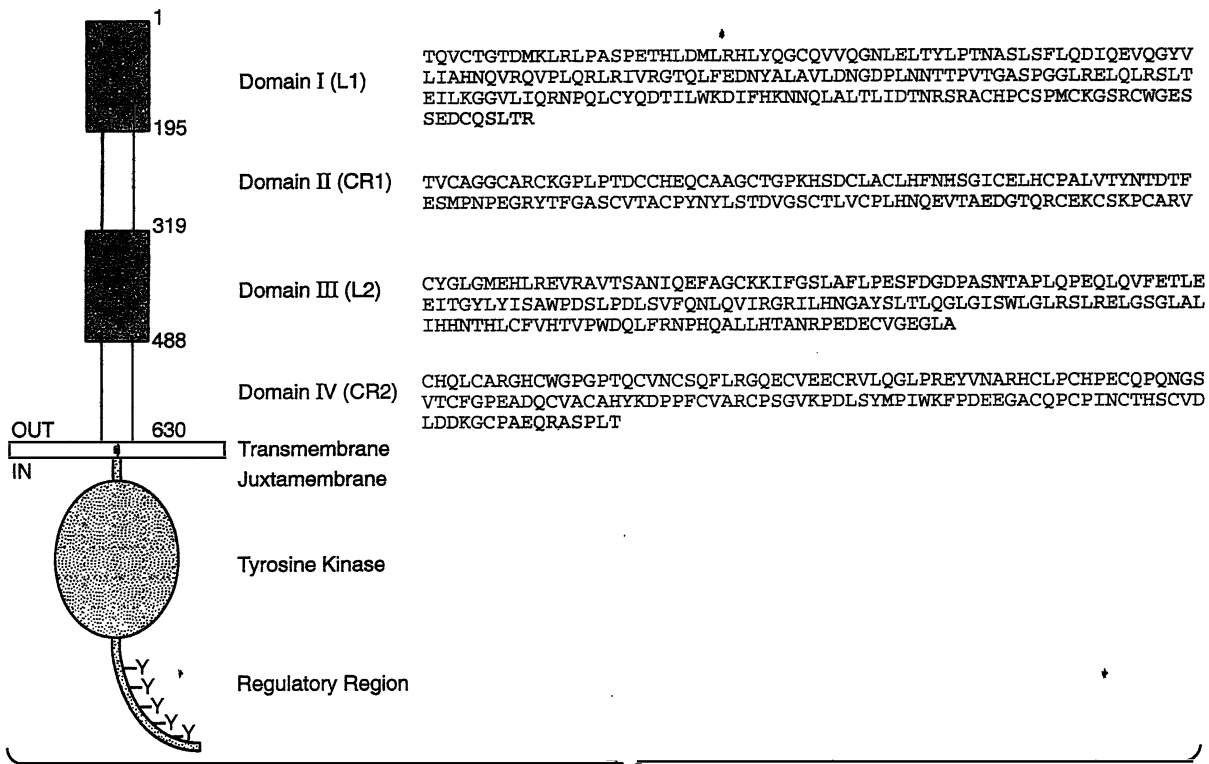
5 What is claimed is:

1. A method for treating cancer comprising administering to a patient a HER inhibitor in an amount effective to treat the cancer, wherein a tumor sample from the patient expresses two or more HER receptors and one or more HER ligand.
2. The method of claim 1 wherein the HER receptors are selected from the group consisting of EGFR, HER2, and HER3.
3. The method of claim 2 wherein the HER receptors are EGFR and HER2.
4. The method of claim 2 wherein the HER receptors are HER2 and HER3.
5. The method of any one of the preceding claims wherein the HER ligand is selected from the group consisting of betacellulin, amphiregulin, epiregulin, and TGF- α .
6. The method of claim 5 wherein the HER ligand is betacellulin.
7. The method of claim 5 wherein the HER ligand is amphiregulin.
8. The method of any one of the preceding claims wherein the tumor sample expresses HER2 and EGFR or HER3, as well as betacellulin or amphiregulin.
9. The method of claim 8 wherein the tumor sample expresses HER2 and EGFR, as well as betacellulin.
10. The method of any one of the preceding claims wherein the HER inhibitor is a HER dimerization inhibitor.
11. The method of any one of the preceding claims wherein the HER inhibitor is a HER antibody.
12. The method of claim 11 wherein the HER antibody is a HER2 antibody.
13. The method of claim 12 wherein the HER2 antibody binds to Domain II of HER2 extracellular domain.
14. The method of claim 13 wherein the HER2 antibody is pertuzumab.
15. The method of any one of claims 11 to 14 wherein the HER antibody is a naked antibody.
16. The method of any one of claims 11 to 15 wherein the HER antibody is an intact antibody.
17. The method of any one of claims 11 to 15 wherein the HER2 antibody is an antibody fragment comprising an antigen binding region.
18. The method of claim 1 wherein expression is determined by quantifying mRNA encoding the HER receptor or ligand.
19. The method of claim 18 wherein mRNA is quantified using polymerase chain reaction (PCR).
20. The method of claim 19 wherein the PCR is quantitative real time PCR (qRT-PCR).

- 5 21. The method of any one of the preceding claims wherein the tumor sample is a fixed tumor sample
22. The method of claim 21 wherein the tumor sample is a formalin fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor sample.
- 10 23. The method of any one of claims 1 to 20 wherein the tumor sample is a frozen tumor sample.
24. The method of any one of the preceding claims wherein expression of the HER receptors and HER ligand is at the median or above.
25. The method of any one of the preceding claims wherein the cancer is ovarian, peritoneal, or fallopian tube cancer.
- 15 26. The method of any one of claims 1 to 24 wherein the cancer is metastatic breast cancer (MBC).
27. The method of any one of claims 1 to 24 wherein the cancer is non-small cell lung cancer (NSCLC).
28. The method of any one of the preceding claims further comprising administering a chemotherapeutic agent to the patient.
- 20 29. The method of claim 28 wherein the chemotherapeutic agent is an antimetabolite chemotherapeutic agent.
30. The method of claim 29 wherein the antimetabolite chemotherapeutic agent is gemcitabine.
- 25 31. A method for treating cancer comprising administering to a patient a HER inhibitor in an amount effective to treat the cancer, wherein a tumor sample from the patient expresses betacellulin or amphiregulin.
32. The method of claim 31 wherein the HER inhibitor inhibits heterodimerization of HER2 with EGFR or HER3.
- 30 33. A method for treating cancer, comprising administering to a patient a HER2 antibody that binds to Domain II of HER2 in an amount effective to treat the cancer, wherein a tumor sample from the patient expresses HER2 and EGFR or HER3, as well as betacellulin or amphiregulin.
34. The method of claim 33 that binds to the junction between domains I, II and III of HER2.
- 35 35. A method of assessing HER phosphorylation or activation in a biological sample, comprising determining expression of two or more HER receptors and one or more HER ligand in the sample, wherein expression of the two or more HER receptors and one or more HER ligand indicates HER phosphorylation or activation in the sample.
36. The method of claim 35 wherein the sample is a paraffin-embedded, formalin fixed tumor



- 5 sample.
37. A method of assessing HER phosphorylation or activation in a biological sample, comprising determining expression of betacellulin or amphiregulin in the sample, wherein expression of betacellulin or amphiregulin indicates HER phosphorylation or activation in the sample.
- 10 38. A method of identifying a patient for therapy with a HER dimerization inhibitor comprising determining expression of two or more HER receptors and one or more HER ligand in a sample from the patient, wherein expression of the HER receptors and HER ligand indicates the patient is likely to respond to therapy with the HER dimerization inhibitor.
39. The method of claim 38 wherein the patient is a cancer patient.
- 15 40. A method for treating ovarian cancer comprising administering to a patient a HER inhibitor in an amount effective to treat the ovarian cancer, wherein a tumor sample from the patient expresses betacellulin or amphiregulin.
41. The method of claim 40 wherein the tumor sample further expresses two or more HER receptors.



WO 2006/063042

1 / 19

PCT/US2005/044247

AS: 103894

2 / 19

Variable Light

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

FIG. 2A

Variable Heavy

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

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

FIG. 2B

3 / 19

Amino Acid Sequence for Pertuzumab Light Chain

1 10 20 30 40 50 60
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP
70 80 90 100 110 120
RFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
130 140 150 160 170 180
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
190 200 210
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 3A**Amino Acid Sequence for Pertuzumab Heavy Chain**

1 10 20 30 40 50 60
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY
70 80 90 100 110 120
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSA
130 140 150 160 170 180
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
190 200 210 220 230 240
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
250 260 270 280 290 300
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQYNS
310 320 330 340 350 360
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
370 380 390 400 410 420
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
430 440 448
QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

FIG. 3B

Ligand-activated EGFR Heterodimerizes with HER2 2C4 Binds at the Heterodimeric Binding Site

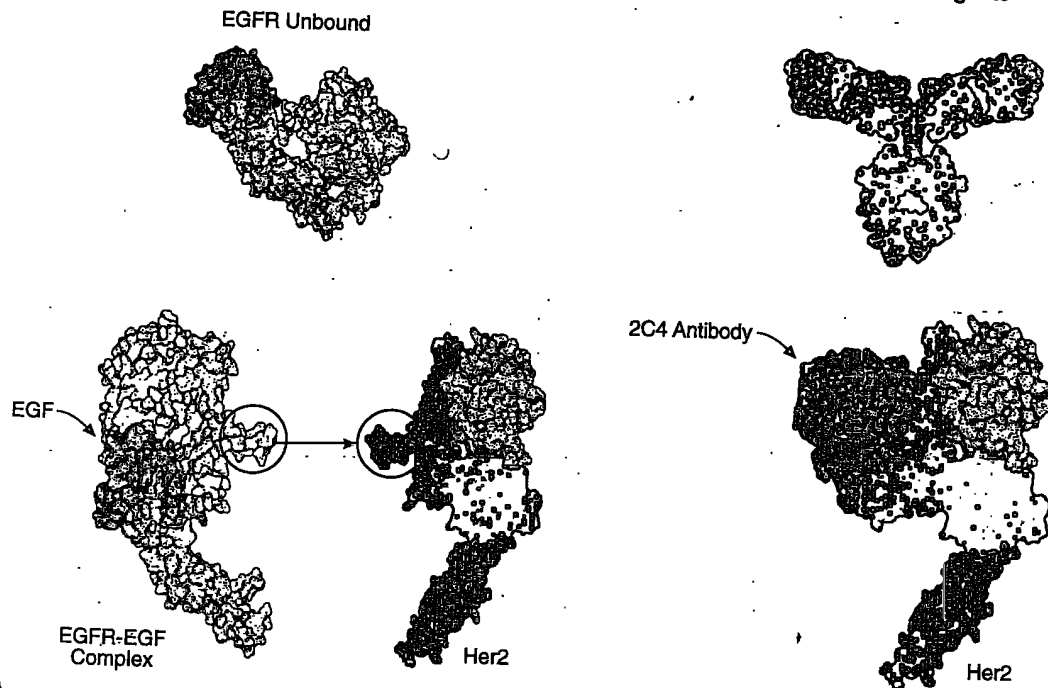


FIG. 4

[Handwritten signature]

Coupling of HER2/3 to the MAPK and Akt Pathways

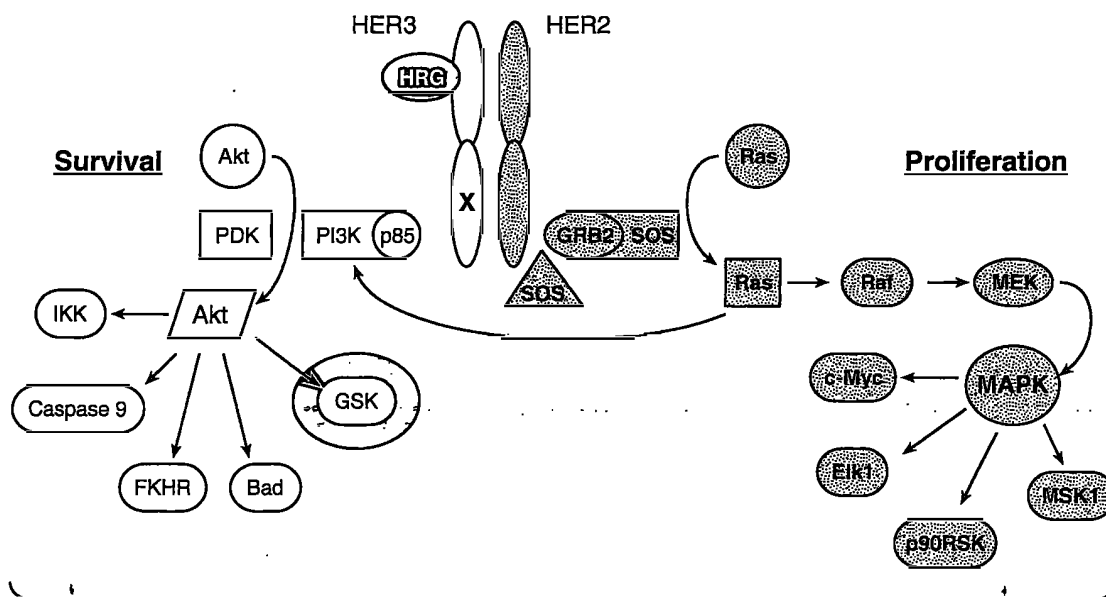


FIG. 5

**Trastuzumab
Herceptin**



- Binds in IV near JM.
- Protects against receptor shedding
- Moderately affects receptor down-modulation
- Slight effect on HER2's role as a coreceptor

**Pertuzumab
Omnitarg**



- Binds in II at dimerization interface
- Does not prevent receptor shedding
- Moderately affects receptor down-modulation
- Major effect on HER2's role as a coreceptor

FIG. 6

Light Chain

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

7/19

FIG. 7A

6/19

Heavy Chain

1 15 30 45
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FNIKDTYIHWVRQAPGKGL
46 60 75 90
EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED
91 105 120 135
TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLYTVSSASTKGPSVFPLAPSS
136 150 165 180
KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
181 195 210 225
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
226 240 255 270
THTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
271 285 300 315
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
316 330 345 360
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
361 375 390 405
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
406 420 435 449
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

WFO 2006/063042

8 / 19

PCT/US2005/04247

FIG. 7B

1 15 30 45
V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K
46 60 75 90
A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y
91 105 120 135
C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V
136 150 165 180
V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S
181 195 210 217
T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

9/19

FIG. 8A



~~X~~

1 15 30 45
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L
46 60 75 90
E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D
91 105 120 135
T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K
136 150 165 180
S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G
181 195 210 225
L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T
226 240 255 270
H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H
271 285 300 315
E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W
316 330 345 360
L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M
361 375 390 405
T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S
406 420 435 449
F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

FIG. 8B

FIG. 9A

Oligosaccharide Structures Commonly Observed in IgG Antibodies

Structures	Abbreviation	Mass
$\begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$	Man5	1235
$\begin{array}{l} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2) \left\{ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \right. \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \\ \text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6) \end{array}$	G-1	1260
$\begin{array}{l} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$	G0-F	1317
$\begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$	Man6	1398

11 / 19

84

85

Oligosaccharide Structures Commonly Observed in IgG Antibodies

Structures	Abbreviation	Mass
Galβ(1→4)GlcNAcβ(1→2) Manα(1→6) Manα(1→3) > Manβ(1→4)GlcNAcβ(1→4)GlcNAc- Fucα(1→6)	G1-1	1423
GlcNAcβ(1→2)Manα(1→6) GlcNAcβ(1→2)Manα(1→3) > Manβ(1→4)GlcNAcβ(1→4)GlcNAc- Fucα(1→6)	G0	1463
Galβ(1→4)GlcNAcβ(1→2)Manα(1→6) GlcNAcβ(1→2)Manα(1→3) > Manβ(1→4)GlcNAcβ(1→4)GlcNAc- Fucα(1→6)	G1 (1-6)	1626
GlcNAcβ(1→2)Manα(1→6) Galβ(1→4)GlcNAcβ(1→2)Manα(1→3) > Manβ(1→4)GlcNAcβ(1→4)GlcNAc- Fucα(1→6)	G1 (1-3)	1626
Galβ(1→4)GlcNAcβ(1→2)Manα(1→6) Galβ(1→4)GlcNAcβ(1→2)Manα(1→3) > Manβ(1→4)GlcNAcβ(1→4)GlcNAc- Fucα(1→6)	G2	1788

12 / 19

WO 2006/063042

PCT/US2005/044247

Masses shown in this figure correspond to the (M+Na)⁺ values.

FIG. 9B

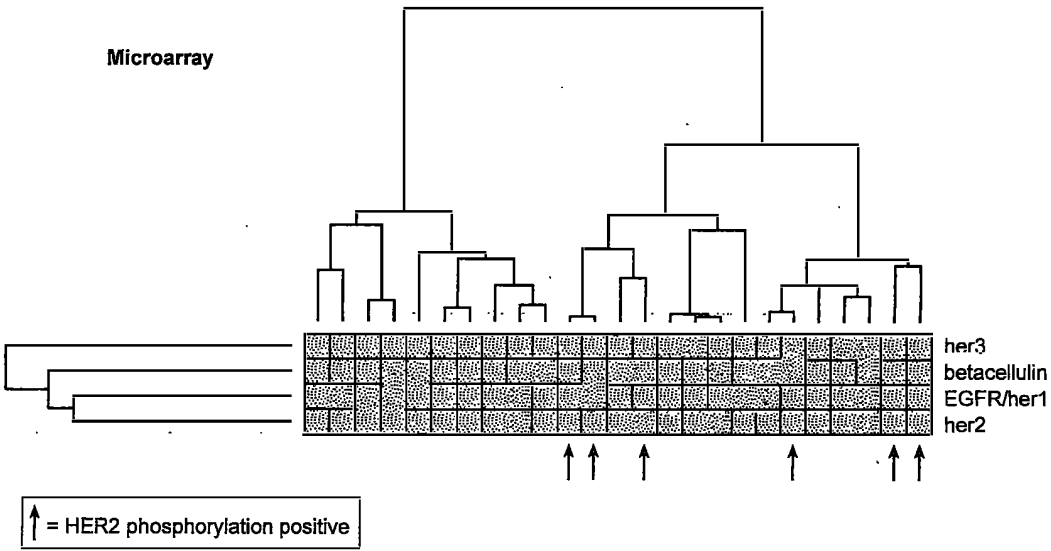


FIG. 10

% Viable Tumor Cells for Elisa	Total HER2 ng/mL	Phospho HER2 U/mL	Gene Expression by Microarray						
			pher2	prediction	her2	betacellulin	EGFR/her1	her3	
90	62.7	246.8	pos	pos	2509	7684.7	453.1	8605.4	
50	62.1	154.6	pos	pos	3880.1	443.4	545.9	1540.5	
70	83.8	74.5	pos	pos	4027.1	983.2	1707	1785	
80	100.3	74.2	pos	pos	1812.633	337.033333	216.6667	2606	
60	59.6	71.9	pos	pos	3115.8	645.1	1629.8	2441.2	
95	140.6	59.0	pos	pos	2916.8	584.9	273.3	5094.2	
95	24.2	<54	neg	neg	736.1	2764.3	529	413.2	
95	25.6	<54	neg	neg	1089.1	174.8	138.5	2758	
80	11.2	<54	neg	neg	1198.8	155.3	1534.1	284.6	
30	34.8	<54	neg	neg	1209.2	431.1	345.5	3429.2	
30	22.2	<54	neg	neg	1234.9	711.3	344	3285.5	
80	71.0	<54	neg	neg	1302.1	99.2	424.4	2719	
80	35.7	<54	neg	neg	1309.4	241.1	331.5	5443.8	
75	36.5	<54	neg	neg	1336.1	459.6	567.1	2977.3	
60	23.0	<54	neg	neg	1441.1	916.4	519.5	4587.8	
50	84.0	<54	neg	neg	1618.9	338.3	509.8	1848.2	
70	55.9	<54	neg	neg	1647	205.6	177.9	2029	
70	52.5	<54	neg	neg	1696.4	54	354.6	1432	
70	32.4	<54	neg	neg	1719.4	215.7	344	3111.5	
80	46.6	<54	neg	neg	1723.3	271.4	452.7	3770.3	
75	46.1	<54	neg	neg	1725.2	300.3	749.8	899.7	
70	23.2	<54	neg	neg	2004.7	200.7	611.6	4305.3	
40	39.3	<54	neg	neg	2557.9	211.4	609.2	2516.1	
60	42.3	<54	neg	neg	2766.5	193.8	256.9	964.3	
30	25.8	<54	neg	neg	3321.3	456.3	356.9	2520	
Samples at or above the median expression =					1719.4	338.3	452.7	2606	median

FIG. 11

[Handwritten mark]

			Gene Expression by Microarray		
% Viable Tumor Cells for Elisa	Total HER2 ng/mL	Phospho HER2 U/mL	pher2	betacellulin	
90	62.7	246.8	pos	7664.7	
95	24.2	<54	neg	2764.3	
70	83.8	74.5	pos	983.4	
60	23.0	<54	neg	916.4	
30	22.2	<54	neg	741.3	
60	59.6	71.9	pos	645.7	
95	140.6	59.0	pos	584.9	
80	100.3	74.2	pos	537.0	
75	36.5	<54	neg	459.8	
30	25.8	<54	neg	456.3	
50	62.1	154.6	pos	443.4	
30	34.8	<54	neg	431.1	
50	84.0	<54	neg	338.3	
75	46.1	<54	neg	300.3	
80	46.6	<54	neg	271.4	
80	35.7	<54	neg	241.1	
70	32.4	<54	neg	215.7	
40	39.3	<54	neg	211.4	
70	55.9	<54	neg	205.6	
70	23.2	<54	neg	200.7	
60	42.3	<54	neg	193.8	
95	25.6	<54	neg	174.8	
80	11.2	<54	neg	155.3	
80	71.0	<54	neg	99.2	
70	52.5	<54	neg	54	
				338.3	median
Samples at or above the median expression=					
Wrong prediction=					

FIG. 12

Gene	Mean +/- STD (CT)	Range (CT)
GUS	26.76 +/- 0.70	3.92
EGFR	28.09 +/- 1.11	4.94
HER2	26.09 +/- 1.09	4.72
HER3	28.30 +/- 1.68	8.43
HER4	29.26 +/- 2.62	10.84
Betacellulin	31.92 +/- 1.72	8.42
Epiregulin	33.45 +/- 2.28	12.22
Amphiregulin	33.58 +/- 1.82	8.21
TGF-alpha	31.44 +/- 1.51	7.12

FIG. 13

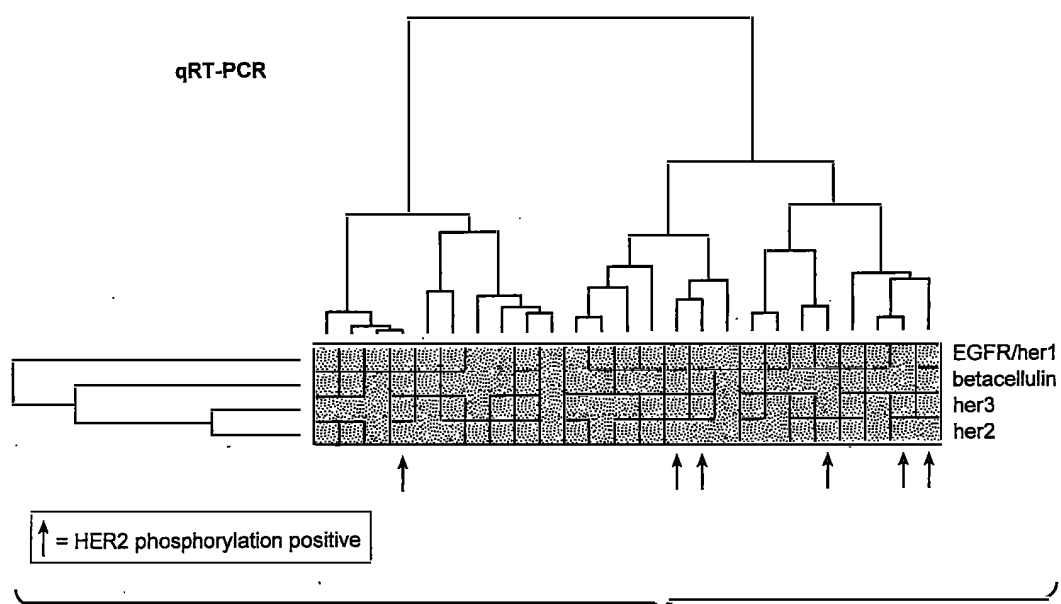


FIG. 14

[Handwritten signature]

X

% Viable Tumor Cells for Elisa	Total HER2 ng/mL	Phospho HER2 U/mL	Gene Expression by qRT-PCR					
			pher2	prediction	her2	amphiregu	EGFR/her1	her3
90	62.7	246.8	pos	neg	4.59	11.66244	3.20	48.76
50	62.1	154.6	pos	pos	9.26	45.39798	5.97	24.12
70	83.8	74.5	pos	pos	9.59	67.88056	14.01	27.54
80	100.3	74.2	pos	pos	5.60	37.01868	1.60	51.02
60	59.6	71.9	pos	neg	3.59	9.201785	5.54	21.77
95	140.6	59	pos	pos	6.51	17.23389	1.99	86.96
95	24.2	<54	neg	neg	1.26	61.28662	3.15	5.79
95	25.6	<54	neg	pos	14.21	7.756674	2.49	16.65
80	11.2	<54	neg	neg	1.49	3.237223	19.45	2.16
30	34.8	<54	neg	pos	10.19	11.10794	5.68	110.89
30	22.2	<54	neg	neg	2.09	5.582936	3.92	26.72
80	71	<54	neg	neg	4.66	7.790626	6.09	47.88
80	35.7	<54	neg	neg	3.83	15.56794	1.39	47.39
75	36.5	<54	neg	pos	6.38	2.183314	8.06	39.54
60	23	<54	neg	neg	3.70	10.77946	4.66	41.67
50	84	<54	neg	neg	5.25	32.68562	5.31	15.31
70	55.9	<54	neg	neg	6.77	13.99794	1.52	44.04
70	52.5	<54	neg	neg	2.38	3.985562	1.01	18.23
70	32.4	<54	neg	neg	10.03	5.808624	3.44	97.62
80	46.6	<54	neg	neg	3.10	1.884399	3.09	35.74
75	46.1	<54	neg	neg	3.96	14.63391	6.89	18.10
70	23.2	<54	neg	neg	6.21	1.307397	6.97	67.83
40	39.3	<54	neg	pos	10.78	14.82455	10.53	53.66
60	42.3	<54	neg	neg	6.93	6.42934	1.71	17.07
30	25.8	<54	neg	pos	12.62	42.9983	3.58	44.73
Samples at or above the median expression=					5.60	11.10794	3.92	41.67 median
Wrong prediction=								

FIG. 15

% Viable Tumor Cells for Elisa	Total HER2 ng/mL	Gene Expression by qRT-PCR			
		Phospho HER2 U/mL	pher2	betacellulin	
90	62.7	246.8	pos	233.63	
95	24.2	<54	neg	114.96	
60	23	<54	neg	41.25	
70	83.8	74.5	pos	34.07	
75	36.5	<54	neg	34.65	
30	22.2	<54	neg	27.51	
30	25.8	<54	neg	24.68	
80	100.3	74.2	pos	23.62	
30	34.8	<54	neg	23.51	
95	140.6	59	pos	19.25	
95	25.6	<54	neg	15.35	
50	62.1	154.6	pos	15.23	
40	39.3	<54	neg	12.62	
50	84	<54	neg	12.51	
70	55.9	<54	neg	11.18	
75	46.1	<54	neg	11.03	
70	32.4	<54	neg	10.48	
60	59.6	71.9	pos	8.85	
70	23.2	<54	neg	7.05	
80	46.6	<54	neg	6.71	
80	35.7	<54	neg	5.47	
60	42.3	<54	neg	4.88	
80	11.2	<54	neg	3.41	
80	71	<54	neg	2.32	
70	52.5	<54	neg	1.02	
				12.62	median
Samples at or above the median expression=					
Wrong prediction=					

FIG. 16

47

% Viable Tumor Cells for Elisa	Gene Expression by qRT-PCR			amphiregulin	
	Total HER2 ng/mL	Phospho HER2 U/mL	pher2		
70	83.8	74.5	pos	67.8805624	
95	24.2	<54	neg	6.12865163	
50	62.1	154.6	pos	45.3979781	
30	25.8	<54	neg	42.9982985	
80	100.3	74.2	pos	37.0186829	
50	84	<54	neg	32.6856186	
95	140.6	59	pos	17.2318938	
80	35.7	<54	neg	15.6679394	
40	39.3	<54	neg	14.8245483	
75	46.1	<54	neg	14.6339112	
70	55.9	<54	neg	13.9979409	
90	62.7	246.8	pos	11.6647623	
30	34.8	<54	neg	11.1079374	
60	23	<54	neg	10.7794592	
60	59.6	71.9	pos	9.20178485	
80	71	<54	neg	7.7906265	
95	25.6	<54	neg	7.75667358	
60	42.3	<54	neg	6.42934028	
70	32.4	<54	neg	5.80862367	
30	22.2	<54	neg	5.58293613	
70	52.5	<54	neg	3.98556197	
80	11.2	<54	neg	3.23722253	
75	36.5	<54	neg	2.18331441	
80	46.6	<54	neg	1.88439857	
70	23.2	<54	neg	1.30739693	
				11.1079374	median
Samples at or above the median expression=					
Wrong prediction=					

FIG. 17

103 894
att 93

WO 2006/063042

PCT/US2005/044247

Sequence Listing

<110> GENENTECH, INC.
Amler, Lukas C.
Januario, Thomas E.

<120> Selecting Patients for Therapy with a HER Inhibitor

<130> P2148R1

<141> 2005-12-06

<150> US 60/633,941

<151> 2004-12-07

<160> 22

<210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 1
Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
20 25 30
Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
95 100 105
Ile Lys

<210> 2
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15
Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
20 25 30
Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
35 40 45
Glu Trp Ile Gly Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr

50 55 60
 Asn Gln Arg Phe Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser
 65 70 75
 Ser Arg Ile Val Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
 95 100 105
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys

<210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

ap 95

35	40	45
Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr		
50	55	60
Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser		
65	70	75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp		
80	85	90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr		
95	100	105
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
110	115	

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 5
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys

AX 96

WO 2006/063042

PCT/US2005/044247

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30
Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu
95 100 105
Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<220>
<221> Xaa
<222> 10
<223> Xaa is preferably D or S

<400> 7
Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa
1 5 10

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 8
Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 9
Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 10
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<220>
<221> Xaa
<222> 5
<223> Xaa is preferably R or L

<220>
<221> Xaa
<222> 6
<223> Xaa is preferably Y or E

<220>
<221> Xaa
<222> 7
<223> Xaa is preferably T or S

<400> 11
Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 12
Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
1 5

all 98

WO 2006/063042

PCT/US2005/044247

<210> 13
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 13
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
20 25 30
Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110 115 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125 130 135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140 145 150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155 160 165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210
Arg Gly Glu Cys

<210> 14
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 14

~~100~~

99

WO 2006/063042

PCT/US2005/044247

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30
Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
50 55 60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr
95 100 105
Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115 120
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
125 130 135
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
140 145 150
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
155 160 165
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
170 175 180
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
185 190 195
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
200 205 210
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
215 220 225
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315

~~207~~

100

WO 2006/063042

PCT/US2005/044247

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
320 325 330
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
335 340 345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
350 355 360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
365 370 375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
380 385 390
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
395 400 405
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
410 415 420
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
425 430 435
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 15
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
20 25 30
Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110 115 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125 130 135

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140 145 150

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155 160 165

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210

Arg Gly Glu Cys

<210> 16
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
20 25 30

Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
50 55 60

Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
95 100 105

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
110 115 120

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
125 130 135

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
140 145 150

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
155 160 165

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
170 175 180

102

WO 2006/063042

PCT/US2005/044247

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
185 190 195

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
200 205 210

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
215 220 225

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
320 325 330

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
335 340 345

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
350 355 360

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
365 370 375

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
380 385 390

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
395 400 405

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
410 415 420

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
425 430 435

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445

<210> 17
<211> 217
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 17

~~104~~ 103

WO 2006/063042

PCT/US2005/044247

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

<210> 18
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 18
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
20 25 30
Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
 95 100 105
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 110 115 120
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 125 130 135
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 140 145 150
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 155 160 165
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 170 175 180
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 185 190 195
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 200 205 210
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 215 220 225
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 320 325 330
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 335 340 345
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 350 355 360

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 365 370 375
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 380 335 390
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 395 400 405
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 410 415 420
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 425 430 435
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 440 445

<210> 19
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly
 20 25 30
 Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr
 35 40 45
 Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly
 50 55 60
 Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln
 65 70 75
 Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 80 85 90
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr
 95 100 105
 Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu
 110 115 120
 Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg
 125 130 135
 Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile
 140 145 150
 Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn
 155 160 165
 Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser
 170 175 180
 Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg
 185 190 195

~~106~~ 106

WO 2006/063042

PCT/US2005/044247

<210> 20
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro
1 5 10 15
Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro
20 25 30
Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly
35 40 45
Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp
50 55 60
Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly
65 70 75
Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp
80 85 90
Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val
95 100 105
Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro
110 115 120
Cys Ala Arg Val

<210> 21
<211> 169
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val
1 5 10 15
Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe
20 25 30
Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala
35 40 45
Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu
50 55 60
Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
65 70 75
Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile
80 85 90
Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln
95 100 105
Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu
110 115 120

Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe
 125 130 135
 Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln
 140 145 150
 Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly
 155 160 165
 Glu Gly Leu Ala

<210> 22
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro
 1 5 10 15
 Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys
 20 25 30
 Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val
 35 40 45
 Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln
 50 55 60
 Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val
 65 70 75
 Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys
 80 85 90
 Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys
 95 100 105
 Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys
 110 115 120
 Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu
 125 130 135
 Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr
 140

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2005/044247 108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68

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)
C12Q G01N A61K C07K

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, BIOSIS, PAJ, WPI Data, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/106161 A1 (BOSSENMAIER BIRGIT ET AL) 3 June 2004 (2004-06-03) the whole document	1-23, 25-30
X	WO 01/00245 A (GENENTECH, INC) 4 January 2001 (2001-01-04) the whole document	1-23, 25-30
X	TORRING N ET AL: "Possible autocrine loop of the epidermal growth factor system in patients with benign prostatic hyperplasia treated with finasteride: A placebo-controlled randomized study" BJU INTERNATIONAL, vol. 89, no. 6, April 2002 (2002-04), pages 583-590, XP002378992 ISSN: 1464-4096 the whole document	1-3,5-9, 21-23
-/--		

☒ 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.
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 August 2006

Date of mailing of the international search report

12/09/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Botz, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2005/044247

109

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEYLAND-JONES B: "DOSE SCHEDULING - HERCEPTIN(R)" ONCOLOGY, S. KARGER AG, BASEL, CH, vol. 61, no. SUPPL 2, October 2001 (2001-10), pages 31-36, XP009063513 ISSN: 0030-2414 the whole document	1-30
Y	WITTON CAROLINE J ET AL: "Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer." JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 200, no. 3, July 2003 (2003-07), pages 290-297, XP002378993 ISSN: 0022-3417 the whole document	1-30
Y	WITTON C J ET AL: "Coexpression of EGFr, HER2, HER3 and HER4 in primary human breast carcinoma" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 37, September 2001 (2001-09), pages 21-22, XP004359109 ISSN: 0959-8049 the whole document	1-30
Y	NAHTA RITA ET AL: "The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells" CANCER RESEARCH, vol. 64, no. 7, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 2343-2346, XP002378994 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-30
Y	BADACHE ALI ET AL: "A new therapeutic antibody masks ErbB2 to its partners" CANCER CELL, vol. 5, no. 4, April 2004 (2004-04), pages 299-301, XP002378995 ISSN: 1535-6108 the whole document	1-30
Y	WO 01/00238 A (GENENTECH, INC; SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 4 January 2001 (2001-01-04) the whole document	1-30
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/044247

110

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FREIMANN S ET AL: "Drug development for ovarian hyper-stimulation and anti-cancer treatment: blocking of gonadotropin signaling for epiregulin and amphiregulin biosynthesis" BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 68, no. 6, 15 September 2004 (2004-09-15), pages 989-996, XP002396186 ISSN: 0006-2952 the whole document	31,32, 40,41
X	SEWELL J M ET AL: "Targeting the EGF receptor in ovarian cancer with the tyrosine kinase inhibitor ZD 1839 ("Iressa")." BRITISH JOURNAL OF CANCER. 1 FEB 2002, vol. 86, no. 3, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 456-462, XP002396187 ISSN: 0007-0920 the whole document	31,40,41
X	D'ANTONIO ANTONIO ET AL: "Transforming growth factor alpha, amphiregulin and cripto-1 are frequently expressed in advanced human ovarian carcinomas" INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 21, no. 5, November 2002 (2002-11), pages 941-948, XP008068106 ISSN: 1019-6439 the whole document	31-33, 40,41
X	AGUS D B ET AL: "Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth" SIGNALING NETWORKS AND CELL CYCLE CONTROL: THE MOLECULAR BASIS OF CANCER AND OTHER DISEASES, XX, XX, vol. 2, August 2002 (2002-08), pages 127-137, XP002988666 the whole document	33,34, 38,39
X	VALLE J W ET AL: "287 A phase Ib study of pertuzumab (P), a recombinant humanized antibody to HER2, and capecitabine (C) in patients with advanced solid tumors" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER. SUPPLEMENT, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 2, no. 8, September 2004 (2004-09), page 88, XP004639731 ISSN: 1359-6349 the whole document	33,34, 38,39
	--/--	

7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/044247

///

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FRANKLIN M C ET AL: "Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex" CANCER CELL, XX, US, vol. 5, no. 4, April 2004 (2004-04), pages 317-328, XP002372929 ISSN: 1535-6108 the whole document	33,34
A	ROSKOSKI R: "The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 319, no. 1, 18 June 2004 (2004-06-18), pages 1-11, XP004509841 ISSN: 0006-291X the whole document	33,34
X	FLEISIG H ET AL: "Regulation of ErbB4 phosphorylation and cleavage by a novel histidine acid phosphatase" NEUROSCIENCE, vol. 127, no. 1, 2004, pages 91-100, XP002396188 ISSN: 0306-4522 the whole document	35,37
X	SAITO TSUGUMICHI ET AL: "Differential activation of epidermal growth factor (EGF) receptor downstream signaling pathways by betacellulin and EGF" ENDOCRINOLOGY, vol. 145, no. 9, September 2004 (2004-09), pages 4232-4243, XP002396189 ISSN: 0013-7227 the whole document	35,37
X	BURGESS ANTONY W ET AL: "An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors." MOLECULAR CELL. SEP 2003, vol. 12, no. 3, September 2003 (2003-09), pages 541-552, XP002396190 ISSN: 1097-2765 the whole document	33-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/044247

112

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, 31, 33 and 40 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 compound/ 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 dependent 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:

see additional sheet

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.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

113

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-30 (completely)

Invention Number 1:

A method for treating cancer comprising administering to a patient a HER inhibitor in an amount effective to treat the cancer, wherein a tumour sample from the patient expresses two or more HER receptors and one or more HER ligands.

2. claims: 31, 32, 40, 41 (completely)

Invention Number 2:

A method for treating cancer, particularly ovarian cancer, comprising administering to a patient a HER inhibitor in an amount effective to treat the cancer, wherein a tumour sample from the patient expresses betacellulin or amphiregulin.

3. claims: 33, 34 (completely)

Invention Number 3:

A method for treating cancer, comprising administering to a patient a HER2 antibody that binds to DOMAIN II of HER2 in an amount effective to treat the cancer, wherein a tumor sample from the patient expresses HER2 and EGFR or HER3, as well as betacellulin or amphiregulin.

4. claims: 35, 36, 37 (completely)

Invention Number 4:

A method of assessing HER phosphorylation or activation in a biological sample, comprising determining expression of two or more HER receptors and one or more HER ligands in the sample, wherein expression of the two or more HER receptors and one or more HER ligands indicates HER phosphorylation or activation in the sample, or, wherein expression of betacellulin or amphiregulin indicates HER phosphorylation or activation in the sample.

5. claims: 38, 39 (completely)

Invention Number 5:

A method of identifying a patient for therapy with a HER dimerization inhibitor comprising determining expression of two or more HER receptors and one or more HER ligands in a sample from the patient, wherein expression of the HER receptors and HER ligand indicates that the patient is likely to respond to therapy with the HER dimerization inhibitor.

5/11

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210	114

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/044247

215

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004106161	A1	03-06-2004	NONE
WO 0100245	A	04-01-2001	AT 500848 A1 15-04-2006
		AU 784045 B2 19-01-2006	
		AU 5763200 A 31-01-2001	
		BR 0012198 A 02-04-2002	
		CA 2376596 A1 04-01-2001	
		CH 694589 A5 15-04-2005	
		CN 1370082 A 18-09-2002	
		CZ 20014596 A3 12-02-2003	
		DE 10084743 T0 14-08-2002	
		EP 1189641 A2 27-03-2002	
		GB 2368796 A 15-05-2002	
		HU 0201695 A2 28-09-2002	
		JP 2003503366 T 28-01-2003	
		MX PA01013458 A 30-07-2002	
		NO 20016329 A 25-02-2002	
		NZ 516830 A 30-07-2004	
		NZ 531426 A 28-10-2005	
		PL 352321 A1 11-08-2003	
		TR 200103756 T2 21-06-2002	
		ZA 200109786 A 28-11-2002	
		ZA 200110263 A 13-12-2002	
WO 0100238	A	04-01-2001	AU 779209 B2 13-01-2005
		AU 5499200 A 31-01-2001	
		BR 0012195 A 23-07-2002	
		CA 2383493 A1 04-01-2001	
		CN 1379684 A 13-11-2002	
		EP 1189634 A1 27-03-2002	
		JP 2003503361 T 28-01-2003	
		MX PA01013395 A 04-09-2003	
		US 2006083739 A1 20-04-2006	
		ZA 200110088 A 26-08-2002	

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

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
15 de junio de 2006 (15.06.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/063042 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) No. Solicitud Internacional: PCT/US2005/044247

(22) Fecha de Presentación Internacional:
6 de diciembre de 2005 (06.12.2005)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:
60/633,941 7 de diciembre de 2004 (07.12.2004) US

(71) Solicitante (para todos los países destinatarios con excepción de US): GENENTECH, INC. [US/US]; GENENTECH, INC. [US/US]; MS 49, 1 Dna Way, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventores, e

(75) Inventores/Solicitantes (para US únicamente): AMLER, Lukas, C. [DE/US]; 845 Grenada Lane, Foster City, CA 94404 (US). JANUARIO, Thomas, E. [US/US]; 221 Clara street, Apartment 14, San Francisco, CA 94107 (US).

(74) Agentes: LEE, Wendy, M. et al.; c/o Genentech, INC., 1 DNA Way MS 49, South San Francisco, CA 94080 (US).

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

Publicado:

— con informe internacional de búsqueda

(88) Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional:

8 de febrero de 2007

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, remítase a las "Notas Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparece al comienzo de cada edición regular del Boletín Oficial PCT.

(54) Título: SELECCIÓN DE PACIENTES PARA UNA TERAPIA CON UN INHIBIDOR DE HER

(57) Extracto: Se describe un método de seleccionar pacientes para terapia con un inhibidor de HER, tal como pertuzumab, basado en análisis de expresión génica. Se describe asimismo un método de evaluar la fosforilación o activación de HER en una muestra biológica mediante análisis de expresión génica.

WO 2006/063042 A3

117

SELECCIÓN DE PACIENTES PARA UNA TERAPIA CON UN INHIBIDOR DE HER

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de selección de pacientes para una terapia con un inhibidor de HER, como el pertuzumab, sobre la base del análisis de la expresión génica. La invención también se refiere a un procedimiento para evaluar la fosforilación o activación de HER en una muestra biológica a través del análisis de la expresión génica.

Antecedentes de la invención

Receptores HER y anticuerpos contra estos

La familia de los receptores tirosina quinasas HER es un grupo de importantes mediadores en el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular. La familia de receptores incluye cuatro miembros distintos: el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1 o HER1), HER2 (ErbB2 o p185^{neu}), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tiro2).

El EGFR, codificado por el gen *erbB1*, es causa de tumores malignos en el ser humano. En particular, se ha observado un aumento de la expresión del EGFR en el cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y estómago, así como los glioblastomas. El aumento de la expresión del EGFR se asocia a menudo con un aumento de la producción de su ligando, el factor alfa de crecimiento tumoral (TGF- α), por parte de las propias células tumorales, propiciando que una ruta de estimulación autocrina active el receptor. Baselga y Mendelsohn, *Pharmac. Ther.*, 64:127-154 (1994). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFR o sus ligandos, el TGF- α y el EGF, se han evaluado como agentes terapéuticos en el tratamiento de tales tumores. Véase, por ejemplo, Baselga y Mendelsohn, *supra*; Masui y col., *Cancer Research*, 44:1002-1007 (1984) y Wu y col., *J. Clin. Invest.*, 95:1897-1905 (1995).

El segundo miembro de la familia de los HER, el p185^{neu}, se identificó originalmente como el producto del gen mutante de los neuroblastomas manifestados en ratas tratadas con sustancias químicas. La forma activada del protooncogén *neu* se produce por una mutación puntual (de valina a ácido glutámico) en la región transmembrana de la proteína codificada. La amplificación del homólogo humano del *neu* se observa en el cáncer de mama y ovario, con un nivel de prognosis muy bajo (Slamon y col., *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon y col., *Science*, 244:707-712 (1989) y la patente de EE.UU. N° 4.968.603). Hasta la fecha, no se ha detectado que en los tumores humanos se haya producido alguna mutación puntual análoga a la del protooncogén *neu*. La sobreexpresión de HER2 (debida frecuente pero no uniformemente a la amplificación del gen) también se ha observado en otros carcinomas, incluyendo los de estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, hígado, colon, tiroides, páncreas y vejiga. Véase, entre otros, King y col., *Science*, 229:974 (1985); Yokota y col., *Lancet*, 1:765-767 (1986); Fukushima y col., *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Guerin y col., *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen y col., *Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura y col., *Cancer Res.*, 51:1034

(1991); Borst y col., *Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990); Weiner y col., *Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern y col., *Cancer Res.*, 50:5184 (1990); Park y col., *Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau y col., *Mol. Carcinog.*, 3:254-257 (1990); Aasland y col., *Br. J. Cancer*, 57:358-363 (1988); Williams y col., *Pathobiology*, 59:46-52 (1991) y McCann y col., *Cancer*, 65:88-92 (1990). HER 2 también puede tener una sobreexpresión en el cáncer de próstata (Gu y col., *Cancer Lett.*, 99:185-9 (1996); Ross y col., *Hum. Pathol.*, 28:827-33 (1997); Ross y col., *Cancer*, 79:2162-70 (1997) y Sadasivan y col., *J. Urol.*, 150:126-31 (1993)).

Se han descrito anticuerpos dirigidos contra las proteínas p185^{neu} de las ratas y HER2 humana.

Drebin y sus colegas han desarrollado anticuerpos contra el gen *neu* de las ratas, p185^{neu}. Véase, por ejemplo, Drebin y col., *Cell*, 41:695-706 (1985); Myers y col., *Meth. Enzym.*, 198:277-290 (1991) y WO94/22478. En Drebin y col., *Oncogene*, 2:273-277 (1988) se menciona que las mezclas de anticuerpos reactivos con dos regiones distintas del p185^{neu} tienen efectos antitumorales sinérgicos en las células NIH-3T3 transformadas por el *neu* e implantadas en ratones. Véase también la patente de EE.UU. 5.824.311 concedida el 20 de octubre de 1998.

En Hudziak y col., *Mol. Cell. Biol.*, 9(3):1165-1172 (1989) se describe la generación de un panel de anticuerpos contra HER2 caracterizados por emplear la línea de células SK-BR-3 del tumor de mama humano. La proliferación relativa de las células SK-BR-3 tras la exposición a los anticuerpos se determinó por la aparición de manchas de color violeta cristal en las monocapas al cabo de 72 horas. En este ensayo, la inhibición máxima se obtuvo con el anticuerpo llamado 4D5, que inhibió la proliferación celular en el 56%. Sin embargo, otros anticuerpos del panel redujeron la proliferación celular en menor grado. Posteriormente, se descubrió que el anticuerpo 4D5 sensibilizaba las líneas celulares del tumor de mama con sobreexpresión de HER2 a los efectos citotóxicos del TNF- α . Véase también la patente de EE.UU. N° 5.677.171 concedida el 14 de octubre de 1997. Los anticuerpos contra HER2 mencionados en Hudziak y col. se describen con mayor detalle en Fendly y col., *Cancer Research*, 50:1550-1558 (1990); Kotts y col., *In Vitro*, 26(3):59A (1990); Sarup y col., *Growth Regulation*, 1:72-82 (1991); Shepard y col., *J. Clin. Immunol.*, 11(3):117-127 (1991); Kumar y col., *Mol. Cell. Biol.*, 11(2):979-986 (1991); Lewis y col., *Cancer Immunol. Immunother.*, 37:255-263 (1993); Pietras y col., *Oncogene*, 9:1829-1838 (1994); Vitetta y col., *Cancer Research*, 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski y col., *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994); Scott y col., *J. Biol. Chem.*, 266:14300-5 (1991); D'souza y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:7202-7206 (1994); Lewis y col., *Cancer Research*, 56:1457-1465 (1996) y Schaefer y col., *Oncogene*, 15:1385-1394 (1997).

Una versión recombinante humanizada del anticuerpo murino 4D5 contra HER2 (huMAb 4D5-8, rhuMAb HER2, trastuzumab o HERCEPTIN®; patente de EE.UU. N° 5.821.337) aparece clínicamente activa en pacientes con cáncer de mama metastásico con sobreexpresión de HER2 que han recibido una intensa terapia previa contra el cáncer (Baselga y col., *J. Clin. Oncol.*, 14:737-744 (1996)). La Administración de Alimentos y Fármacos aprobó el 25 de septiembre de 1998 la comercialización del trastuzumab para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico con sobreexpresión de la proteína HER2.

Otros anticuerpos contra HER2 con diversas propiedades se han descrito en Tagliabue y col., *Int. J. Cancer*, 47:933-937 (1991); McKenzie y col., *Oncogene*, 4:543-548 (1989); Maier y col., *Cancer Res.*, 51:5361-5369 (1991); Bacus y col., *Molecular Carcinogenesis*, 3:350-362 (1990); Stancovski y col., *PNAS (USA)*, 88:8691-8695 (1991); Bacus y col., *Cancer Research*, 52:2580-2589 (1992); Xu y col., *Int. J. Cancer*, 53:401-408 (1993); WO94/00136; Kasprzyk y

col., *Cancer Research*, 52:2771-2776 (1992); Hancock y col., *Cancer Res.*, 51:4575-4580 (1991); Shawver y col., *Cancer Res.*, 54:1367-1373 (1994); Arteaga y col., *Cancer Res.*, 54:3758-3765 (1994); Harwerth y col., *J. Biol. Chem.*, 267:15160-15167 (1992); la patente de EE.UU. N° 5.783.186 y Klapper y col., *Oncogene*, 14:2099-2109 (1997).

Mediante la exploración de la homología se han identificado otros dos miembros de la familia de receptores HER: HER3 (las patentes de EE.UU. núms. 5.183.884 y 5.480.968, así como Kraus y col., *PNAS (USA)*, 86:9193-9197 (1989)) y HER4 (la solicitud de patente europea N° 599.274; Plowman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993) y Plowman y col., *Nature*, 366:473-475 (1993)). Ambos receptores muestran un aumento de la expresión en al menos algunas líneas celulares de cáncer de mama.

Los receptores HER, por lo general, se encuentran en las células en diversas combinaciones, y se cree que la heterodimerización aumenta la diversidad de las respuestas celulares a varios ligandos de HER (Earp y col., *Breast Cancer Research and Treatment*, 35: 115-132 (1995)). Al EGFR se unen seis ligandos diferentes: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor alfa de crecimiento tumoral (TGF- α), la anfirregulina, el factor de crecimiento epidérmico ligado a la heparina (HB-EGF), la betacelulina y la epirregulina (Groenen y col., *Growth Factors*, 11:235-257 (1994)). Una familia de las proteínas heregulinas resultante del enlace alternativo de un solo gen actúa como ligando de HER3 y HER4. La familia de las heregulinas incluye las heregulinas alfa, beta y gamma (Holmes y col., *Science*, 256:1205-1210 (1992); la patente de EE.UU. N° 5.641.869 y Schaefer y col., *Oncogene*, 15:1385-1394 (1997)), los factores de diferenciación del neu (NDFs), los factores de crecimiento glial (GGFs), la actividad inductora del receptor de acetilcolina (ARIA) y el factor sensorial y motoneuronal derivado (SMDF). Para reseñas al respecto, véase Groenen y col., *Growth Factors*, 11:235-257 (1994); Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.*, 7:247-262 (1996) y Lee y col., *Pharm. Rev.*, 47:51-85 (1995). Recientemente se identificaron tres ligandos adicionales de HER: la neuregulina-2 (NRG-2), de la cual se ha informado que se une o bien a HER3 o a HER4 (Chang y col., *Nature*, 387 509-512 (1997) y Carraway y col., *Nature*, 387:512-516 (1997)), la neuregulina-3, que se une a HER4 (Zhang y col., *PNAS (USA)*, 94(18):9562-7 (1997)), y la neuregulina-4, que se une a HER4 (Harari y col., *Oncogene*, 18:2681-89 (1999)). El HB-EGF, la betacelulina y la epirregulina también se unen a HER4.

Si bien el EGF y el TGF α no se unen a HER2, el EGF estimula el EGFR y HER2 para formar un heterodímero, que activa el EGFR y propicia la transfosforilación de HER2 en el heterodímero. La dimerización y/o la transfosforilación parecen activar la tirosina quinasa HER2. Véase Earp y col., *supra*. Asimismo, cuando HER3 se expresa juntamente con HER2, se forma un complejo activo de señalización, y los anticuerpos dirigidos contra HER2 son capaces de desorganizar este complejo (Sliwkowski y col., *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)). Además, la afinidad de HER3 por la heregulina (HRG) aumenta cuando se expresa juntamente con HER2. Véase también, Levi y col., *Journal of Neuroscience*, 15: 1329-1340 (1995); Morrissey y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 1431-1435 (1995) y Lewis y col., *Cancer Res.*, 56:1457-1465 (1996) con relación al complejo de proteínas HER2-HER3. HER4, al igual que HER3, forma un complejo activo de señalización con HER2 (Carraway y Cantley, *Cell*, 78:5-8 (1994)).

Cáncer de ovario

El cáncer de ovario es la causa de muerte más común por tumor del tracto reproductor femenino. Se calcula que cada año se diagnostican 24.000 nuevos casos en Estados Unidos, de los cuales aproximadamente 13.000 acaban

muriendo a raíz de la enfermedad. Las pacientes con cáncer de ovario avanzado se tratan a menudo con quimioterapia basada en platino, frecuentemente combinada con un taxano. Si todos estos agentes fracasan, quedan pocas opciones terapéuticas. Las pacientes con una enfermedad sensible al platino se vuelven a tratar a menudo con platino, pero una proporción sustancial de pacientes tiene una corta duración de respuesta tras el segundo tratamiento. En aquellas enfermedades que resisten al platino, el resultado es menos favorable. La Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) ha aprobado el topotecán para pacientes sin éxito con la quimioterapia inicial o posterior; la doxorrubicina liposomal se ha aprobado sólo para pacientes con cáncer de ovario refractario a los regímenes de quimioterapia basados tanto en platino como paclitaxel. El topotecán y la doxorrubicina liposomal han mostrado unas tasas de respuesta parcial del 6% y el 12% respectivamente en pacientes con enfermedad resistente al platino, con un índice medio de supervivencia sin progresión de 14-18 semanas. Más recientemente, se ha informado de resultados prometedores con la gemcitabina en el cáncer de ovario resistente al platino, con respuestas parciales del 16% que han propiciado un aumento del uso de este agente como terapia de segunda línea. De todos modos, existe una clara necesidad de nuevas y mejores opciones terapéuticas para pacientes con cáncer de ovario avanzado sin éxito con las terapias existentes.

La familia de los receptores tirosina quinasas HER está implicada en la patogénesis del cáncer de ovario. A fin de actuar sobre la ruta de señalización de HER, se desarrolló el pertuzumab (rhuMab 2C4) como un anticuerpo humanizado que inhibe la dimerización de HER2 y otros receptores HER, inhibiendo por tanto la fosforilación y activación dirigidas por los ligandos, así como la activación descendente de las rutas de RAS y AKT.

La gemcitabina se ha utilizado en diversos tumores, y su uso está indicado para el cáncer de páncreas y pulmón. Las toxicidades más comunes al usar gemcitabina como agente único incluyen las citopenias, con una incidencia de anemia y neutropenia del 68% y el 63% respectivamente. Las náuseas y los vómitos son otra toxicidad común, con una incidencia combinada del 69% e incidencias de grado III del 13% y grado IV del 1%. La diarrea se produce con menos frecuencia (19%). Las erupciones aparecen normalmente en el 30%, con una incidencia de grado III de sólo el 1%. La gemcitabina se ha combinado con muchos otros agentes quimioterapéuticos, como los taxanos, las antraciclinas y los platinos, sin ningún aumento significativo o inesperado de toxicidad.

El trastuzumab se ha combinado con la gemcitabina en diversas combinaciones de distintas quimioterapias en ensayos de fase II, también con un buen nivel de tolerancia y sin toxicidades cardíacas o inesperadas. Safran y col., *Proc Am. Soc. Clin. Oncol.*, 20:130a (2001) y Miller y col., *Oncology*, 15(2): 38-40 (2001). Véase también Zinner y col., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 20:328a (2001), Nagourney y col., *Breast Cancer Res. Treat.*, 57:116, el resumen 475 (1999), Bun y col., *Proc. Am. Assoc. Canc. Res.*, 41:719, el resumen #571 (2000), Konecny y col., *Breast Cancer Res Treat*, 57: 114, el resumen 467 (1999), O'Shaughnessy y col., *Sem. Oncol* 2, (supl3):22-26 (2004), Sledge y col., *Sem. Oncol.* 2, (supl3):19-21 (2003), Zinner y col., *Lung Cancer*, 44(1):99-110 (2004) y Gatzemeier y col., *Ann of Oncol.*, 15:19-27 (2004), con relación a la combinación de trastuzumab y gemcitabina.

En un ensayo de fase I con omnitarg como agente único para el tratamiento de tumores sólidos, 3 pacientes con cáncer de ovario avanzado se trataron con pertuzumab. Una tuvo una respuesta parcial duradera, y otra se mantuvo estable en su enfermedad durante 15 semanas. Agus y col., *Proc Am Soc Clin Oncol*, 22: 192 y resumen 771 (2003).



Diagnóstico

Las pacientes tratadas con el anticuerpo trastuzumab contra HER2 se seleccionan por lo general para una terapia basada en la sobreexpresión/amplificación de HER2. Véase, por ejemplo, los documentos WO99/31140 (Paton *y col.*), US2003/0170234A1 (Hellmann, S.) y US2003/0147884 (Paton *y col.*), así como los documentos WO01/89566, US2002/0064785 y US2003/0134344 (Mass *y col.*). Véase, también, el documento US2003/0152987, Cohen *y col.*, con relación a la inmunohistoquímica (IHC) y la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) para detectar la sobreexpresión y amplificación de HER2.

En el documento WO2004/053497 (Bacus *y col.*) se hace referencia a cómo determinar o pronosticar la respuesta a la terapia con HERCEPTIN®. En el documento US2004/013297A1 (Bacus *y col.*) se habla del modo de determinar o pronosticar la respuesta a la terapia con anticuerpos ABX0303 contra el EGFR. En el documento WO2004/000094 (Bacus *y col.*) se trata de determinar la respuesta a la GW572016, una pequeña molécula inhibidora de la tirosina quinasa del EGFR-HER2. En el documento WO2004/063709, Amler *y col.*, se hace referencia a los biomarcadores y procedimientos para determinar la sensibilidad al erlotinib HCl, un inhibidor del EGFR. En el documento US2004/0209290, Cobleigh *y col.*, se habla de los marcadores de expresión génica para la prognosis del cáncer de mama.

Las publicaciones de patentes relativas al pertuzumab y la selección de pacientes para terapias con dicha sustancia incluyen: los documentos WO01/00245 (Adams *y col.*), US2003/0086924 (Sliwkowski, M.) y US2004/0013667A1 (Sliwkowski, M.), así como los documentos WO2004/008099A2 y US2004/0106161 (Bossenmaier *y col.*).

En Cronin *y col.*, *Am. J. Path.*, 164(1): 35-42 (2004) se describe la medición de la expresión génica en muestras de archivo de tejidos embebidos en parafina. En Ma *y col.*, *Cancer Cell*, 5:607-616 (2004) se describe la creación de perfiles de los genes mediante una micromatriz de oligonucleótidos y genes empleando ARN aislado de secciones de tejido tumoral tomadas de biopsias primarias archivadas.

Resumen de la invención

La presente invención se relaciona, al menos en parte, con el descubrimiento de que la creación de perfiles de expresión de ciertos genes puede servir como alternativa para determinar la fosforilación o activación de HER. Esta circunstancia es particularmente ventajosa cuando la muestra que se examine pertenezca a una muestra fijada, ya que existe el reto técnico de evaluar con fiabilidad la fosforilación de HER2 en muestras fijas de tejidos o tumores. Las pacientes exploradas que reflejen el perfil de expresión deseado llevarán a identificar una subpoblación de pacientes que pueden obtener mayores beneficios clínicos de un inhibidor de HER como el pertuzumab.

Por consiguiente, en una primera realización, la invención ofrece un procedimiento para tratar el cáncer que comprende la administración a una paciente de una cantidad eficaz de un inhibidor de HER, con lo cual la muestra del tumor de la paciente expresa dos o más receptores HER y uno o más ligandos de HER.

Además, la invención proporciona un procedimiento para tratar el cáncer que comprende la administración a una paciente de una cantidad eficaz de un inhibidor de HER, con lo cual la muestra del tumor de la paciente expresa betacelulina o anfirregulina.

En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento para tratar el cáncer que comprende la administración a una paciente de una cantidad eficaz de un anticuerpo contra HER2 que se une al dominio II de HER2, con lo cual la muestra del tumor de la paciente expresa HER2 y EGFR o HER3, así como betacelulina o anfirregulina.

La invención también está relacionada con un procedimiento para evaluar la fosforilación o activación de HER en una muestra biológica que comprende la determinación de la expresión de dos o más receptores HER y uno o más ligandos de HER en la muestra, caso en que dicha expresión indica la fosforilación o activación de HER en la muestra.

Además, la invención se refiere a un procedimiento para evaluar la fosforilación o activación de HER en una muestra biológica que comprende la determinación de la expresión de betacelulina o anfirregulina en la muestra, caso en que dicha expresión indica la fosforilación o activación de HER en la muestra.

En otro aspecto, la invención ofrece un procedimiento para identificar a una paciente para una terapia con un inhibidor de la dimerización de HER que comprende la determinación de la expresión de dos o más receptores HER y uno o más ligandos de HER en una muestra de la paciente, caso en que dicha expresión indica que la paciente posiblemente responderá a la terapia con el inhibidor de la dimerización de HER.

La invención también se relaciona, en otro aspecto, con un procedimiento para tratar el cáncer de ovario que comprende la administración a una paciente de una cantidad eficaz de un inhibidor de HER, con lo cual la muestra del tumor de la paciente expresa betacelulina o anfirregulina.

Breve descripción de los dibujos

En la figura 1 se ofrece un esquema de la estructura de la proteína HER2, así como las secuencias de aminoácidos de los dominios I-IV (identificadores de secuencia núms. 19-22, respectivamente) del dominio extracelular de las mismas.

En las figuras 2A y 2B se representan las alineaciones de las secuencias de aminoácidos de los dominios variable ligero (V_L) (figura 2A) y variable pesado (V_H) (figura 2B) del anticuerpo murino monoclonal 2C4 (identificadores de secuencia núms. 1 y 2, respectivamente), los dominios V_L y V_H de la versión 574 del 2C4 humanizado (identificadores de secuencia núms. 3 y 4, respectivamente) y las estructuras de consenso del V_L y V_H humanos ($\kappa 1$ humano, subgrupo kappa ligero I; humano III, subgrupo pesado III) (identificadores de secuencia núms. 5 y 6, respectivamente). Los asteriscos identifican las diferencias entre la versión 574 del 2C4 humanizado y el anticuerpo murino monoclonal 2C4 o entre la versión 574 del 2C4 humanizado y la estructura humana. Las regiones de determinación de complementariedad (CDRs) aparecen entre paréntesis.

En las figuras 3A y 3B se muestran las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada del pertuzumab (identificadores de secuencia núms. 13 y 14, respectivamente). Las CDRs se muestran en negrita. La

masa molecular estimada de las cadenas ligera y pesada es de 23.526,22 Da y 49.216,56 Da (cisteínas en forma reducida). El residuo glucídico está unido al Asn 299 de la cadena pesada.

En la figura 4 se representa, esquemáticamente, la unión del 2C4 en el punto de unión heterodimérica de HER2, evitando por tanto la heterodimerización con el EGFR o HER3 activados.

En la figura 5 se representa la unión de HER2/HER3 a las rutas de MAPK y Akt.

En la figura 6 se comparan diversas actividades del trastuzumab y el pertuzumab.

En las figuras 7A y 7B se muestran las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera (figura 7A, identificador de secuencia N° 15) y pesada (figura 7B, identificador de secuencia N° 16), respectivamente, del trastuzumab.

En las figuras 8A y 8B se representan secuencias variantes de las cadenas ligera (figura 8A, identificador de secuencia N° 17) y pesada (figura 8B, identificador de secuencia N° 18), respectivamente, del pertuzumab.

En la figura 9 se muestran las estructuras de oligosacáridos que normalmente se observan en los anticuerpos IgG.

En la figura 10 se muestra la agrupación jerárquica de 25 tumores de pacientes con cáncer de ovario y estado conocido de fosforilación de HER2, empleando los valores de expresión del ARNm de HER2, el EGFR, HER3 y de la betacelulina determinados por el perfil de expresión de las micromatrices de AFFYMETRIX®.

En la figura 11 se representa el uso de la expresión del ARNm de HER2, EGFR, HER3 y de la betacelulina, determinada por el perfil de expresión de las micromatrices de AFFYMETRIX®, para pronosticar el estado de fosforilación de HER2.

En la figura 12 se representa la correlación de la expresión del ARNm de la betacelulina, determinada por el perfil de expresión de las micromatrices de AFFYMETRIX®, con el estado de fosforilación de HER2.

En la figura 13 se muestran las características del ensayo para las mediciones de la RT-PCR cuantitativa. El umbral del anillo (CT) cuantifica la expresión absoluta de ARNm.

En la figura 14 se muestra la agrupación jerárquica de 25 tumores de pacientes con cáncer de ovario y estado conocido de fosforilación de HER2, empleando los valores de expresión del ARNm de HER2, EGFR, HER3 y de la betacelulina, determinados mediante RT-PCR cuantitativa.

En la figura 15 se representa el uso de la expresión del ARNm de HER2, EGFR, HER3 y de la betacelulina, determinada mediante RT-PCR cuantitativa, para pronosticar el estado de fosforilación de HER2.

En la figura 16 se representa la correlación de la expresión del ARNm de la betacelulina, determinada mediante RT-PCR cuantitativa, con el estado de fosforilación de HER2.

En la figura 17 se representa la correlación de la expresión del ARNm de la anfirregulina, determinada mediante RT-PCR cuantitativa, con el estado de fosforilación de HER2.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

I. Definiciones

Un "receptor HER" es una proteína tirosina quinasa receptora perteneciente a la familia de receptores HER, que incluye los receptores EGFR, HER2, HER3 y HER4. El receptor HER comprende por lo general un dominio

124

extracelular, que puede unirse con un ligando de HER y/o dimerizarse con otra molécula receptora HER, un dominio de transmembrana lipófilo, un dominio de tirosina quinasa intracelular conservado y un dominio de señalización del extremo carboxilo terminal que alberga diversos residuos de tirosina que pueden fosforilarse. El receptor HER puede ser un receptor HER con "secuencia nativa" o una "variante de la secuencia de aminoácidos" del mismo.

Preferentemente, el receptor HER es un receptor HER humano con secuencia nativa.

Los términos "ErbB1," "HER1", "receptor del factor de crecimiento epidérmico" y "EGFR" se utilizan en la presente memoria descriptiva indistintamente y se refieren al EGFR tal como se desvela, por ejemplo, en Carpenter y col., *Ann. Rev. Biochem.*, 56:881-914 (1987), incluyendo formas mutantes del mismo que se producen de forma natural (por ejemplo, un EGFR mutante de eliminación, como se menciona en Humphrey y col., *PNAS (USA)*, 87:4207-4211 (1990)). *erbB1* se refiere al gen que codifica la proteína del EGFR.

Las expresiones "ErbB2" y "HER2" se utilizan en la presente memoria descriptiva indistintamente y hacen referencia a la proteína HER2 humana descrita, por ejemplo, en Semba y col., *PNAS (USA)*, 82:6497-6501 (1985) y Yamamoto y col., *Nature*, 319:230-234 (1986) (entrada número X03363 del Genbank). El término "*erbB2*" se refiere al gen que codifica la ErbB2 humana, y "*neu*" al gen que codifica la p185^{neu} de las ratas. La HER2 preferente es la HER2 humana con secuencia nativa.

El dominio extracelular de HER2 comprende cuatro dominios: "Dominio I" (residuos de aminoácidos desde el 1 al 195, aproximadamente; identificador de secuencia N° 19), "Dominio II" (residuos de aminoácidos desde el 196 al 319, aproximadamente; identificador de secuencia N° 20), "Dominio III" (residuos de aminoácidos desde el 320 al 488, aproximadamente; identificador de secuencia N° 21) y "Dominio IV" (residuos de aminoácidos desde el 489 al 630, aproximadamente; identificador de secuencia N° 22) (numeración de residuos sin péptido de señal). Véase Garrett y col., *Mol. Cell.*, 11: 495-505 (2003), Cho y col., *Nature*, 421: 756-760 (2003), Franklin y col., *Cancer Cell*, 5:317-328 (2004) y Plowman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:1746-1750 (1993), así como la figura 1 de la presente memoria descriptiva.

"ErbB3" y "HER3" se refieren al polipéptido receptor tal como se desvela, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. núms. 5.183.884 y 5.480.968, así como Kraus y col., *PNAS (USA)*, 86:9193-9197 (1989).

Los términos "ErbB4" y "HER4" se refieren en la presente memoria descriptiva al polipéptido receptor tal como se desvela, por ejemplo, en la solicitud de patente europea N° 599.274, Plowman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993) y Plowman y col., *Nature*, 366:473-475 (1993), incluyendo isoformas del mismo, por ejemplo, como se desvela en el documento WO99/19488, publicado el 22 de abril de 1999.

Por "ligando de HER" se entiende un polipéptido que se une a, y/o activa, un receptor HER. El ligando de HER de particular interés en la presente memoria descriptiva es un ligando de HER humana con secuencia nativa como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Savage y col., *J. Biol. Chem.*, 247:7612-7621 (1972)), el factor alfa de crecimiento tumoral (TGF- α) (Marquardt y col., *Science*, 223:1079-1082 (1984)), la anfirregulina, conocida también como "schwanoma" o factor de crecimiento autocrino de la queratinocita (Shoyab y col., *Science*, 243:1074-1076 (1989); Kimura y col., *Nature*, 348:257-260 (1990) y Cook y col., *Mol. Cell. Biol.*, 11:2547-2557 (1991)), la betacelulina (Shing y col., *Science*, 259:1604-1607 (1993) y Sasada y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190:1173 (1993)), el factor de crecimiento epidérmico ligado a la heparina (HB-EGF) (Higashiyama y col., *Science*,

24/125

251:936-939 (1991)), la epirregulina (Toyoda y col., *J. Biol. Chem.*, 270:7495-7500 (1995) y Komurasaki y col., *Oncogene*, 15:2841-2848 (1997)), una heregulina (véase a continuación), la neurregulina-2 (NRG-2) (Carraway y col., *Nature*, 387:512-516 (1997)), la neurregulina-3 (NRG-3) (Zhang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:9562-9567 (1997)), la neurregulina-4 (NRG-4) (Harari y col., *Oncogene*, 18:2681-89 (1999)) y la proteína cripto (CR-1) (Kannan y col., *J. Biol. Chem.*, 272(6):3330-3335 (1997)). Los ligandos de HER que se unen al EGFR incluyen el EGF, el TGF- α , la anfirregulina, la betacelulina, el HB-EGF y la epirregulina. Los ligandos de HER que se unen a HER3 incluyen las heregulinas. Los ligandos de HER capaces de unirse a HER4 incluyen la betacelulina, la epirregulina, el HB-EGF, la NRG-2, la NRG-3, la NRG-4 y las heregulinas.

"Heregulina" (HRG), en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a un polipéptido codificado por el gen de la heregulina tal como se desvela en la patente de EE.UU. N° 5.641.869 o Marchionni y col., *Nature*, 362:312-318 (1993). Entre las heregulinas se incluyen la heregulina- α , la heregulina- β 1, la heregulina- β 2 y la heregulina- β 3 (Holmes y col., *Science*, 256:1205-1210 (1992) y la patente de EE.UU. N° 5.641.869), el factor de diferenciación del *neu* (NDF) (Peles y col., *Cell*, 69: 205-216 (1992)), la actividad inductora del receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls y col., *Cell*, 72:801-815 (1993)), los factores de crecimiento glial (GGFs) (Marchionni y col., *Nature*, 362:312-318 (1993)), el factor sensorial y motoneuronal derivado (SMDF) (Ho y col., *J. Biol. Chem.*, 270:14523-14532 (1995)) y la γ -heregulina (Schaefer y col., *Oncogene*, 15:1385-1394 (1997)).

La "expresión" de proteínas se refiere a la conversión de la información codificada en un gen primero en ARN mensajero (ARNm) y después en proteína.

En la presente memoria descriptiva, una muestra o célula que "expresa" una proteína de interés (como un receptor HER o ligando de HER) es aquella en que se determina la presencia del ARNm que codifica la proteína, o la propia proteína.

Ejemplos de genes de "mantenimiento" que pueden usarse para normalizar los genes son la glucuronidasa (GUS), la B-actina y la PRL 19, siendo la GUS el preferente por exhibir la menor variación de expresión a través de las diversas muestras probadas en la presente memoria descriptiva.

La técnica de la "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere por lo general a un procedimiento en que se amplifican pequeñas cantidades de un ácido nucleico específico, ARN y/o ADN, tal como se describe en la patente de EE.UU. N° 4.683.195 concedida el 28 de julio de 1987. Normalmente, la información sobre la secuencia obtenida en los extremos de la región de interés o más allá de esos puntos debe estar disponible, como por ejemplo que pueden diseñarse cebadores de oligonucleótidos, los cuales pueden ser idénticos o similares en su secuencia a las hebras complementarias del molde que debe amplificarse. Los nucleótidos terminales 5' de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR puede usarse para amplificar secuencias específicas de ARN, secuencias específicas de ADN del ADN genómico total y ADNc transcrito del ARN celular total, bacteriófagos o secuencias plasmídicas, etc. Véase generalmente Mullis y col., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989). Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, la PCR se considera un ejemplo, pero no el único, de un procedimiento de reacción de la polimerasa de un ácido nucleico para amplificar una muestra de prueba de ácido nucleico, que comprende el uso de un ácido nucleico conocido (ADN o ARN) como cebador y

emplea la polimerasa del ácido nucleico para amplificar o generar un ácido nucleico específico o uno complementario de un ácido nucleico particular.

La "reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real" (RT-PCR cuantitativa) se refiere a una forma de PCR en que la cantidad de producto que la reacción genera se mide en cada una de sus etapas. Esta técnica se ha descrito en varias publicaciones, incluyendo Cronin y col., *supra*, y Ma y col., *supra*.

El término "micromatriz" hace referencia a una disposición ordenada de los elementos matriciales susceptibles de hibridación, preferentemente sondas de polinucleótidos, que haya en un sustrato.

El término "polinucleótido", tanto en forma singular como plural, se refiere por lo general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o modificado. De esta manera, por ejemplo, los polinucleótidos tal como se definen en la presente memoria descriptiva incluyen, sin limitación, ADN de hebra simple y doble, ADN con regiones de hebra simple y doble, ARN de hebra simple y doble, ARN con regiones de hebra simple y doble y moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser de hebra simple o, más típicamente, doble o incluir regiones de hebra simple y doble. Además, el término "polinucleótido", en el contexto de la presente memoria descriptiva, también se refiere a regiones de hebra triple que comprenden ARN o ADN o ambos ácidos a la vez. Las hebras de estas regiones pueden ser de la misma o distintas moléculas. Las regiones pueden incluir todas, una o más moléculas, pero normalmente sólo abarcan una región formada por algunas moléculas. Una de las moléculas de una región de hélice triple es a menudo un oligonucleótido. El término "polinucleótido" incluye específicamente el ADNc. El término engloba al ADN (incluido el ADNc) y el ARN con una o más bases modificadas. Así, el ADN y el ARN con columnas modificadas por razones de estabilidad u otras son "polinucleótidos" en el sentido que se pretende en la presente memoria descriptiva. Además, el ADN o ARN que comprende bases inusuales, como la inopina, o modificadas, como las tritiadas, se incluye dentro del término "polinucleótido" tal como se define en la presente memoria descriptiva. En general, el término "polinucleótido" abarca todas las formas química, enzimática y/o metabólicamente modificadas de los polinucleótidos no modificados, así como las formas químicas de ADN y ARN características de los virus y las células, incluyendo células simples y complejas.

El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido relativamente corto, incluyendo, sin limitación, los desoxirribonucleótidos de hebra simple, los ribonucleótidos de hebra simple o doble, los híbridos de ARN:ADN y el ADN de hebra doble. Los oligonucleótidos, como los oligonucleótidos de sonda de ADN de hebra simple, se sintetizan a menudo mediante procedimientos químicos, usando por ejemplo sintetizadores automatizados de oligonucleótidos disponibles en el mercado. De todos modos, los oligonucleótidos pueden obtenerse a través de otros procedimientos, incluyendo las técnicas in vitro de mediación del ADN recombinante o por expresión del ADN en células y organismos.

La frase "amplificación génica" se refiere a un procedimiento por el cual se forman múltiples copias de un gen o fragmento de gen en una célula o línea celular en particular. La región duplicada (un tramo del ADN amplificado) recibe a menudo el nombre de "amplión". Normalmente, la cantidad de ARN mensajero (ARNm) producida también aumenta en proporción a la cantidad de copias realizadas del gen particular expresado.

~~128~~ 127

Cualquier experto en la materia puede determinar rápidamente las "condiciones restrictivas" de las reacciones de hibridación, tratándose por lo general de un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración de sal. En general, para realizar una hibridación correcta, las sondas más largas requieren temperaturas superiores, y viceversa. La hibridación depende habitualmente de la capacidad de rehibridación del ADN desnaturalizado ante la presencia de hebras complementarias en un entorno con temperatura inferior a su punto de fusión. Cuanto más elevado sea el grado deseado de homología entre la sonda y la secuencia susceptible de hibridación, más alta será la temperatura relativa que podrá emplearse. Como resultado, las temperaturas relativas más altas tenderán a perfilar unas condiciones de reacción más restrictivas, mientras que las más bajas desarrollarán unas condiciones restrictivas menores. Para más detalles y una explicación sobre las condiciones restrictivas de las reacciones de hibridación, véase Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

Las "condiciones restrictivas" o "condiciones muy restrictivas", tal como se definen en la presente memoria descriptiva, típicamente: (1) emplean para el lavado una concentración iónica baja y temperaturas altas, por ejemplo, 0,015 M de cloruro sódico/0,0015 M de citrato sódico/0,1% de sulfato sódico de dodecilo a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante, como la formamida, por ejemplo, 50% (v/v) de formamida con 0,1% de albúmina de suero bovino/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/tampón de fosfato sódico 50 mM con un pH 6,5 y 750 mM de cloruro sódico, 75 mM de citrato sódico a 42 °C; o (3) emplean 50% de formamida, SSC 5x (NaCl 0,75 M, 0,075 M de citrato sódico), 50 mM de fosfato sódico (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato sódico, solución de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmón sonificado (50 gr; g/ml), 0,1% de SDS y 10% de sulfato de dextrano a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSC 0,2x (cloruro sódico/citrato sódico) y 50% de formamida a 55 °C, seguido de un lavado muy restrictivo compuesto por SSC 0,1x con EDTA a 55 °C.

Las "condiciones moderadamente restrictivas" pueden identificarse tal como se describe en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de una solución de lavado y unas condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, concentración iónica y porcentaje de SDS) menos restrictivas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente restrictivas sería la incubación durante toda la noche a 37 °C en una solución que comprenda: 20% de formamida, SSC 5x (NaCl 150 mM, 15 mM de citrato trisódico), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, 10% de sulfato de dextrano y 20 mg/ml de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, seguido de un lavado de los filtros en SSC 1x a una temperatura de entre 37 y 50 °C. El experto en la materia sabrá cómo ajustar la temperatura, la concentración iónica, etc, como sea necesario para integrar factores como la longitud de la sonda y otros similares.

Un "dímero de HER" es, en la presente memoria descriptiva, un dímero asociado de forma no covalente que comprende al menos dos receptores HER distintos. Estos complejos pueden formarse cuando una célula que expresa dos o más receptores HER se expone a un ligando de HER y puede aislarse por inmunoprecipitación y analizarse mediante SDS-PAGE tal como se describe, por ejemplo, en Sliwkowski y col., *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994). Ejemplos de estos dímeros de HER serían los heterodímeros EGFR-HER2, HER2-HER3 y HER3-HER4. Además, el dímero de HER puede comprender dos o más receptores HER2 combinados con un receptor HER

diferente, como HER3, HER4 o EGFR. Otras proteínas, como una subunidad receptora de citoquina (*por ejemplo*, gp130), pueden asociarse con el dímero.

Un "inhibidor de HER" es un agente que interfiere en la activación o función de HER. Los ejemplos de inhibidores de HER incluyen los anticuerpos contra HER (*por ejemplo*, los anticuerpos contra el EGFR, HER2, HER3 o HER4), los fármacos que actúan sobre el EGFR, los antagonistas de HER de molécula pequeña, los inhibidores de la tirosina quinasa HER, las moléculas antisentido (véase, *por ejemplo*, el documento WO2004/87207) y/o los agentes que se unen a, o interfieren en la función de, las moléculas de señalización descendente, como MAPK o Akt (véase la figura 5). Preferentemente, el inhibidor de HER es un anticuerpo o una pequeña molécula que se une a un receptor HER.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "fármaco que actúa sobre el EGFR" se refiere a un agente terapéutico que se une al EGFR y, opcionalmente, inhibe su activación. Ejemplos de estos agentes serían los anticuerpos y las pequeñas moléculas que se unen al EGFR. Ejemplos de anticuerpos que se unen al EGFR serían los anticuerpos MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508) y MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase la patente de EE.UU. N° 4.943. 533, Mendelsohn *y col.*), así como variantes de los mismos, como el 225 quimerizado (225q o Cetuximab; ERBUTIX®) y el 225 humano reorganizado (225h) (véase el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.), los anticuerpos que se unen al EGFR mutante de clase II (patente de EE.UU. N° 5.212.290), los anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen al EGFR, tal como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.891.996, y los anticuerpos humanos que se unen al EGFR, como el ABX-EGF (véase el documento WO98/50433, Abgenix), el EMD 55900 (Stragliotto *y col.*, *Eur. J. Cancer*, 32A:636-640 (1996)) y el mAb 806 o el mAb 806 humanizado (Johns *y col.*, *J. Biol. Chem.*, 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo contra el EGFR puede conjugarse con un agente citotóxico, generando de este modo un inmunoconjugado (véase, *por ejemplo*, la patente europea 659.439A2, Merck Patent GmbH). Ejemplos de pequeñas moléculas que se unen al EGFR serían la ZD1839 o Gefitinib (IRESSA™; Astra Zeneca), la CP-358774 o Erlotinib HCL (TARCEVA™; Genentech/OSI) y la AG1478 y la AG1571 (SU 5271; Sugen).

Un "inhibidor de la tirosina quinasa" es una molécula que inhibe la actividad de una tirosina quinasa como pueda ser un receptor HER. Ejemplos de estos inhibidores serían los fármacos que actúan sobre el EGFR mencionados en el párrafo anterior, un inhibidor de la tirosina quinasa HER2 de pequeña molécula como el TAK165 comercializado por Takeda, los inhibidores dobles de HER como el EKB569 (comercializado por Wyeth) que preferentemente se unen al EGFR pero inhiben las células que sobreexpresan tanto HER2 como EGFR, el GW572016, un inhibidor oral de la tirosina quinasa HER2 y el EGFR (comercializado por Glaxo), el PKI-166 (comercializado por Novartis), los paninhibidores de HER como el canertinib (CI-1033; Pharmacia), los inhibidores de Raf-1 como el agente antisentido ISIS-5132, comercializado por ISIS Pharmaceuticals, que inhibe la señalización de Raf-1, los inhibidores de TK no dirigidos contra HER como el mesilato de imatinib (Gleevec™) comercializado por Glaxo, el inhibidor CI-1040 de la quinasa I regulada por la MAPK extracelular (comercializado por Pharmacia), las quinazolininas, como la quinazolinina PD 153035, 4-(3-cloroanilino), las piridopirimidinas, las pirimidopirimidinas, las pirrolopirimidinas, como la CGP 59326, la CGP 60261 y la CGP 62706, las pirazolopirimidinas, pirimidinas 4-(fenilamino)-7H-pirrol[2,3-d], el curcumin (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoroanilino) ftalimida), las tirfostinas que

contienen residuos de nitrotiofeno, el PD-0183805 (Warner-Lamber), las moléculas antisentido (*por ejemplo*, aquéllas que se unen al ácido nucleico que codifica la HER), las quinoxalinas (patente de EE.UU. N° 5.804.396), las trifostinas (patente de EE.UU. N° 5.804.396), el ZD6474 (Astra Zeneca), el PTK-787 (Novartis/Schering AG), los paninhibidores de HER como el CI-1033 (Pfizer), el Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly), el mesilato de imatinib (Gleevac; Novartis), el PKI 166 (Novartis), el GW2016 (Glaxo SmithKline), el CI-1033 (Pfizer), el EKB-569 (Wyeth), el semaxinib (Sugen), el ZD6474 (AstraZeneca), el PTK-787 (Novartis/Schering AG) y el INC-1C11 (Imclone), o como se describa en cualquiera de las siguientes publicaciones de patentes: la patente de EE.UU. N° 5.804.396, el documento WO99/09016 (American Cyanimid), el documento WO98/43960 (American Cyanamid), el documento WO97/38983 (Warner Lambert), el documento WO99/06378 (Warner Lambert), el documento WO99/06396 (Warner Lambert), el documento WO96/30347 (Pfizer, Inc), el documento WO96/33978 (Zeneca), el documento WO96/3397 (Zeneca) y el documento WO96/33980 (Zeneca).

Un "inhibidor de la dimerización de HER" es un agente que inhibe la formación de un dímero de HER. Preferentemente, el inhibidor de la dimerización de HER es un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo que se una a HER2 en el punto de unión heterodimérica del mismo. El inhibidor de la dimerización más preferente en la presente memoria descriptiva es el pertuzumab o el MAb 2C4. La unión del 2C4 en el punto de unión heterodimérica de HER2 se ilustra en la figura 4. Otros ejemplos de inhibidores de la dimerización de HER serían los anticuerpos que se unen al EGFR e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de los otros receptores HER (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 806 contra el EGFR, el MAb 806, que se une al EGFR activado o "desligado"; véase Johns y col., *J. Biol. Chem.*, 279(29):30375-30384 (2004)), los anticuerpos que se unen a HER3 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de los otros receptores HER, los anticuerpos que se unen a HER4 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de los otros receptores HER, los inhibidores de la dimerización de péptidos (patente de EE.UU. N° 6.417.168), los inhibidores de la dimerización de antisentidos, etc.

Un "punto de unión heterodimérica" en HER2 se refiere a una región del dominio extracelular de HER2 que contacta, o interactúa, con una región del dominio extracelular del EGFR, HER3 o HER4 ante la formación de un dímero del mismo. La región se encuentra en el dominio II de HER2. Franklin y col., *Cancer Cell*, 5:317-328 (2004).

La "activación de HER" se refiere a la activación, o fosforilación, de uno o más receptores HER. Por lo general, la activación de HER resulta en la transducción de la señal (*por ejemplo*, la causada por un dominio intracelular de la quinasa de un receptor HER que fosforila residuos de tirosina en el receptor HER o un sustrato de polipéptidos). En la activación de HER puede mediar el ligando de HER que se une a un dímero de HER que comprende el receptor HER de interés. El ligando de HER que se une a un dímero de HER puede activar un dominio de quinasa de uno o más de los receptores HER del dímero y, por tanto, resulta en la fosforilación de residuos de tirosina en uno o más de los receptores HER y/o la fosforilación de residuos de tirosina en sustratos adicionales de polipéptidos, como las quinasas Akt o MAPK intracelulares. Véase la figura 5 por ejemplo.

La "fosforilación" se refiere a la adición de uno o más grupos fosfato a una proteína, como un receptor HER, o un sustrato de la misma.

Un polipéptido con "secuencia nativa" es aquél que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (*por ejemplo*, un receptor HER o ligando de HER) obtenido de la naturaleza. Dichos polipéptidos con

secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o producirse por medios sintéticos o de recombinación. Así, un polipéptido con secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos que se encuentra de forma natural en el polipéptido humano, murino o de cualquier otra especie de mamífero.

El término "anticuerpo" se emplea en la presente memoria descriptiva en su sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales intactos, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, los anticuerpos biespecíficos) formados a partir de, al menos, dos anticuerpos intactos y los fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

El término "anticuerpo monoclonal", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, *es decir*, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto en el caso de posibles variantes que pudiesen surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando dichas variantes, por lo general, presentes en cantidades insignificantes. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de no estar contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" revela la característica del anticuerpo de que se ha obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como una indicación de que sea necesario producir el anticuerpo por algún procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que deben usarse de acuerdo con la presente invención pueden conseguirse por el método del hibridoma, descrito por primera vez en Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975), o con ADN recombinante (véase, *por ejemplo*, la patente de EE.UU. N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de librerías de anticuerpos fágicos empleando las técnicas descritas en Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

En la presente memoria descriptiva, los anticuerpos monoclonales incluyen específicamente los anticuerpos "quiméricos" en los cuales una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. N° 4.816.567 y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria descriptiva incluyen los anticuerpos "primatizados", que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominios variables obtenidas de un primate no humano (*por ejemplo*, el mono del Viejo Mundo, el simio, etc.) y secuencias humanas de regiones constantes.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que preferentemente comprende la región de unión a antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos serían los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, los diacuerpos, los anticuerpos lineales, las moléculas anticuerpos de cadena única y los anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

En la presente memoria descriptiva, un "anticuerpo intacto" es aquél que comprende dos regiones de unión a antígeno y una región Fc. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

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

Las "funciones efectoras" de un anticuerpo hacen referencia a aquellas actividades biológicas atribuibles a una región Fc (la región Fc de una secuencia nativa o la región Fc variante de una secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de los anticuerpos serían la unión de C1q, la citotoxicidad dependiente de complementos, la unión de receptores de Fc, la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis, el descenso del nivel de regulación de los receptores en la superficie celular (*por ejemplo*, el receptor de células B (BCR)), etc.

La "citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos" y las siglas "ADCC" se refieren a una reacción con mediación celular en la cual las células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcRs) (*por ejemplo*, las células asesinas naturales (NK), los neutrófilos y los macrófagos) reconocen el anticuerpo unido a una célula diana y posteriormente producen la lisis de ésta. Las principales células que median en la ADCC, las células NK, sólo expresan Fc γ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). A fin de evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, como el que se describe en las patentes de EE.UU. núms. 5.500.362 ó 5.821.337. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se encontrarían las células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC) y las asesinas naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, *por ejemplo*, en un modelo animal como el que se desvela en Clynes y col., *PNAS (USA)*, 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos el Fc γ RIII y realizan la función efectora de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC serían las células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC), las células asesinas naturales (NK), los monocitos, las células T citotóxicas y los neutrófilos, siendo las PBMC y las NK las células preferentes. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, *por ejemplo*, la sangre o las PBMC tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se emplean para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano con secuencia nativa. Además, un FcR preferente es aquél que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) y pertenece a las subclases de receptores Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, incluyendo las variantes alélicas y las formas enlazadas alternativamente de estos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen el Fc γ RIIA (un "receptor activador") y el Fc γ RIIB (un "receptor inhibidor"), los cuales tienen secuencias de

aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor activador FcγRIIA contiene en su dominio citoplásmico un motivo activador inmunorreceptor basado en la tirosina (ITAM). El receptor inhibidor FcγRIIB contiene en su dominio citoplásmico un motivo inhibidor inmunorreceptor basado en la tirosina (ITIM) (véase una reseña al respecto en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). En Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991), Capel y col., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994) y de Haas y col., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995) también se revisan los FcRs. Otros FcRs, incluyendo aquéllos que se identifiquen en el futuro, se engloban bajo el término "FcR" empleado en la presente memoria descriptiva. Este término también incluye el receptor neonatal, FcRn, responsable de la transferencia de los IgGs maternos al feto (Guyer y col., *J. Immunol.*, 117:587 (1976) y Kim y col., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula de producir la lisis de una sustancia objetivo en presencia del complemento. La ruta de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (*por ejemplo*, un anticuerpo) que forme complejo con un antígeno cognado. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede efectuar un ensayo de CDC, *por ejemplo*, tal como se describe en Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

Los "anticuerpos nativos" son por lo general glicoproteínas heterotetraméricas con una masa atómica de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una pesada mediante un enlace covalente disulfuro, mientras que la cantidad de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas con distintos isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes disulfuro separados regularmente dentro de la cadena. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una cantidad de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y uno constante en el otro. El dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que ciertos residuos particulares de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y la pesada.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en sus secuencias de un anticuerpo a otro y se utilizan para la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular con relación a su antígeno particular. De todos modos, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos, denominados regiones hipervariables, de los dominios variables tanto de la cadena ligera como la pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se llaman regiones de estructura (FRs). Cada dominio variable de las cadenas pesada y ligera nativas comprende cuatro FRs que, en gran parte, adoptan una configuración de hoja-β. Dichas FRs están conectadas por tres regiones hipervariables que crean bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de la hoja-β. Las FRs mantienen unidas y en estrecha proximidad las regiones hipervariables de cada cadena, las cuales, junto con las de las otras, contribuyen a la formación del punto de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en el proceso de unión al antígeno de un

anticuerpo, pero desarrollan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo responsables de la unión antigénica. La región hipervariable generalmente comprende residuos de aminoácidos de una "región de determinación de complementariedad" o "CDR" (*por ejemplo*, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (*por ejemplo*, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)). Los residuos de una "región estructural" o "FR" son aquellos residuos de un dominio variable distintos de los de una región hipervariable, tal como se define en la presente memoria descriptiva.

La digestión con papaina de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno de ellos con un solo punto de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos puntos de unión a antígeno y todavía es capaz de establecer un enlace cruzado con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un punto completo de reconocimiento y unión a antígeno. Esta región está compuesta por un dímero de un dominio variable de cadena pesada y otro de cadena ligera en una estrecha asociación no covalente. En esta configuración, las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un punto de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L . Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo una especificidad de unión a antígeno. No obstante, incluso un dominio variable simple (o la mitad de un Fv que comprenda únicamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer un antígeno y unirse a él, aunque con una afinidad inferior que el punto de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de un anticuerpo. Fab'-SH es la designación que se da en la presente memoria descriptiva a los Fab' en que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes presenta(n) al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' con cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros emparejamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

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

Los fragmentos "Fv de cadena simple" o "scFv" de un anticuerpo comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo presentes en una cadena simple de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende también

un enlazador de polipéptidos entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión antígena. Para una reseña sobre los scFv, véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, volumen 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, páginas 269-315 (1994). Los fragmentos scFv de los anticuerpos contra HER2 se describen en el documento WO93/16185, la patente de EE.UU. N° 5.571.894 y la patente de EE.UU. N° 5.587.458.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos puntos de unión a antígeno que comprenden un dominio variable pesado (V_H) conectado a un dominio variable ligero (V_L) en la misma cadena de polipéptidos ($V_H - V_L$). Mediante el uso de un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, estos dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos puntos de unión antígena. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, la patente europea 404.097, el documento WO 93/11161 y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por los residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como el ratón, la rata, el conejo o los primates no humanos, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de estructura (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por sus correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentren en el anticuerpo receptor o donante. Estas modificaciones se llevan a cabo para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables (o al menos uno, y típicamente dos) en que todos, o sustancialmente todos, los bucles hipervariables correspondan a los de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las FR sean las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente humana. Para más detalles, véase Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986), Riechmann y col., *Nature*, 332:323-329 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

Los anticuerpos contra HER2 humanizados incluyen el huMAb4D5-1, el huMAb4D5-2, el huMAb4D5-3, el huMAb4D5-4, el huMAb4D5-5, el huMAb4D5-6, el huMAb4D5-7 y el huMAb4D5-8 o trastuzumab (HERCEPTIN®), tal como se describe en la tabla 3 de la patente de EE.UU. 5.821.337 expresamente incorporada en la presente memoria descriptiva por referencia, así como los anticuerpos humanizados 520C9 (documento WO93/21319) y 2C4, tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

Para los propósitos de la presente memoria descriptiva, "trastuzumab", "HERCEPTIN®" y "huMAb4D5-8" hacen referencia a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos con cadenas ligera y pesada en los identificadores de secuencia núms. 15 y 16, respectivamente.

En la presente memoria descriptiva, "pertuzumab" y "OMNITARG™" se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos con cadenas ligera y pesada en los identificadores de secuencia núms. 13 y 14, respectivamente.

Las diferencias entre las funciones del trastuzumab y las del pertuzumab se ilustran en la figura 6.

Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo que no se conjuga con una molécula heteróloga, como un segmento citotóxico o una etiqueta radiactiva.

Un anticuerpo "aislado" es aquél que se ha identificado y separado, y/o recuperado, a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir en el diagnóstico o los usos terapéuticos del anticuerpo, incluyendo enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos y no proteináceos. En las realizaciones preferentes, el anticuerpo se purificará (1) en más del 95% de su peso tal como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente, en más del 99% de su peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia N terminal o interna de aminoácidos mediante un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta alcanzar la homogeneidad mediante SDS-PAGE, en condiciones reductoras o no reductoras, empleando una tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, plata. Los anticuerpos aislados incluyen el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. De todas formas, normalmente, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo con "maduración de afinidad" es aquél con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables del mismo que resultan en una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo padre que no posee dicha(s) alteración(es). Los anticuerpos con maduración de afinidad preferentes tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares con el antígeno diana. Los anticuerpos con maduración de afinidad se producen mediante procedimientos bien conocidos en el sector. En Marks *y col.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992), se describe la maduración de afinidad a través de la eliminación de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de la CDR y/o los residuos estructurales se describen en: Barbas *y col.*, *Proc Nat. Acad. Sci, USA*, 91:3809-3813 (1994), Schier *y col.*, *Gene*, 169:147-155 (1995), Yelton *y col.*, *J. Immunol.*, 155:1994-2004 (1995), Jackson *y col.*, *J. Immunol.*, 154(7):3310-9 (1995) y Hawkins *y col.*, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992).

Un anticuerpo contra HER2 que "inhibe la dimerización de HER con mayor eficacia que el trastuzumab" es aquél que reduce o elimina los dímeros de HER con mayor eficacia (por ejemplo, al menos con el doble de eficacia) que el trastuzumab. Preferentemente, un anticuerpo de estas características inhibe la dimerización de HER2 al menos con la misma eficacia que un anticuerpo seleccionado del grupo formado por el anticuerpo 2C4 monoclonal murino, un fragmento Fab del anticuerpo 2C4 monoclonal murino, el pertuzumab y un fragmento Fab de pertuzumab. La inhibición de la dimerización de HER se puede evaluar estudiando los dímeros de HER directamente, o evaluando la activación de HER, la señalización descendiente que resulta de la dimerización de HER y/o el punto de unión entre el anticuerpo y HER2. Los ensayos de exploración de anticuerpos capaces de inhibir la dimerización de HER con mayor eficacia que el trastuzumab se describen en Agus *et al.*, *Cancer Cell*, 2: 127-137 (2002) y el documento WO01/00245 (Adams *y col.*). Sólo mediante ejemplos, se puede probar la inhibición de la dimerización de HER

evaluando, por ejemplo, la inhibición de la formación de dímeros de HER (véase, *por ejemplo*, las figuras 1A-B de Agus y col., *Cancer Cell*, 2: 127-137 (2002) y el documento WO01/00245), la reducción en la activación del ligando de HER de células que expresen dímeros de HER (documento WO01/00245 y figuras 2A-B de Agus y col., *Cancer Cell*, 2: 127-137 (2002), *por ejemplo*), el bloqueo de la unión del ligando de HER a células que expresen dímeros de HER (documento WO01/00245 y figura 2E de Agus y col., *Cancer Cell*, 2: 127-137 (2002), *por ejemplo*), la inhibición del crecimiento celular de las células cancerosas (*por ejemplo*, las células MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175 y T-47D) que expresen dímeros de HER en presencia (o ausencia) de un ligando de HER (documento WO01/00245 y figuras 3A-D de Agus y col., *Cancer Cell*, 2: 127-137 (2002), *por ejemplo*) y la inhibición de la señalización descendiente (*por ejemplo*, la inhibición de la fosforilación de la AKT dependiente de la heregulina o la inhibición de la fosforilación de la MAPK dependiente de la heregulina o el TGF α) (véase, el documento WO01/00245 y las figuras 2C-D de Agus y col., *Cancer Cell*, 2: 127-137 (2002), *por ejemplo*). También se puede evaluar si el anticuerpo inhibe la dimerización de HER estudiando el punto de unión entre el anticuerpo y HER2, *por ejemplo*, mediante un proceso de evaluación de una estructura o modelo, como una estructura cristalizada, de la unión del anticuerpo a HER2 (véase, *por ejemplo*, Franklin y col., *Cancer Cell*, 5:317-328 (2004)).

El anticuerpo contra HER2 puede "inhibir la fosforilación de la AKT dependiente de la heregulina" y/o inhibir la "fosforilación de la MAPK dependiente de heregulina o el TGF α " con mayor eficacia (*por ejemplo*, al menos con el doble de eficacia) que el trastuzumab (véase, Agus y col., *Cancer Cell*, 2: 127-137 (2002) y el documento WO01/00245, *por ejemplo*).

El anticuerpo contra HER2 puede "no inhibir la escisión del ectodominio de HER2" (Molina y col., *Cancer Res.*, 61:4744-4749 (2001)).

Un anticuerpo contra HER2 que "se une a un punto de unión heterodimérica" de HER2 se une a residuos del dominio II (y opcionalmente también se une a residuos de los otros dominios del dominio extracelular de HER2, como los dominios I y III), y puede impedir estéricamente, al menos hasta cierto grado, la formación de un heterodímero de HER2-EGFR, HER2-HER3 o HER2-HER4. En Franklin y col., *Cancer Cell*, 5:317-328 (2004) se caracteriza la estructura cristalizada del pertuzumab de HER2, depositada en el Banco de Datos sobre Proteínas RCSB (código de identificación IS78), ilustrando un ejemplo de anticuerpo que se une al punto de unión heterodimérica de HER2.

Un anticuerpo que "se une al dominio II" de HER2 se une a residuos del dominio II y, opcionalmente, de otro(s) dominio(s) de HER2, como los dominios I y III. Preferentemente, el anticuerpo que se une al dominio II lo hace en el enlace entre los dominios I, II y III de HER2.

En la presente memoria descriptiva, el término "anticuerpo principal de la especie" se refiere a la estructura de un anticuerpo en una composición que es la molécula de anticuerpo cuantitativamente predominante en la composición. En una realización, el anticuerpo principal de la especie es un anticuerpo contra HER2, como pueda ser un anticuerpo que se una al dominio II de HER2, un anticuerpo que inhiba la dimerización de HER con mayor eficacia que el trastuzumab y/o un anticuerpo que se una a un punto de unión heterodimérica de HER2. La realización preferente en la presente memoria descriptiva del anticuerpo principal de la especie es uno que comprenda las secuencias variables de aminoácidos ligera y pesada en los identificadores de secuencia núms. 3 y 4, y

más preferentemente las secuencias de aminoácidos con cadenas ligera y pesada en los identificadores de secuencia núms. 13 y 14 (pertuzumab).

En la presente memoria descriptiva, un anticuerpo con "una variante de la secuencia de aminoácidos" es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos distinta a la de un anticuerpo principal de la especie. Normalmente, las variantes de las secuencias de aminoácidos poseerán al menos un nivel del 70% de homología con el anticuerpo principal de la especie y serán homólogas de éste preferentemente al menos en el 80%, aproximadamente, y aún más preferentemente al menos en el 90%, aproximadamente. Las variantes de las secuencias de aminoácidos poseen sustituciones, eliminaciones y/o adiciones en ciertas posiciones dentro de, o contiguas a, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo principal de la especie. En la presente memoria descriptiva, ejemplos de variantes de la secuencia de aminoácidos serían la variante ácida (*por ejemplo*, la variante de un anticuerpo desamidado), la variante básica, el anticuerpo con una extensión líder amino terminal (*por ejemplo*, VHS-) en una o dos cadenas ligeras del mismo, el anticuerpo con un residuo de lisina terminal-C en una o dos cadenas pesadas del mismo y las combinaciones de variantes de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y/o ligera. La variante de anticuerpo de particular interés en la presente memoria descriptiva es el anticuerpo que comprende una extensión líder amino terminal en una o dos cadenas ligeras del mismo y, opcionalmente, otras secuencias de aminoácidos y/o diferencias de glicosilación relativas al anticuerpo principal de la especie.

En la presente memoria descriptiva, un anticuerpo con "variante de glicosilación" es aquél que tiene unidos uno o más residuos glucídicos y difiere de uno o más residuos glucídicos unidos al anticuerpo principal de la especie. Ejemplos de variantes de glicosilación serían en la presente memoria descriptiva el anticuerpo con una estructura de oligosacáridos G1 o G2, en lugar de la G0, unida a una región Fc del mismo, el anticuerpo con uno o dos residuos glucídicos unidos a una o dos cadenas ligeras del mismo, el anticuerpo sin glúcidos unidos a una o dos cadenas pesadas del mismo y las combinaciones de alteraciones de glicosilación.

Si el anticuerpo tiene una región Fc, una estructura de oligosacáridos como la mostrada en la figura 9 de la presente memoria descriptiva puede unirse a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, *por ejemplo*, en el residuo 299 (298 en la numeración europea de residuos). En el caso del pertuzumab, la G0 era la estructura de oligosacáridos predominante, aunque también se encontraron en cantidades menores otras estructuras de oligosacáridos, como la G0-F, la G-1, la Man5, la Man6, la G1-1, la G1(1-6), la G1(1-3) y la G2, en la composición del pertuzumab. A menos que se indique lo contrario, una "estructura de oligosacáridos G1" incluye en la presente memoria descriptiva las estructuras G-1, G1-1, G1(1-6) y G1(1-3).

En la presente memoria descriptiva, una "extensión líder amino terminal" se refiere a uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia líder amino terminal presentes en el extremo amino terminal de una o más cadenas pesadas o ligeras de un anticuerpo. Una extensión líder amino terminal comprende tres residuos de aminoácidos, VHS, presentes en una de las cadenas ligeras, o ambas, de la variante de un anticuerpo.

Un anticuerpo "desamidado" es aquél en que uno o más residuos de asparragina del mismo han derivado, *por ejemplo*, en un ácido aspártico, una succinimida o un ácido isoaspártico.

La "homología" se define como el porcentaje de residuos de la secuencia de aminoácidos variante que son idénticos tras alinear las secuencias e introducir espacios, si fuese necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de

homología. Los procedimientos y programas informáticos para establecer dicha alineación son bien conocidos en el sector. Una de esas aplicaciones de software es "Align 2", creada por Genentech, Inc. y presentada junto con documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

Para los propósitos de la presente memoria descriptiva, "el análisis del intercambio catiónico" se refiere a cualquier procedimiento mediante el cual una composición que comprenda dos o más compuestos se separa sobre la base de las diferencias de carga empleando un intercambiador catiónico. Un intercambiador catiónico comprende por lo general grupos con enlace covalente y carga negativa. Preferentemente, el intercambiador catiónico es, en la presente memoria descriptiva, uno débil, como la columna de intercambio catiónico PROPAC WCX-10™ que vende Dionex, y/o comprende un grupo funcional carboxilato.

Un "ovario" es uno de los dos pequeños órganos con forma de almendra situados a ambos lados del útero de una hembra.

Una "trompa de Falopio" u "oviducto" es uno de los dos conductos estrechos que salen de los ovarios de las hembras mamíferas y entran en el útero.

El "peritoneo" es el revestimiento epitelial de una cavidad del cuerpo como el abdomen.

Los términos "cáncer" y "canceroso" describen o se refieren al estado fisiológico de los mamíferos típicamente caracterizado por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer serían, pero sin limitarse a, el carcinoma, el linfoma, el blastoma (incluyendo el meduloblastoma y el retinoblastoma), el sarcoma (incluyendo el liposarcoma y el sarcoma de células sinoviales), los tumores neuroendocrinos (incluyendo los tumores carcinoides, el gastrinoma y el cáncer de células isleta), el mesotelioma, el schwannoma (incluyendo el neuroma acústico), el meningioma, el adenocarcinoma, el melanoma y la leucemia o tumores linfoides. Ejemplos más particulares de estas clases de cáncer serían el cáncer de células escamosas (*por ejemplo*, el cáncer de células escamosas epiteliales), el cáncer de pulmón (incluyendo el cáncer de células pulmonares pequeñas (SCLC), el cáncer de células pulmonares no pequeñas (NSCLC), el adenocarcinoma pulmonar y el carcinoma pulmonar escamoso), el cáncer de peritoneo, el cáncer hepatocelular, el cáncer gástrico o estomacal (incluyendo el cáncer gastrointestinal), el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer cervical, el cáncer de ovario, el cáncer de riñón, el cáncer de vejiga, el hematoma, el cáncer de mama (incluyendo el cáncer de mama metastásico), el cáncer de colon, el cáncer rectal, el cáncer colorrectal, el carcinoma endometrial o uterino, el carcinoma de las glándulas salivares, el cáncer de hígado o renal, el cáncer de próstata, el cáncer vulval, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático, el carcinoma anal, el carcinoma de pene, el cáncer testicular, el cáncer esofágico, los tumores del tracto biliar y el cáncer de cabeza y cuello.

El "cáncer de ovario" es un tumor que puede resultar mortal y se desarrolla en uno o ambos ovarios. Para el momento en que se manifiestan los síntomas del cáncer de ovario, el tumor puede haber crecido lo bastante como para que las células cancerosas se extiendan a través del abdomen. Las células de un cáncer de ovario que se han extendido fuera de los ovarios se denominan cánceres de ovario metastásicos. Los tumores de ovario suelen extenderse hacia el diafragma, el intestino y/o el mesenterio (una capa de tejido adiposo que cubre y asienta los órganos en el abdomen). Las células cancerosas también pueden extenderse a otros órganos a través de los canales linfáticos y el torrente sanguíneo. El cáncer de ovario que se quiere tratar en la presente memoria descriptiva incluye

las tres clases principales de tumores de ovario malignos, a saber, el tumor epitelial, el tumor de células germinales y el tumor estromal.

El "carcinoma peritoneal primario" se refiere a un cáncer que se origina en el peritoneo. Un carcinoma peritoneal primario puede ser muy similar al cáncer de ovario epitelial en términos de aspecto microscópico, síntomas, modelo de extensión y pronóstico. Una mujer a quien hayan extraído sus ovarios aún puede desarrollar un carcinoma peritoneal primario.

El "carcinoma de trompas de Falopio" se refiere a un cáncer de las trompas de Falopio y/o el ligamento ancho.

Un "tumor epitelial" se desarrolla en una capa de células cúbicas conocida como el epitelio germinal, que rodea la parte exterior de los ovarios. Los tumores epiteliales son la causa de hasta el 90% de todos los cánceres de ovario.

Un "tumor de células germinales" se encuentra en la(s) célula(s) de maduración ovular del ovario. Los tumores de células germinales, responsables de alrededor del 3% de todos los cánceres de ovario, se producen con mayor frecuencia en adolescentes y madres jóvenes.

Un "tumor estromal" se desarrolla a partir de células de tejido conjuntivo que mantienen el ovario unido y producen las hormonas femeninas, el estrógeno y la progesterona. Los tumores estromales son la causa del 6% de todos los cánceres de ovario.

En la presente memoria descriptiva, una "paciente" es una paciente humana. La paciente puede ser una "paciente de cáncer", *es decir*, aquella que manifiesta o tiene el riesgo de manifestar uno o más síntomas de cáncer, u otra paciente que pudiese beneficiarse de la terapia con un inhibidor de la dimerización de HER.

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

Una "muestra de un paciente" se refiere a una muestra obtenida de una paciente, como pueda ser una paciente de cáncer.

En la presente memoria descriptiva, una "muestra de un tumor" es una muestra que se ha obtenido, o comprende células tumorales, del tumor de una paciente. En la presente memoria descriptiva, ejemplos de muestras de tumor serían, pero sin limitarse a, las biopsias de tumores, las células tumorales en circulación, las proteínas del plasma en circulación, el fluido ascítico, los cultivos de células primarias o las líneas celulares obtenidas de tumores o con propiedades similares a las de un tumor, así como las muestras de tumor conservadas, como las fijadas en formol, embebidas en parafina o congeladas.

Una muestra de tumor "fijada" es aquella que se ha conservado histológicamente empleando un fijador.

Una muestra de tumor "fijada en formol" es aquella que se ha conservado empleando formaldehído como fijador.

Una muestra de tumor "embebida" es aquella que está rodeada por un medio firme y generalmente duro como la parafina, la cera, la celoidina o una resina. Embeber una muestra permite cortar secciones muy finas para examinarlas al microscopio o generar micromatrices tisulares (TMAs).

140

Una muestra de tumor "embebida en parafina" es aquella que está rodeada por una mezcla purificada de hidrocarburos sólidos obtenidos del petróleo.

En la presente memoria descriptiva, una muestra de tumor "congelada" se refiere a una que está congelada, o se ha congelado.

Un "agente inhibidor del crecimiento" se refiere, en el contexto de la presente memoria descriptiva, a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que exprese HER, tanto *in vitro* como *en vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento puede reducir significativamente el porcentaje de células que expresen HER en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento serían los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto distinto de la fase S), como los agentes que inducen la detención de la G1 y la fase M. Entre los bloqueadores clásicos de la fase M se incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topo II como la doxorubicina, la epirubicina, la daunorubicina, el etopósido y la bleomicina. Esos agentes que detienen la G1 también se desbordan en la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes de alquilación del ADN como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbacina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y la ara-C. Puede encontrarse más información al respecto en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" ["Regulación del anillo celular, oncogenes y fármacos antineoplásicos"] por Murakami y col. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la página 13.

Ejemplos de anticuerpos "inhibidores del crecimiento" son aquéllos que se unen a HER2 e inhiben el crecimiento de las células cancerosas con sobreexpresión de HER2. Los anticuerpos contra HER2 inhibidores del crecimiento preferentes inhiben el crecimiento de las células SK-BR-3 del tumor de mama en cultivo en un porcentaje superior al 20%, y preferentemente superior al 50% (*por ejemplo*, entre el 50% y el 100%) en una concentración de anticuerpos de entre 0,5 y 30 µg/ml, en que la inhibición del crecimiento se determina seis días después de la exposición de las células SK-BR-3 al anticuerpo (véase la patente de EE.UU. Nº 5.677.171 concedida el 14 de octubre de 1997). El ensayo de inhibición del crecimiento de las células SK-BR-3 se describe con mayor detalle en esa patente y seguidamente en la presente memoria descriptiva. El anticuerpo de inhibición del crecimiento preferente es una variante humanizada del anticuerpo monoclonal murino 4D5, *por ejemplo*, el trastuzumab.

Un anticuerpo que "induce la apoptosis" es aquél que induce la muerte celular programada tal como se determina mediante la unión de anexina V, la fragmentación del ADN, la contracción de las células, la dilatación del retículo endoplásmico, la fragmentación celular y/o la formación de vesículas en la membrana (llamadas cuerpos apoptóticos). La célula es una que normalmente sobreexpresa el receptor HER2. Preferentemente, la célula es una célula tumoral, *por ejemplo*, una célula del seno, del ovario, del estómago, del endometrio, de la glándula salivar, del pulmón, del hígado, del colon, del tiroides, el páncreas o de la vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. Existen diversos procedimientos para evaluar los sucesos celulares asociados a la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de la fosfatidil serina (PS) puede medirse mediante la unión de anexina, la fragmentación del ADN puede evaluarse a través de su escalonamiento y la condensación nuclear/de la cromatina que se produce junto con la fragmentación del ADN puede evaluarse por cualquier aumento de las células hipodiploides. Preferentemente, el anticuerpo que induce la apoptosis es aquél que

desarrolla un nivel de inducción de la unión de anexina superior entre 2 y 50 veces, preferentemente entre 5 y 50 veces, y más preferentemente entre 10 y 50 veces, en comparación con las células no tratadas en un ensayo de unión de anexina realizado con células BT474 (véase a continuación). Ejemplos de anticuerpos contra el HER2 que inducen la apoptosis son el 7C2 y el 7F3.

El "epítipo 2C4" es la región del dominio extracelular de HER2 a la cual se une el anticuerpo 2C4. A fin de examinar los anticuerpos que se unen al epítipo 2C4, se puede llevar a cabo un ensayo rutinario de bloqueo cruzado como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Preferentemente, el anticuerpo bloquea la unión del 2C4 al HER2 en el 50% o más. Como alternativa, puede efectuarse un mapeo de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 2C4 de HER2. El epítipo 2C4 comprende los residuos del dominio II del dominio extracelular del HER2. El 2C4 y el pertuzumab se unen al dominio extracelular de HER2 en el enlace de los dominios I, II y III. Franklin y col., *Cancer Cell*, 5:317-328 (2004).

El "epítipo 4D5" es la región del dominio extracelular de HER2 a la cual se unen el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y el trastuzumab. Este epítipo se encuentra cerca del dominio transmembrana de HER2 y dentro de su dominio IV. A fin de examinar los anticuerpos que se unen al epítipo 4D5, se puede llevar a cabo un ensayo rutinario de bloqueo cruzado como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede efectuarse un mapeo de epítipos para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 4D5 de HER2 (*por ejemplo*, uno o más residuos de la región que va, aproximadamente, del residuo 529 al 625, inclusive, del HER2 ECD; la numeración de residuos incluye el péptido de señal).

El "epítipo 7C2/7F3" es la región N terminal, dentro del dominio I, del dominio extracelular de HER2 a la cual se unen los anticuerpos 7C2 y/o 7F3 (cada uno de ellos depositado en la ATCC, véase más adelante). A fin de examinar los anticuerpos que se unen al epítipo 7C2/7F3, se puede llevar a cabo un ensayo rutinario de bloqueo cruzado como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede efectuarse un mapeo de epítipos para establecer si el anticuerpo se une al epítipo 7C2/7F3 del HER2 (*por ejemplo*, uno o más residuos de la región que va, aproximadamente, del residuo 22 al 53 del HER2 ECD; la numeración de residuos incluye el péptido de señal).

El "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como las medidas profilácticas o preventivas. Entre las personas que necesitan tratamiento se incluyen aquellas que ya tienen la enfermedad así como las que deben tomar medidas para prevenirla. Por tanto, el paciente que se quiere tratar, en la presente memoria descriptiva, puede haber recibido el diagnóstico de que tiene la enfermedad o estar predispuesto o ser susceptible a la misma.

El término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar el cáncer del paciente. La cantidad eficaz del fármaco puede reducir la población de células cancerosas o el tamaño del tumor, inhibir (*es decir*, aminorar hasta cierto grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos, la metástasis tumoral y, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados al cáncer. Con relación a su capacidad para evitar el crecimiento y/o eliminar las células cancerosas existentes, el fármaco puede ser citostático y/o citotóxico. La cantidad eficaz puede ampliar el grado de supervivencia sin progresión (*por ejemplo*, tal como lo miden los Criterios de evaluación de la respuesta de tumores sólidos (RECIST) o los cambios CA-125), resultar en una respuesta objetiva (incluyendo una respuesta parcial, PR, o

completa, CR), aumentar el tiempo de supervivencia general y/o mejorar uno o más de los síntomas del cáncer (por ejemplo, tal como evalúa FOSI).

La "supervivencia general" se refiere al hecho de que el paciente siga vivo durante un período de tiempo definido, como 1 año, 5 años, etc., *por ejemplo*, desde el momento del diagnóstico o el tratamiento.

La "supervivencia sin progresión" se refiere al hecho de que el paciente siga vivo sin que el cáncer empeore.

Una "respuesta objetiva" se refiere a una respuesta medible, incluyendo una respuesta completa (CR) o parcial (PR).

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

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

Un cáncer con "sobreexpresión o amplificación de un receptor HER" es aquél que tiene unos niveles de proteínas o genes de los receptores HER significativamente superiores en comparación con una célula no cancerosa de la misma clase tisular. Dicha sobreexpresión puede estar causada por una amplificación génica o un aumento de la transcripción o de la traducción. La sobreexpresión o amplificación de un receptor HER puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando el aumento de los niveles de proteínas HER presentes en la superficie de una célula (*por ejemplo*, mediante un ensayo inmunohistoquímico, IHC). Como alternativa, o adicionalmente, se pueden medir los niveles del ácido nucleico que codifica la HER en la célula, *por ejemplo*, a través de la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), el método de hibridación tipo Southern o las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR cuantitativa). También se puede estudiar la sobreexpresión o amplificación del receptor HER midiendo el antígeno vertido (*por ejemplo*, del dominio extracelular de la HER) en un fluido biológico como el suero (véase, *por ejemplo*, la patente de EE.UU. N° 4.933.294 concedida el 12 de junio de 1990, el documento WO91/05264 publicado el 18 de abril de 1991, la patente de EE.UU. N° 5.401.638 concedida el 28 de marzo de 1995 y Sias *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 132: 73-80 (1990)). Aparte de los anteriores ensayos, el experto en la materia también dispone de diversos ensayos *in vivo*. Por ejemplo, se puede exponer células del cuerpo del paciente a un anticuerpo que esté opcionalmente etiquetado con una etiqueta detectable, *por ejemplo*, un isótopo radiactivo, y evaluar la unión del anticuerpo a dichas células, *por ejemplo*, mediante la exploración externa por radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

En cambio, un cáncer que "no sobreexpresa o amplifica un receptor HER2" es aquél que no tiene unos niveles de proteínas o de genes de los receptores HER mayores que los normales en comparación con una célula no cancerosa de la misma clase tisular.

El término "agente citotóxico", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o causa su destrucción. El término pretende incluir isótopos radiactivos (*por ejemplo*, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² y los isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas como las de molécula pequeña o las enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo los fragmentos y/o las variantes de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos serían los agentes de alquilación como la tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN®, los sulfonatos de alquilo como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán, las aziridinas como la benzodopa, la carboquona, la meturedopa y la uredopa, las etiloniminas y metilamelaminas incluyendo la altretamina, la trietilenomelamina, la trietilenofosforamida, la trietilenotiofosforamida y la trimetilolomelamina, el TLK 286 (TELCYTA™), los acetogeninos (en especial, el bullatacín y la bullatacinona), el delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®), la beta-lapachona, el lapachol, las colchicinas, el ácido botulínico, una camptotecina (incluyendo el topotecán análogo sintético (HYCAMTIN®), el CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), la acetilcamptotecina, la escopolectina y la 9-aminocamptotecina), la briostatina, la callistatina, el CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adocelesina, carcelesina y bicelesina), la podofilotoxina, el ácido podofilínico, la teniposida, las criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y la 8), la dolastatina, la duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1), la eleuterobina, la pancratistatina, una sarcodictina, la espongistatina, los gases de nitrógeno como el clorambucil, la clomafacina, la colofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el clorhidrato de óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembichina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida y la uramustina, las nitrosureas como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina y la ranimustina, los bisfosfonatos como el clodronato, los antibióticos como los de enedina (*por ejemplo*, la calicheamicina, especialmente la calicheamicina gamma II y la calicheamicina omega II (*véase, por ejemplo*, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))) y las antraciclinas como la anamicina, la AD 32, la alcarrubicina, la daunorrubicina, el dexrazoxano, la DX-52-1, la epirubicina, la GPX-100, la idarrubicina, la KRN5500, el menogaril, la dinemicina, incluyendo la dinemicina A, una esperamicina, el cromóforo de neocarcinostatina y los cromóforos antibióticos de enedina cromoproteína relacionados, las aclacinomisinas, la actinomicina, la autramicina, la azaserina, las bleomicinas, la cactinomicina, la carabicina, la carminomicina, la carcinofilina, las cromomicinas, la dactinomicina, la detorrubicina, la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo la morfolino-doxorrubicina, la cianomorfolino-doxorrubicina, la 2-pirrolino-doxorrubicina, la doxorubicina liposomal y la desoxidoxorrubicina), la esorrubicina, la marcelomicina, las mitomicinas como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la potfiromicina, la puromicina, la quelamicina, la rodorrubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la tubercidina, el ubenimex, la cinostatina y la zorrubicina, los análogos del ácido fólico como la denopterina, la pteropterina y el trimetrexato, los análogos de la purina como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiamiprina y la tioguanina, los análogos de la pirimidina como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carnofur, la citarabina, la didesoxiuridina, la doxifluridina, la enocitabina y la floxuridina, los andrógenos como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitioestano, el mepitioestano y la testolactona, los antiadrenales como la aminoglutetimida, el mitotano y el trilostano, un reabastecedor del ácido fólico como el ácido folínico (leucovorina), la aceglatona, agentes antineoplásicos antifolatos como el ALIMTA®, el LY231514 pemetrexed, los inhibidores de la reductasa dihidrofolato como el metotrexato, los antimetabolitos como el 5-fluorouracilo (5-FU) y sus profármacos como el UFT, el S-1 y la capecitabina, y los inhibidores del timidilato sintasa y la glicinamida ribonucleótida formiltransferasa como el raltitrexed (TOMUDEX^{RM}, TDX), los inhibidores de la dihidropirimidina deshidrogenasa como el eniluracilo, el glucósido aldofosfamida, el ácido aminolevulínico, la

amsacrina, el bestabucil, el bisantreno, el edatraxato, la defofamina, la demecolcina, la diaziquona, la elfornitina, el acetato de eliptinio, una epotilona, el etoglúcido, el nitrato de galio, la hidroxurea, el lentinán, la lonidainina, los maitansinoides como la maitansina y las ansamitocinas, la mitoguazona, la mitoxantrona, el mopidanmol, la nitraerina, el pentostatín, el fenamet, la pirarrubicina, la losoxantrona, la 2-etilhidracida, la procarbicina, el complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR), el razoxano, la rizoxina, el sizofirán, el espirogermanio, el ácido tenuazónico, la triaciquona, la 2,2',2"-triclorotrietilamina, los tricotecenos (especialmente la toxina T-2, el verracurín A, el roridín A y la anguidina), el uretano, la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), la dacarbicina, la manomustina, el mitobronitol, el mitolactol, el pipobromán, la gacitosina, la arabinosida ("Ara-C"), la ciclofosfamida, la tiotepa, los taxoides y los taxanos, *por ejemplo*, el TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), el ABRAXANE™ sin cremofor, la formulación de nanopartículas de paclitaxel mediante ingeniería de albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y el TAXOTERE® docetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia), el clorambucil, la gemcitabina (GEMZAR®), la 6-tioguanina, la mercaptopurina, el platino, los análogos de platino o los análogos basados en platino como el cisplatino, el oxaliplatino y el carboplatino, la vinblastina (VELBAN®), el etopósido (VP-16), la ifosfamida, la mitoxantrona, la vincristina (ONCOVIN®), el alcaloide de la vinca, la vinorelbina (NAVELBINE®), la novantrona, el edatrexato, la daunomicina, la aminopterina, la xeloda, el ibandronato, el inhibidor RFS 2000 de la topoisomerasa, la difluorometilornitina (DMFO), los retinoides como el ácido retinoico, las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores, así como las combinaciones de una o más de las sustancias anteriores como la CHOP, la abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y el FOLFOX, la abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

En esta definición también se incluyen los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en los tumores como los antiestrógenos y los moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERMs), incluyendo, *por ejemplo*, el tamoxifeno (incluyendo el tamoxifeno NOLVADEX®), el raloxifeno, el droloxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el keoxifeno, el LY117018, la onapristona y el toremifeno FARESTON®, los inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, encargada de regular la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, como, *por ejemplo*, las 4(5)-imidazoles, la aminoglutetimida, el acetato de megestrol MEGASE®, el exemestano AROMASIN®, la fermetastania, la fadrozola, la vorozola RIVISOR®, la letrozola FEMARA® y la anastrozola ARIMIDEX®, y antiandrógenos como la flutamida, la nilutamida, la bicalutamida, la leuprolida y la goserelina, así como la troxacitabina (un análogo del nucleósido citosina1,3-dioxolano), los oligonucleótidos antisentido, particularmente aquéllos que inhiben la expresión génica en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, como, *por ejemplo*, el PKC-alfa, el Raf, el H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), las vacunas para terapias génicas como, *por ejemplo*, la ALLOVECTIN®, la LEUVECTIN® y la VAXID®, el PROLEUKIN® rIL-2, el inhibidor LURTOTECAN® de la topoisomerasa 1, el ABARELIX® rmRH y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores.

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

La "gemcitabina" o "monoclorhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero-b)" es un nucleósido análogo que exhibe actividad antitumoral. La fórmula empírica de la gemcitabina HCl es $C_9H_{11}F_2N_3O_4 \cdot HCl$. Eli Lilly comercializa la gemcitabina HCl bajo la marca comercial GEMZAR®.

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

Por "quimioterapia basada en el platino" se entiende una terapia con uno o más agentes quimioterapéuticos basados en el platino, opcionalmente en combinación con uno o más agentes terapéuticos de otras clases.

Un cáncer "resistente al platino" significa que el cáncer del paciente ha progresado durante el tiempo que ha recibido quimioterapia basada en el platino (*es decir*, el paciente es "refractario al platino") o dentro de un período de 12 meses (por ejemplo, al cabo de seis meses) tras completar el régimen de quimioterapia basada en el platino.

Un "agente antiangiogénico" se refiere a un compuesto que bloquea el desarrollo de los vasos sanguíneos o, en cierta medida, interfiere en el mismo. El factor antiangiogénico puede ser, por ejemplo, una pequeña molécula o anticuerpo que se une a un factor de crecimiento o un receptor del factor de crecimiento involucrado en la promoción de la angiogénesis. El factor antiangiogénico preferente en la presente memoria descriptiva es un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), como el bevacizumab (AVASTIN®).

El término "citoquina" es un término genérico para aquellas proteínas, liberadas por una población de células, que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citoquinas serían las linfoquinas, las monoquinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Las citoquinas también incluyen hormonas del crecimiento como la hormona humana del crecimiento, la hormona humana del crecimiento N-metionilo y la hormona bovina del crecimiento, la hormona paratiroidea, la tiroxina, la insulina, la proinsulina, la relaxina, la prorrelaxina, las hormonas glicoproteicas como la hormona estimuladora del folículo (FSH), la hormona estimuladora del tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH), el factor de crecimiento hepático, el factor de crecimiento fibroblástico, la prolactina, el lactógeno placentario, los factores α y β de necrosis tumoral, las sustancias de inhibición mulleriana, los péptidos asociados a la gonadotropina de los ratones, la inhibina, la activina, el factor de crecimiento endotelial vascular, la integrina, la trombopoyetina (TPO), los factores de crecimiento nervioso como el NGF- β , el factor de crecimiento plaquetario, los factores de crecimiento tumoral (TGFs) como el TGF- α y el TGF- β , los factores -I y -II de crecimiento similar a la insulina, la eritropoyetina (EPO), los factores osteoinductivos, los interferones como el interferón- α , - β y - γ , los factores de estimulación colonial (CSFs) como el CSF macrófago (M-

CSF), el CSF granulocito macrófago (GM-CSF) y el CSF granulocito (G-CSF), las interleuquinas (ILs) como la IL-1, la IL-1 α , la IL-2, la IL-3, la IL-4, la IL-5, la IL-6, la IL-7, la IL-8, la IL-9, la IL-10, la IL-11 y la IL-12, un factor de necrosis tumoral como el TNF- α o el TNF- β y otros factores polipéptidos incluyendo el LIF y el ligando de kit (KL). En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas con secuencia nativa.

En la presente memoria descriptiva, una "enfermedad autoinmune" es una enfermedad o trastorno que se genera en, y se dirige contra, los propios tejidos de un individuo, o un cosegregado o una manifestación del mismo o un estado resultante de todo ello. Ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunes serían, pero sin limitarse a, la artritis (artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil temprana, osteoartritis, artritis psoriática y espondilitis anquilosante), la psoriasis, la dermatitis, incluyendo la dermatitis atópica, la urticaria idiopática crónica, incluyendo la urticaria autoinmune crónica, la polimiositis/dermatomiositis, la necrólisis epidérmica tóxica, el escleroderma (incluyendo el escleroderma sistémico), la esclerosis, como la esclerosis sistémica progresiva, la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (por ejemplo, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa, la enfermedad inflamatoria del intestino autoinmune), la pioderma gangrenosa, el eritema nodoso, la colangitis esclerótica primaria, la episcleritis, el síndrome de insuficiencia respiratoria, incluyendo el síndrome de insuficiencia respiratoria en adultos (ARDS), la meningitis, las enfermedades con mediación de IgE como la anafilaxis y la rinitis alérgica y atópica, la encefalitis, como la encefalitis de Rasmussen, la uveítis o la uveítis autoinmune, la colitis, como la colitis microscópica y la colitis colágena, la glomerulonefritis (GN), como la GN membranosa (nefropatía membranosa), la GN membranosa idiopática, la GN membranosa proliferativa (MPGN), incluyendo la clase I y la II, y la GN rápidamente progresiva, los estados alérgicos, las reacciones alérgicas, el eccema, el asma, los estados que implican la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, la aterosclerosis, la miocarditis autoinmune, la deficiencia de adhesión de leucocitos, el lupus eritematoso sistémico (SLE), como el SLE cutáneo, el lupus eritematoso cutáneo subagudo, el lupus (incluyendo nefritis, cerebritis, pediátrico, no renal, discoide y alopecia), la diabetes melitus juvenil temprana (clase I), incluyendo la diabetes melitus pediátrica dependiente de la insulina (IDDM), la diabetes melitus adulta temprana (diabetes de clase II), la esclerosis múltiple (MS), como la MS espino-óptica, las respuestas inmunes asociadas a la hipersensibilidad aguda y retardada con mediación de citoquinas y linfocitos T, la tuberculosis, la sarcoidosis, la granulomatosis, incluyendo la granulomatosis linfomatoide y la granulomatosis de Wegener, la agranulocitosis, la vasculitis (incluyendo la vasculitis de vasos grandes (que a su vez incluye la polimialgia reumática y la arteritis de células gigantes (arteritis de Takayasu)), la vasculitis de vasos medianos (incluyendo la enfermedad de Kawasaki y la poliarteritis nodosa), la vasculitis CNS, la vasculitis necrotizante sistémica y la vasculitis asociada a la ANCA, como la vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS)), la arteritis temporal, la anemia aplásica, la anemia positiva de Coombs, la anemia de Diamond Blackfan, la anemia hemolítica o la anemia hemolítica inmune, incluyendo la anemia hemolítica autoinmune (AIHA), la anemia perniciosa, la aplasia de glóbulos rojos puros (PRCA), la deficiencia del factor VIII, la hemofilia A, la neutropenia autoinmune, la pancitopenia, la leucopenia, las enfermedades relacionadas con la diapedesis de leucocitos, los trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, el síndrome de lesión múltiple de órganos, las enfermedades con mediación de complejos antígeno-anticuerpo, la enfermedad de la membrana basal antiglomerular, el síndrome

del anticuerpo antifosfolípido, la neuritis alérgica, la enfermedad de Bechet o Behcet, el síndrome de Castleman, el síndrome de Goodpasture, el síndrome de Reynaud, el síndrome de Sjogren, el síndrome de Stevens-Johnson, el penfigoide, como el penfigoide buloso, el pénfigo (incluyendo el penfigoide vulgar, el foliáceo y el de la membrana mucosa con pénfigo), las poliendocrinopatías autoinmunes, la enfermedad de Reiter, la nefritis compleja inmune, la neuropatía crónica, como las polineuropatías IgM o la neuropatía con mediación de IgM, la trombocitopenia (tal como la desarrollan los pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo), incluyendo el púrpura trombótico trombocitopénico (TTP) y la trombocitopenia autoinmune o con mediación de un inmune como el púrpura idiopático trombocitopénico (ITP), incluyendo el ITP crónico o agudo, las enfermedades autoinmunes de los testículos y ovarios incluyendo la orquitis y la ooforitis autoinmunes, el hipotiroidismo primario, el hipoparatiroidismo, las enfermedades endocrinas autoinmunes, incluyendo la tiroiditis, como la tiroiditis autoinmune, la tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), o la tiroiditis subaguda, la enfermedad de tiroides autoinmune, el hipotiroidismo idiopático, la enfermedad de Addison, la enfermedad de Grave, los síndromes poliglandulares, como los síndromes poliglandulares autoinmunes (o los síndromes de endocrinopatía poliglandular), los síndromes paraneoplásicos, incluyendo los síndromes paraneoplásicos neurológicos, como el síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert, el síndrome del hombre rígido, la encefalomiелitis, como la encefalomiелitis alérgica, la miastenia grave, la degeneración cerebelar, la encefalitis límbica y/o cerebral, la neuromiotonía, el síndrome de opsoclonus u opsoclonus mioclonus (OMS) y la neuropatía sensorial, el síndrome de Sheehan, la hepatitis autoinmune, la hepatitis crónica, la hepatitis lupoide, la hepatitis activa crónica o la hepatitis activa crónica autoinmune, la neumonitis intersticial linfoide, la bronquiolitis obliterante (sin transplante) contra la NSIP, el síndrome de Guillain-Barré, la enfermedad de Berger (nefropatía IgA), la cirrosis biliar primaria, el esprue celíaco (enteropatía por sensibilidad al gluten), el esprue refractario, la dermatitis herpetiforme, la crioglobulinemia, la esclerosis amiotrófica lateral (ALS, enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad del oído interno autoinmune (AIED) o pérdida del oído autoinmune, el síndrome de opsoclonus mioclonus (OMS), la policondritis, como la policondritis refractaria, la proteinosis pulmonar alveolar, la amiloidosis, la hepatitis en células gigantes, la escleritis, una linfocitosis no cancerosa, una linfocitosis primaria, que incluye la linfocitosis de las células B monoclonales (por ejemplo, la gammapatía monoclonal benigna y la gammapatía monoclonal de significancia indeterminada, MGUS), la neuropatía periférica, el síndrome paraneoplásico, las canalopatías, como la epilepsia, la migraña, la arritmia, los trastornos musculares, la sordera, la ceguera, la parálisis periódica y las canalopatías del sistema nervioso central, el autismo, la miopatía inflamatoria, la glomerulosclerosis focal y segmentaria (FSGS), la oftalmopatía endocrina, la uveoretinitis, el trastorno hepatológico autoinmune, la fibromialgia, la disfunción endocrina múltiple, el síndrome de Schmidt, la adrenalitis, la atrofia gástrica, la demencia presenil, las enfermedades de desmielinización, el síndrome de Dressler, la alopecia areata, el síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), la esterilidad masculina y femenina autoinmune, la espondilitis anquilosante, la enfermedad mixta del tejido conjuntivo, la enfermedad de Chagas, la fiebre reumática, el aborto recurrente, el pulmón del granjero, el eritema multiforme, el síndrome de poscardiotomía, el síndrome de Cushing, el pulmón del cuidador de aves, el síndrome de Alport, la alveolitis, como la alveolitis alérgica y la alveolitis fibrosa, la enfermedad pulmonar intersticial, las reacciones de transfusión, la lepra, la malaria, la leishmaniasis, la quipanosomiasis, la

esquistosomiasis, la ascariasis, la aspergilosis, el síndrome de Sampter, el síndrome de Caplan, el dengue, la endocarditis, la fibrosis endomiocárdica, la endoftalmitis, el eritema elevado diutinum, la eritroblastosis fetal, la fascitis eosinófila, el síndrome de Shulman, el síndrome de Felty, la filariasis, la ciclitis, como la ciclitis crónica, la ciclitis heterocrónica o la ciclitis de Fuch, el púrpura de Henoch-Schonlein, la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la infección por ecovirus, la cardiomiopatía, la enfermedad de Alzheimer, la infección por parvovirus, la infección por el virus de la rubéola, los síndromes de posvacunación, la infección por rubéola congénita, la infección por el virus de Epstein-Barr, las paperas, el síndrome de Evan, la disfunción gonadal autoinmune, la corea de Sydenham, la nefritis posestreptocócica, la tromboangitis obliterante, la tirotoxicosis, la tabes dorsal y la polimialgia de células gigantes.

Un "trastorno hiperproliferante benigno" es un estado de un paciente relativo a la proliferación celular que los miembros de la comunidad médica reconocen como anormal. Un estado anormal se caracteriza por un nivel de una propiedad estadísticamente distinto al nivel observado en organismos que no padecen el trastorno. La proliferación celular se refiere al crecimiento o extensión por multiplicación de las células e incluye la división celular. La tasa de proliferación celular puede medirse contando la cantidad de células producida en una unidad de tiempo determinada. Ejemplos de trastornos hiperproliferantes benignos serían la psoriasis y los pólipos.

Una "enfermedad respiratoria" actúa sobre el sistema respiratorio e incluye la bronquitis crónica, el asma, incluyendo el asma agudo y el asma alérgico, la fibrosis quística, la bronquiectasia, la rinitis o la sinusitis alérgica u otras variantes de estas enfermedades, la deficiencia de α 1-antitripsina, las toses, el enfisema pulmonar, la fibrosis pulmonar o vías respiratorias hiperreactivas, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el trastorno pulmonar obstructivo crónico.

La "psoriasis" es un estado caracterizado por la erupción de maculopápulas circunscritas, discretas y confluentes, de color rojizo con escalado plateado. Por lo general, las lesiones psoriáticas se producen predominantemente en los codos, las rodillas, el cuero cabelludo y el tronco, y en ellas se observa característicamente, a escala microscópica, paraqueratosis y una prolongación de los puentes intercelulares. El término recoge diversas formas de psoriasis, incluyendo las variantes eritodérmica, pustular, moderada-grave y recalcitrante de la enfermedad.

La "endometriosis" se refiere a la aparición ectópica de tejido endometrial, formando a menudo quistes que contienen sangre alterada.

En la presente memoria descriptiva, el término "enfermedad o trastorno vascular" se refiere a las diversas enfermedades o trastornos que afectan al sistema vascular, incluyendo el sistema cardiovascular. Ejemplos de estas enfermedades serían la arteriosclerosis, la reobstrucción vascular, la aterosclerosis, la estenosis vascular posquirúrgica, la reestenosis, la oclusión vascular o enfermedad obstructiva de las carótidas, la enfermedad de la arteria coronaria, la angina, la enfermedad de los vasos pequeños, la hipercolesterolemia, la hipertensión y los estados relacionados con la proliferación o función anormal de las células epiteliales vasculares.

El término "estenosis" se refiere al estrechamiento o la constricción de un pasaje hueco del cuerpo (*por ejemplo*, un conducto o canal).

El término "estenosis vascular" se refiere a la oclusión o el estrechamiento de los vasos sanguíneos. La estenosis vascular se origina a menudo debido a depósitos adiposos (como es el caso de la aterosclerosis) o a la migración y proliferación excesiva de las células del músculo liso vascular y las endoteliales. Las arterias son particularmente susceptibles a la estenosis. El término "estenosis", en el contexto de la presente memoria descriptiva, incluye específicamente la estenosis inicial y la reestenosis.

El término "reestenosis" se refiere a la recurrencia de la estenosis tras el tratamiento de la estenosis inicial con aparente éxito. Por ejemplo, la "reestenosis", en el contexto de la estenosis vascular, se refiere a la recurrencia de la estenosis vascular después de haberse tratado con aparente éxito, *por ejemplo*, eliminando los depósitos adiposos mediante angioplastia (*por ejemplo*, la angioplastia coronaria transluminal percutánea), aterectomía coronaria direccional o stent. Uno de los factores que contribuyen a la aparición de la reestenosis es la hiperplasia de la íntima. El término "hiperplasia de la íntima", usado de forma indistinta junto con los términos "hiperplasia de la neoíntima" y "formación de la neoíntima", se refiere al espesamiento de la capa más interna de los vasos sanguíneos, llamada capa íntima, como consecuencia de la proliferación y migración excesivas de las células del músculo liso vascular y las endoteliales. Los diversos cambios que se producen durante la reestenosis se denominan a menudo, colectivamente, "remodelación de las paredes vasculares".

Los términos "angioplastia con balón" y "angioplastia coronaria transluminal percutánea" (PTCA) se emplean a menudo indistintamente y se refieren a un tratamiento no quirúrgico basado en el uso de un catéter para eliminar los depósitos de la arteria coronaria. La estenosis o reestenosis conduce frecuentemente a la hipertensión como resultado del aumento de la resistencia al flujo sanguíneo.

El término "hipertensión" se refiere a un nivel de presión sanguínea anormalmente alto, *es decir*, superior al valor máximo del intervalo normal.

Los "pólipos" se refieren a una masa tisular que sobresale o se proyecta hacia afuera o arriba con relación al nivel normal de la superficie y, por tanto, puede verse sin necesidad de microscopio en forma de estructura hemisferoide, esferoide o como un montículo irregular que crece desde una base relativamente ancha o un tallo delgado. Algunos ejemplos serían los pólipos de colon, rectales y nasales.

Un "fibroadenoma" hace referencia a una neoplasia benigna surgida en el epitelio glandular que presenta un estroma visible de fibroblastos proliferativos y elementos de tejido conjuntivo. Este fenómeno se produce normalmente en el tejido del seno.

El "asma" es un estado cuya consecuencia es la dificultad para respirar. El asma bronquial se refiere a un estado de los pulmones en que se manifiesta un estrechamiento generalizado de las vías respiratorias que puede deberse a la contracción (espasmo) de los músculos suaves, un edema de la mucosa o la mucosidad de los conductos de los bronquios y bronquiolos.

La "bronquitis" se refiere a la inflamación de la membrana mucosa de los conductos bronquiales.

II. Análisis de la expresión génica

La presente invención ofrece un procedimiento para seleccionar pacientes para una terapia con un inhibidor de HER en que se prueba si una muestra de la paciente expresa dos o más receptores HER (preferentemente seleccionados entre EGFR, HER2 y HER3) y uno o más ligandos de HER (preferentemente seleccionados entre la

betacelulina, la anfirregulina, la epirregulina y el TGF- α ; con mayor preferencia, la betacelulina o la anfirregulina). Por ejemplo, los dos o más receptores HER pueden ser EGFR y HER2 o HER2 y HER3. En una realización, se determina la expresión de HER2 y EGFR o HER3, así como de la betacelulina o la anfirregulina. La expresión de la betacelulina o la anfirregulina en la muestra se puede probar aisladamente o en combinación con una prueba de expresión de dos o más receptores HER. La expresión positiva del(de los) gen(es) identificado(s) indica que el(la) paciente es un(a) candidato(a) a la terapia con un inhibidor de HER, un inhibidor de la dimerización de HER o el pertuzumab. Además, la expresión positiva del(de los) gen(es) identificado(s) indica que el(la) paciente tiene más probabilidades de responder favorablemente a la terapia con el inhibidor de HER que un(a) paciente que no exhiba dicha expresión positiva.

La muestra puede obtenerse de una paciente que necesite la terapia con un inhibidor de HER. Si el sujeto tiene cáncer, la muestra será una muestra tumoral. En la realización preferente, la muestra será de un tumor de ovario, peritoneo o trompas de Falopio, o un cáncer de mama metastásico (MBC) o células pulmonares no pequeñas (NSCLC). No obstante, los inhibidores de la HER también tienen otras indicaciones terapéuticas para casos no malignos, que se describen en la presente memoria descriptiva. Si la paciente debe tratarse para alguno de esos casos no malignos, se puede obtener de ella una muestra apta y someterla a un análisis de expresión génica tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

En la presente memoria descriptiva, la muestra biológica es preferentemente una muestra fijada, *por ejemplo*, una muestra fijada en formol y embebida en parafina (FFPE) o una congelada.

Preferentemente, el inhibidor de HER es un inhibidor de la dimerización de HER y/o un anticuerpo contra HER (*por ejemplo*, un anticuerpo contra HER2 como el que se une al dominio II de HER2, como es el caso del pertuzumab.)

A continuación, se describen con mayor detalle diversos procedimientos para determinar la expresión de ARNm o proteínas. Preferentemente, el ARNm se cuantifica. Dicho análisis del ARNm se realiza preferentemente empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por análisis de micromatrices. Cuando se utilice la PCR, la forma preferente de PCR es una PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR cuantitativa). En una realización, la expresión de uno o más de los anteriores genes mencionados se considera positiva si está en la mediana o por encima, *por ejemplo*, en comparación con otras muestras de la misma clase de tumor. El nivel medio de expresión puede determinarse esencialmente al mismo tiempo que se mida la expresión génica, o también se puede haber determinado previamente.

Los presentes análisis de expresión génica sirven como alternativas de la fosforilación o activación de HER. Esto es particularmente útil en casos en que la muestra sea una muestra fijada (*por ejemplo*, una muestra tumoral fijada en formol y embebida en parafina) y pueda resultar difícil cuantificar la fosforilación de HER con fiabilidad. Así, la invención ofrece un procedimiento para evaluar la fosforilación o activación de HER en una muestra biológica que comprende la determinación de la expresión de dos o más receptores HER y uno o más ligandos de HER en la muestra, caso en que dicha expresión indica la fosforilación o activación positivas de HER en la muestra. Además, la invención proporciona un procedimiento para evaluar la fosforilación o activación de HER en una muestra biológica que comprende la determinación de la expresión de betacelulina y/o anfirregulina en la muestra,

151

caso en que dicha expresión indica la fosforilación o activación positivas de HER en la muestra.

La invención ofrece un procedimiento para identificar a una paciente para una terapia con un inhibidor de HER que comprende la determinación de la expresión de dos o más receptores HER y uno o más ligandos de HER en una muestra de la paciente, caso en que dicha expresión indica que la paciente probablemente responderá a la terapia con el inhibidor de HER. La paciente puede identificarse como un sujeto con mayor probabilidad de responder al inhibidor de HER que otro que no exprese dos o más receptores HER y uno o más ligandos de HER. En otra realización, el procedimiento de identificación de la paciente para una terapia con un inhibidor de HER comprende la determinación de la expresión de betacelulina o anfirregulina en la muestra, aisladamente o en combinación con la determinación de la expresión de dos o más receptores HER.

La invención también proporciona un procedimiento de selección de una paciente con cáncer de ovario para una terapia con un inhibidor de HER mediante la determinación de la expresión de betacelulina o anfirregulina, aisladamente o en combinación con la determinación de la expresión de dos o más receptores HER en una muestra de cáncer de ovario de la paciente.

A continuación, se describirán con más detalle diversos procedimientos para determinar la expresión génica.

(i) Creación de perfiles de la expresión génica

En general, los procedimientos para crear perfiles de la expresión génica pueden dividirse en dos grandes grupos: los procedimientos basados en el análisis por hibridación de polinucleótidos y aquéllos que se basan en la secuenciación de polinucleótidos. Los procedimientos conocidos en el sector que se utilizan más habitualmente para cuantificar la expresión del ARNm en una muestra incluyen la hibridación tipo Southern y la hibridación *in situ* (Parker y Barnes, *Methods in Molecular Biology*, 106:247-283 (1999)), los ensayos de protección del ARNasa (Hod, *Biotechniques*, 13:852-854 (1992)) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Weis y col., *Trends in Genetics*, 8:263-264 (1992)). Como alternativa, se pueden emplear anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, ARN, híbridos de ADN-ARN o ADN-proteína. Los procedimientos representativos del análisis de la expresión génica basado en la secuenciación incluyen el análisis en serie de la expresión génica (SAGE) y el análisis de la expresión génica mediante secuenciación masiva y paralela (MPSS).

(ii) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

De entre las técnicas mencionadas anteriormente, un procedimiento cuantitativo sensible y flexible es la PCR, que puede utilizarse para comparar los niveles de ARNm en distintas poblaciones de muestras (en tejidos normales y tumorales, con o sin tratamiento con fármacos), caracterizar los modelos de expresión génica, discriminar entre moléculas de ARNm estrechamente relacionadas y analizar la estructura del ARN.

La primera etapa consiste en aislar el ARNm de una muestra diana. El material con que se inicia el procedimiento suele ser ARN totalmente aislado de tumores humanos o líneas celulares de tumores y los correspondientes tejidos o líneas celulares normales, respectivamente. Así, el ARN puede aislarse de diversos tumores primarios, incluyendo los tumores o las líneas celulares de tumores de mama, pulmón, colon, próstata, cerebro, riñón, hígado, páncreas, bazo, timo, testículo, ovario, útero, etc., con ADN extraído de donantes sanos. Si la fuente del ARNm es un tumor primario, entonces puede extraerse, por ejemplo, de muestras tisulares congeladas o archivadas (embebidas en parafina y fijadas (*por ejemplo*, en formol)).

152

Los procedimientos generales para la extracción del ARNm son muy conocidos en la técnica y se desvelan en libros de texto estándar de biología molecular, incluyendo Ausubel y col., *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997). Los procedimientos para la extracción del ARN de tejidos embebidos en parafina se desvelan, por ejemplo, en Rupp y Locker, *Lab Invest.*, 56:A67 (1987) y De Andrés y col., *BioTechniques*, 18:42044 (1995). En particular, el aislamiento del ARN puede efectuarse empleando un kit de purificación, una solución tampón y una proteasa de fabricantes comerciales, como Qiagen, de acuerdo con sus propias instrucciones. Por ejemplo, el ARN total de células en cultivo puede aislarse empleando minicolumnas RNeasy de Qiagen. Otros kits de aislamiento del ARN existentes en el mercado son el kit MASTERPURE® de purificación completa del ADN y el ARN (EPICENTRE®, Madison, Wis.) y el kit de aislamiento del ARN en bloques de parafina (Ambion, Inc.). El ARN total de muestras tisulares puede aislarse con ARN Stat-60 (Tel-Test). El ARN preparado de un tumor puede aislarse, por ejemplo, mediante centrifugación en gradiente de densidad con cloruro de cesio.

Dado que el ARN no puede servir como molde para la PCR, la primera etapa en la creación de perfiles de expresión génica mediante PCR es la retrotranscripción del molde de ARN en ADNc, seguida de su amplificación exponencial en una reacción de PCR. Las dos retrotranscriptasas que se utilizan más habitualmente son la retrotranscriptasa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) y la retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). etapa de la retrotranscripción típicamente se usan cebadores específicos, hexámeros aleatorios o cebadores de oligodT, según las circunstancias y el objetivo de la creación de perfiles de expresión. Por ejemplo, el ARN extraído se puede retrotranscribir con un kit GENEAMP™ de PCR para ARN (Perkin Elmer, Calif., USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido puede entonces usarse como molde en la siguiente reacción de PCR.

A pesar de que en la etapa de la PCR se pueden emplear diversas ADN polimerasas dependientes de ADN termoestable, normalmente se utiliza la ADN polimerasa Taq, que tiene una actividad nucleasa 5'- 3' pero carece de una actividad endonucleasa de prueba de lectura 3'- 5'. Así, en la PCR con TAQMAN®, se emplea habitualmente la actividad nucleasa 5' de la polimerasa Taq o Tth para hidrolizar una sonda de hibridación unida a su amplicón diana, pero también puede utilizarse cualquier enzima con una actividad nucleasa 5' equivalente. Para generar un amplicón típico de una reacción PCR se usan dos cebadores oligonucleótidos. Un tercer oligonucleótido, o sonda, se diseña para detectar la secuencia de nucleótidos ubicada entre los dos cebadores de la PCR. La enzima ADN polimerasa Taq no puede alargar la sonda, la cual se etiqueta con un colorante fluorescente indicador y otro de absorción. Cuando los dos colorantes están juntos como lo están en la sonda, el colorante de absorción absorbe del colorante indicador cualquier emisión inducida por el láser. Durante la reacción de amplificación, la enzima ADN polimerasa Taq escinde la sonda según el molde. Los fragmentos de sonda resultantes disociados en solución y la señal del colorante indicador liberado no sufren el efecto de absorción del segundo fluoróforo. Una molécula del colorante indicador se libera por cada nueva molécula sintetizada, y la detección del colorante indicador no absorbido ofrece la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

La PCR con TAQMAN® puede realizarse con equipos disponibles en el mercado como, por ejemplo, el ABI PRISM 7700® Sequence Detection System® (sistema ABI PRISM 7700® de detección de secuencias) (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) o el Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals,

Mannheim, Alemania). En una realización preferente, el procedimiento de nucleasa 5' se efectúa en un dispositivo de PCR cuantitativa en tiempo real como el sistema ABI PRISM 7700® de detección de secuencias. El sistema está compuesto por un termovariador, un láser, un dispositivo de carga acoplada (CCD), una cámara y un ordenador. El sistema amplifica las muestras en un formato de 96 cavidades en un termovariador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por el láser se recoge en tiempo real a través de los cables de fibra óptica para todas las 96 cavidades y se detecta en el CCD. El sistema incluye una aplicación de software para operar el instrumento y analizar los datos.

Los datos del ensayo de nucleasa 5' se expresan inicialmente como Ct, o el ciclo umbral. Tal como se ha comentado anteriormente, los valores de la fluorescencia se registran durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado en ese punto de la reacción de amplificación. El punto en que la señal fluorescente se registra por primera vez como estadísticamente significativa es el ciclo umbral (Ct).

A fin de minimizar los errores y el efecto de la variación entre muestras, normalmente se utiliza un estándar interno para la ejecución de la PCR. El estándar interno ideal se expresa a un nivel constante entre distintos tejidos, y el tratamiento experimental no le afecta. El ARN que se utiliza con más frecuencia para normalizar modelos de expresión génica es el ARNm para los genes de mantenimiento gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y la actina-P.

Una variación más reciente de la técnica de la PCR es la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR cuantitativa), que mide la acumulación de producto de la PCR a través de una sonda fluorogénica de doble etiquetado (*es decir*, la sonda TAQMAN®). La PCR en tiempo real es compatible tanto con la PCR competitiva cuantitativa, cuando se usa para la normalización un competidor interno para cada secuencia diana, como la PCR comparativa cuantitativa, cuando se use un gen de normalización que esté contenido en la muestra o un gen de mantenimiento para la PCR. Para más detalles, véase, *por ejemplo*, Held y col., *Genome Research*, 6:986-994 (1996).

Las etapas de un protocolo representativo para la creación de perfiles de expresión génica empleando tejidos fijados y embebidos en parafina como fuente del ARN, incluyendo el aislamiento del ARNm, la purificación, la extensión del cebador y la amplificación, se explican en diversos artículos publicados en revistas (por ejemplo: Godfrey y col., *J. Molec. Diagnostics*, 2: 84-91 (2000), Specht y col., *Am. J. Pathol.*, 158: 419-29 (2001)). En resumen, la primera etapa de un procedimiento representativo consiste en cortar secciones de muestras de tejidos tumorales embebidos en parafina de aproximadamente con un grosor tal que pese unos 10 microgramos. A continuación, el ARN se extrae, y se eliminan las proteínas y el ADN. Tras el análisis de la concentración de ARN, pueden incluirse las etapas de reparación y/o amplificación del ARN, si fuese necesario, y el ARN se retrotranscribe usando promotores específicos para cada gen, efectuando seguidamente la PCR.

Según un aspecto de la presente invención, los cebadores y las sondas para la PCR se han diseñado sobre la base de las secuencias de intrones presentes en el gen que se quiere amplificar. En esta realización, la primera etapa del diseño del cebador/la sonda es la delineación de las secuencias de intrones dentro de los genes. Esto puede realizarse con aplicaciones de software disponibles en el mercado, como el programa DNA BLAT desarrollado por Kent, W., *Genome Res.*, 12(4):656-64 (2002) o la aplicación BLAST, incluidas sus variaciones. Las etapas posteriores siguen procedimientos bien establecidos para el diseño del cebador y la sonda para la PCR.

A la hora de diseñar los cebadores y las sondas, y a fin de evitar señales no específicas, es importante ocultar las secuencias repetitivas dentro de los intrones. Esto se puede conseguir fácilmente utilizando el programa Repeat Masker disponible en línea a través del Baylor College of Medicine, que explora las secuencias de ADN y las compara con una librería de elementos repetitivos, devolviendo una secuencia de consulta en que dichos elementos repetitivos se han ocultado. Las secuencias de intrones ocultas pueden entonces emplearse para diseñar las secuencias de los cebadores y las sondas con cualquier paquete de diseño de cebadores/sondas disponible en el mercado, como Primer Express (Applied Biosystems), MGB Assay-by-design (Applied Biosystems) o Primer3 (Rozen y Skaletsky (2000)). Primer3 está disponible en Internet para usuarios generales y programadores biólogos. En: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, N.J., páginas 365-386).

Los factores que se tienen en cuenta para el diseño del cebador para la PCR incluyen la longitud del cebador, la temperatura de fusión (T_m), el contenido en G/C, la especificidad, las secuencias complementarias del cebador y la secuencia del extremo 3'. En general, los cebadores óptimos para la PCR tienen normalmente entre 17 y 30 bases de longitud, y contienen alrededor del 20-80%, como, por ejemplo, las bases con el 50-60% de G+C. Las temperaturas de fusión típicamente preferentes son las situadas entre 50 y 80 °C, *por ejemplo*, alrededor de 50-70 °C.

Para más directrices sobre el diseño de cebadores y sondas para la PCR, véase, *por ejemplo*, Dieffenbach y col., "General Concepts for PCR Primer Design", en: *PCR Primer, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995, páginas 133-155, Innis y Gelfand, "Optimization of PCRs", en: *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, CRC Press, London, 1994, páginas 5-11, y Plasterer, T. N., "Primerselect: Primer and probe design", en: *Methods Mol. Biol.* 70:520-527 (1997). La divulgación completa de estas obras se incorpora expresamente en la presente memoria descriptiva como referencia.

(iii) Micromatrices

La expresión génica diferencial también puede identificarse, o confirmarse, empleando la técnica de micromatrices. Así, con la tecnología de micromatrices, el perfil de expresión de los genes asociados al cáncer de mama puede medirse en tejidos tumorales recientes o embebidos en parafina. En este procedimiento, las secuencias de polinucleótidos de interés (incluyendo el ADNc y los oligonucleótidos) se colocan, u ordenan, en un sustrato de microchips. A continuación, las secuencias ordenadas se hibridan con sondas de ADN específico de células o tejidos de interés. Al igual que en el procedimiento de la PCR, la fuente de ARNm es típicamente el ARN total aislado de tumores o líneas celulares de tumores humanos y los correspondientes tejidos o líneas celulares normales. Así, el ARN puede aislarse de diversos tumores o líneas celulares de tumores primarios. Si la fuente del ARNm es un tumor primario, entonces puede extraerse, *por ejemplo*, de muestras tisulares congeladas o archivadas (embebidas en parafina y fijadas (*por ejemplo*, en formol)) que se preparan y conservan rutinariamente en las prácticas clínicas cotidianas.

En una realización específica de la técnica de micromatrices, las inserciones de los clones de ADNc amplificadas en la PCR se aplican a un sustrato de una matriz densa. Preferentemente, se aplican al menos 10.000 secuencias de nucleótidos al sustrato. Los genes ordenados en la micromatriz, cada uno de ellos inmovilizado en el microchip por 10.000 elementos, son aptos para la hibridación en condiciones restrictivas. Pueden generarse sondas

de ADNc etiquetado con fluorescencia incorporando nucleótidos fluorescentes mediante la retrotranscripción del ARN extraído de los tejidos de interés. Las sondas de ADNc etiquetadas que se han aplicado al chip se hibridan con especificidad a cada punto de ADN de la matriz. Tras un lavado restrictivo para eliminar las sondas no específicamente unidas, el chip se escanea con un microscopio láser confocal o mediante otro procedimiento de detección, como una cámara con un dispositivo de carga acoplada. La cuantificación de la hibridación de cada elemento ordenado permite evaluar la abundancia del ARNm correspondiente. Mediante fluorescencia de doble color, las sondas de ADNc etiquetadas por separado y generadas a partir de dos fuentes de ARN se hibridan por pares en la matriz. Por tanto, la abundancia relativa de los transcritos de las dos fuentes correspondientes a cada gen específico se determina simultáneamente. La escala miniaturizada de la hibridación permite una evaluación oportuna y rápida del modelo de expresión de una gran cantidad de genes. Estos procedimientos han mostrado tener la sensibilidad necesaria para detectar transcritos poco frecuentes, que se expresan en bajas cantidades en cada célula, y detectar de forma reproducible al menos el doble de diferencias en los niveles de expresión (Schena y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(2):106-149 (1996)). El análisis de las micromatrices puede realizarse con equipos disponibles en el mercado, siguiendo los protocolos de los fabricantes, como la tecnología Affymetrix GENCHIP™ o la tecnología de micromatrices de Incyte.

El desarrollo de los procedimientos de micromatrices para el análisis a gran escala de la expresión génica permite buscar sistemáticamente marcadores moleculares de clasificación del cáncer y hacer pronósticos en diversas clases de tumores.

(iv) Análisis en serie de la expresión génica (SAGE)

El análisis en serie de la expresión génica (SAGE, según sus siglas en inglés) es un procedimiento que permite el análisis simultáneo y cuantitativo de un gran número de transcritos genéticos, sin la necesidad de proporcionar una sonda de hibridación para cada transcrito. Primero, se genera una secuencia marcada corta (aproximadamente 10-14 pares de bases) que contiene suficiente información para identificar de manera única un transcrito, siempre que la marca se obtenga de una posición única dentro de cada transcrito. Después, muchos transcritos se unen para formar moléculas en serie largas, que se pueden secuenciar, revelando la identidad de múltiples marcas simultáneamente. El patrón de expresión de cualquier población de transcritos se puede evaluar cuantitativamente al determinar la abundancia de marcas individuales e identificando el gen que corresponda a cada marca. Para obtener más detalles consultar, p. ej., Velculescu y col., *Science* 270:484-487 (1995); y Velculescu y col., *Cell* 88:243-51 (1997).

(v) Tecnología MassARRAY

La tecnología MassARRAY (Sequenom, San Diego, California) es un procedimiento automatizado y de alto rendimiento de análisis de expresión génica que utiliza espectrometría de masas (MS) para la detección. De acuerdo con este procedimiento, después del aislamiento del ARN, transcripción inversa y amplificación por PCR, los ADNc se someten a la extensión por cebador. Los productos de la extensión del cebador derivados del ADNc se purifican y se colocan en un micromatriz que se carga con los componentes necesarios para la preparación de la muestra para MALTI-TOF MS. Los varios ADNc presentes en la reacción se cuantifican al analizar las áreas pico en el espectro de masa obtenido.

(vi) *Análisis de la expresión génica mediante secuenciación masiva y paralela MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing)*

Este procedimiento, descrito por Brenner y col., *Nature Biotechnology* 18:630-634 (2000), es un enfoque de secuenciación que combina la secuenciación distintiva no basada en gel con clonación *in vitro* de millones de moldes en microperlas separados, de 5 microgramos de diámetro. Primero, se construye una librería de microperlas de moldes de ADN mediante clonación *in vitro*. Después se ensambla una matriz plana del molde que contiene las microperlas en flujo celular a alta densidad (generalmente mayor a 3×10^6 microperlas/cm²). Los extremos libres de los moldes clonados en cada microperlas se analizan simultáneamente utilizando un procedimiento de secuenciación distintiva basado en fluorescencia que no requiere de la separación del fragmento de ADN. Se ha demostrado que este procedimiento proporciona, de manera simultánea y precisa, en una sola operación, cientos de miles de secuencias distintivas de genes desde una librería de ADNc de levaduras.

(vii) *Inmunohistoquímica*

Los procedimientos inmunohistoquímicos son también adecuados para detectar los niveles de expresión de los marcadores de pronóstico de esta invención. Por lo tanto, para detectar la expresión se utilizan anticuerpos o antisuero, preferentemente antisuero policlonal, y más preferentemente anticuerpos monoclonales específicos para cada marcador. Los anticuerpos se pueden detectar por marcación directa de los anticuerpos mismos, por ejemplo, con marcas radioactivas, marcas fluorescentes, marcas de hapteno como por ejemplo, biotina o una enzima como la peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Alternativamente, se utiliza anticuerpo primario no marcado junto con anticuerpo secundario marcado, que comprende antisuero, antisuero policlonal o anticuerpo monoclonal específico del anticuerpo primario. Los protocolos y kits inmunohistoquímicos son conocidos en la materia y están disponibles comercialmente.

(viii) *Proteómica*

El término "proteoma" se define como la totalidad de proteínas presentes en una muestra (por ejemplo tejido, un organismo o un cultivo celular) en un momento determinado. La proteómica incluye, entre otras cosas, el estudio de los cambios globales de la expresión proteica en una muestra (también conocida como "expresión proteómica"). La proteómica generalmente incluye las siguientes etapas: (1) separación de las proteínas individuales en una muestra por electroforesis en gel 2-D (electroforesis en gel de poliacrilamida 2-D), (2) identificación de las proteínas individuales recuperadas del gel, por ejemplo, por espectrometría de masas o secuenciación del extremo N terminal, y (3) análisis de los datos utilizando bioinformática. Los procedimientos proteómicos son complementos valiosos de otros procedimientos de perfil de expresión génica y se pueden utilizar solos o junto con otros procedimientos para detectar productos de los marcadores de pronóstico de esta invención.

(ix) *Descripción general del aislamiento, purificación y amplificación del ARN mensajero*

Estas etapas de un protocolo representativo para crear perfiles de expresión génica utilizando tejidos fijos y embebidos en parafina como la fuente de ARN, que incluye aislamiento del ARNm, purificación, extensión del cebador y amplificación, se presentan en varios artículos publicados en revistas (por ejemplo: Godfrey y col. *J. Molec. Diagnostics* 2: 84-91 (2000)); Specht y col., *Am. J. Pathol.* 158: 419-29 (2001)). De manera breve, un procedimiento representativo comienza cortando secciones gruesas de 10 microgramos de muestras de tejido tumoral

embebidas en parafina. Después se extrae el ARN, y se elimina la proteína y el ADN. Después del análisis de la concentración de ARN, se pueden incluir etapas de reparación y/o amplificación de ARN, de ser necesario, y el ARN se retrotranscribe utilizando promotores específicos de los genes seguidos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Finalmente, los datos se analizan para identificar las mejores opciones de tratamiento disponibles para el paciente en base al patrón de expresión génica identificado en la muestra tumoral examinada.

III. Producción de anticuerpos

En la realización preferida, el inhibidor de HER es un anticuerpo anti HER. A continuación se presenta una descripción de las técnicas ejemplares para la producción de anticuerpos utilizados de acuerdo con esta invención. El antígeno HER que se utiliza para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de HER o una porción del mismo, que contenga el epítipo deseado. Alternativamente, las células que expresan HER en su superficie celular (*por ejemplo*, células NIH-3T3 transformadas para sobreexpresar HER2, o una línea celular de carcinoma como por ejemplo células SK-BR-3, consultar Stancovski y *col. PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991)) se pueden utilizar para generar anticuerpos. Otras formas del receptor HER útiles para generar anticuerpos serán aparentes para aquellos expertos en la materia.

(i) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se producen preferentemente en animales mediante inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante a una proteína que es inmunogénica en la especie que se está inmunizando, *por ejemplo*, hemocianina de Kehole Limpet (HKL), albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de la tripsina de la soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoilsulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en donde R y R^1 son grupos alquílicos.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados al combinar, *por ejemplo*, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con tres volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectar la solución intradérmicamente en múltiples lugares. Un mes más tarde los animales se refuerzan con entre 1/5 y 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples lugares. Entre siete y catorce días más tarde los animales se desangran y el suero se analiza para titular los anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta obtener los niveles adecuados de titulación. Preferentemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo reticulante diferente. Los conjugados también se pueden hacer en cultivos celulares recombinantes como fusiones proteicas. También, los agentes agregantes como el alumbre se utilizan para incrementar la respuesta inmune.

(ii) Anticuerpos monoclonales

Varios procedimientos para realizar anticuerpos monoclonales de la presente memoria descriptiva están disponibles en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se realizan utilizando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y *col.*, *Nature*, 256:495 (1975), mediante métodos de ADN recombinantes (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567).

158

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, como un hámster, se inmuniza como se describió anteriormente para obtener linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Después, los linfocitos se fusionan con las células de mieloma utilizando un agente fusionante adecuado, como por ejemplo polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Por lo tanto, las células de hibridoma preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales no poseen la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células con déficit de HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan altos niveles estables de producción de anticuerpos por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio como el medio HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, como aquellas derivadas de los tumores de ratones MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EEUU, y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en el American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); and Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

El medio de cultivo en el cual las células hibridoma crecen se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos directamente contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma está determinada por la inmunoprecipitación o por un ensayo de unión, como el radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis Scatchard de Munson y col., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de identificar que las células de hibridoma producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y pueden crecer mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como tumores con ascitis en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan del medio de cultivo, fluidos ascíticos o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales, como por ejemplo, proteína-A-sefariosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad.

Se aísla el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales y se secuencía utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que

codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan en células huésped como por ejemplo células *E. coli*, células COS de monos, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen el anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de reseña sobre expresión recombinante en bacterias del ADN que codifican el anticuerpo incluyen Skerra y col., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückerthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

En otra forma de realización, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de librerías de fagos de anticuerpos generados mediante las técnicas descritas en McCafferty y col., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando librerías de fagos. Las publicaciones subsiguientes describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante combinación de cadenas (Marks y col., *BioTechnology*, 10:779-783 (1992)), así como una infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir librerías de fagos muy grandes (Waterhouse y col., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpo monoclonal tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación de los dominios constantes de la cadena pesada y cadena ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567, y Morrison, y col., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o uniendo covalentemente todo o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido, que no sea inmunoglobulina, a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina.

Típicamente dichos polipéptidos que no son inmunoglobulinas se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación del antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprenda un sitio de combinación del antígeno con especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación del antígeno que tenga especificidad para otro antígeno diferente.

(iii) Anticuerpos humanizados

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos están descritos en la materia. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducido en el mismo desde una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se conocen generalmente como residuos "importados" que generalmente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente a través del método de Winter y colegas (Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven y col., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), al sustituir las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567) en donde se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de especies no humanas. En la práctica, los anticuerpos humanizados son generalmente anticuerpos humanos en donde los residuos

de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos FR se sustituyen por residuos de sitios análogos de anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se utilizarán para realizar los anticuerpos humanizados es muy importante para disminuir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método del "más apto", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de un roedor se compara con toda la librería conocida de secuencias de dominio variable de humanos. Se acepta la secuencia humana que sea más parecida a la de los roedores, entonces, como la región estructural humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims y col., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia y col., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro procedimiento utiliza una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma estructura se puede utilizar para diferentes anticuerpos humanizados (Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta y col., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Es también importante que los anticuerpos se humanicen con retención de la afinidad alta para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con el procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales que utilizan modelos tridimensionales de las secuencias parentales y de las humanizadas. Los modelos tridimensionales de la inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la materia. Existen programas informáticos disponibles que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que tienen influencia en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras y de importación para lograr la característica deseada del anticuerpo, como por ejemplo una mayor afinidad por el/los antígeno(s). En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión del antígeno.

WO01/00245 describe ejemplos de la producción de anticuerpos HER2 humanizados que se unen a HER2 y bloquean la activación del ligando de un receptor HER. El anticuerpo humanizado que es de particular interés en la presente memoria descriptiva bloquea la activación mediada del EGF, TGF- α y/o HRG de la MAPK esencialmente de manera tan eficaz como el anticuerpo monoclonal murino 2C4 (o fragmento Fab all) y/o une HER2 esencialmente de manera tan eficaz como el anticuerpo monoclonal murino 2C4 (o fragmento Fab all). El anticuerpo humanizado de la presente memoria descriptiva, por ejemplo, comprende residuos de la región hipervariable no humanos incorporados a un dominio pesado variable humano y además puede comprender una sustitución de la región estructural (FR) en una posición seleccionada del grupo compuesto por 69H, 71H y 73H que utiliza el sistema de numeración de dominio variable especificado en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En otra forma de realización, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones de FR en dos o todas las posiciones 69H, 71H y 73H.

Un ejemplo de anticuerpo humanizado que es de interés en la presente memoria descriptiva comprende residuos determinantes de complementariedad del dominio pesado variable GFTFTDYTEMX, en donde X es

preferentemente D o S (identificador de secuencia N° 7), DVNPNSGGSIYNQRFKG (identificador de secuencia N° 8); y/o NLGPSFYFDY (identificador de secuencia N° 9), que comprenden de manera opcional modificaciones de aminoácidos de aquellos residuos CDR, *por ej.*, en donde las modificaciones mantienen o mejoran esencialmente la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante del anticuerpo de interés puede tener desde aproximadamente uno a aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias variables pesadas CDR anteriores. Dichas variantes de anticuerpos se pueden preparar por maduración de afinidad, *por ej.*, como se describe a continuación. El anticuerpo humanizado más preferido comprende la secuencia aminoacídica del dominio variable pesado con identificador de secuencia N° 4.

El anticuerpo humanizado puede comprender residuos determinantes de complementariedad de dominio ligero variables KASQDVSIGVA (identificador de secuencia N° 10); SASYX¹X²X³, en donde X¹ es preferentemente R o L, X² es preferentemente Y o E, y X³ es preferentemente T o S (identificador de secuencia N° 11); y/o QQYYIYPYT (identificador de secuencia N° 12), *por ej.* además de aquellos residuos CDR de dominio pesado variable del párrafo anterior. Dichos anticuerpos humanizados comprenden de manera opcional modificaciones de aminoácidos de los residuos CDR mencionados anteriormente, *por ej.*, en donde las modificaciones mantienen o mejoran esencialmente la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante del anticuerpo de interés puede tener desde aproximadamente de una a aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias CDR variables ligeras anteriores. Dichas variantes de anticuerpos se pueden preparar por maduración de afinidad, *por ej.*, como se describe a continuación. El anticuerpo humanizado más preferido comprende la secuencia aminoacídica del dominio variable ligero con identificador de secuencia N° 3.

Esta solicitud también contempla los anticuerpos con afinidad madurada que se unen a HER2 y bloquean la activación del ligando de un receptor HER. El anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, *por ej.*, uno que comprenda las secuencias variables ligeras y/o pesadas con identificador de secuencia N° 3 y 4, respectivamente (*es decir.* variante 574). El anticuerpo con afinidad madurada preferentemente se une al receptor HER2 con una afinidad superior a aquella del 2C4 murino o variante 574 (*por ej.*, con afinidad mejorada de aproximadamente dos o aproximadamente cuatro veces, a aproximadamente 100 veces o aproximadamente 1000 veces, *por ej.*, tal como se evalúa utilizando un dominio extracelular HER2 (ECD) ELISA). Los ejemplos de residuos pesados variables CDR para sustitución incluyen H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, o combinaciones de dos o más (*por ej.* dos, tres, cuatro, cinco, seis, o siete de estos residuos). Ejemplos de residuos ligeros variables CDR para alteración incluyen L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 o la combinación de dos o más (*por ej.* dos a tres, cuatro, cinco o hasta aproximadamente diez de estos residuos).

Se contemplan varias formas del anticuerpo humanizado o de anticuerpo con afinidad madurada. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o el anticuerpo con afinidad madurada puede ser un fragmento de anticuerpo, como por ejemplo Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agente(s) citotóxicos para generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado o el anticuerpo con afinidad madurada puede ser un anticuerpo intacto, como un anticuerpo intacto IgG1. El anticuerpo intacto IgG1 preferido comprende la secuencia de cadena ligera con identificador de secuencia N° 13 y la secuencia de cadena pesada con identificador de secuencia N° 14.

(iv) *Anticuerpos humanos*

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, actualmente es posible producir animales transgénicos (*por ej.*, ratones) que sean capaces, una vez inmunizados, de producir un completo repertorio de anticuerpos humanos cuando no exista producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la región del gen (J_H) en ratones quiméricos y en líneas germinales de ratones mutantes ocasiona la completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de la inmunoglobulina de la línea germinal humana en la línea germinal de dicho ratón mutante ocasionará la producción de anticuerpos humanos frente al antígeno presentado. Consultar, *por ej.*, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann y col., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y Patentes de los Estados Unidos Nº 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

Alternativamente, se puede utilizar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty y col., *Nature* 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, del repertorio de genes de dominios de inmunoglobulina variables (V) de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta tecnología, los genes de dominios V de anticuerpos se clonan en pauta de lectura con un gen proteico de revestimiento mayor o menor de un bacteriófago filamentosos, como el M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosos contiene una copia de ADN monocatenario del genoma fago, las selecciones que se basan en propiedades funcionales del anticuerpo también resultan en la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita alguna de las propiedades de la célula B. La presentación en fagos se puede realizar en una variedad de formatos, para su reseña consulte, *por ej.*, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Se pueden utilizar varias fuentes de segmentos del gen V para la presentación en fagos. Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) aislaron un conjunto de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña librería combinatorial de genes V aleatoria derivada de bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos contra un gran conjunto de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), o Griffith y col., *EMBO J.* 12:725-734 (1993) Consultar también las Patentes de los Estados Unidos Nº 5.565.332 y 5.573.905.

Tal y como se describe anteriormente, los anticuerpos humanos también se pueden generar mediante células B activadas *in vitro* (Consultar patentes de los Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275).

Los anticuerpos humanos contra el HER2 se describen en la patente de los Estados Unidos núm. 5.772.997 concedida el 30 de junio de 1998 y WO 97/00271 publicada el 3 de enero de 1997.

(v) *Fragmentos de anticuerpos*

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos que comprendan una o más regiones de unión del antígeno. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (consultar, *por ej.*, Morimoto y col., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); y Brennan y col., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente en células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las librerías de fagos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se puede recuperar directamente de *E. coli* y ser químicamente unidos para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente desde cultivos de células huésped recombinantes. Otra técnica para la producción de fragmentos de anticuerpos será aparente para aquellos profesionales expertos. En otras formas de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena simple (scFv). Consultar el documento WO 93/16185; la patente de los Estados Unidos N° 5.571.894; y la patente de los Estados Unidos N° 5.587.458. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", *por ej.*, tal y como se describe en la patente de los Estados Unidos N° 5.641.870 por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) *Anticuerpos biespecíficos*

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares se pueden unir a dos epítopos diferentes de la proteína HER2. Otros anticuerpos de este tipo pueden combinar un punto de unión HER2 con un(unos) punto(s) de unión para EGFR, HER3 y/o HER4. Alternativamente, un brazo HER2 se puede combinar con un grupo que se una a una molécula activadora en un leucocito como por ejemplo una molécula receptora de célula-T (*por ej.* CD2 o CD3), o receptores Fc para IgG (FcγR), como por ejemplo FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celulares en la célula que expresa HER2. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos de las células que expresan HER2. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a HER2 y un brazo que se une al agente citotóxico (*por ej.* saporin, anti-interferón-α, alcaloide de la vinca, cadena A de ricino, metotrexato o hapteno con un isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (*por ej.* anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico HER2/FcγRIII y la patente de los Estados Unidos N° 5.837.234 desvela un anticuerpo biespecífico contra HER2/FcγRI IDM1 (Osidem). Un anticuerpo biespecífico HER2/Fcα se muestra en el documento WO98/02463. La patente de los Estados Unidos 5.821.337 enseña un anticuerpo biespecífico HER2/CD3. MDX-210 es un HER2-FcγRIII Ab biespecífico.

Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la materia. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein y col., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales

164

sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante complicada y la producción de producto es baja. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Traunecker y col., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (puntos de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan en las secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Es preferible tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contengan el lugar necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, de cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se co-transfectan a un organismo huésped adecuado. Esto mantiene la gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de tres fragmentos polipéptidos en realizaciones en donde las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizados en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación de dos o de las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión es de al menos de dos cadenas de polipéptidos en resultados con proporciones iguales en rendimientos altos o cuando las proporciones no tienen particular importancia.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una de las mitades de la molécula biespecífica proporciona un método fácil de separación. Este enfoque se desveló en el documento WO 94/04690. Para obtener mayores detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos consultar, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la patente de los Estados Unidos N° 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos se puede modificar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de un cultivo celular recombinante. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante del anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales cortas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula del anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más largas (*por ej.* tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) larga(s) se crean en la interfaz de la segunda molécula del anticuerpo al reemplazar las cadenas laterales largas de aminoácidos por cadenas más cortas (*por ej.* alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre los productos finales no deseados como los homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulantes o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede unir a la avidina o a la biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para actuar sobre las células no deseadas de las células del sistema inmune (patente de los Estados

Unidos N° 4.676.980) y para el tratamiento de la infección de VIH (WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden realizar utilizando cualquier procedimiento reticulante. Los agentes reticulantes adecuados son bien conocidos en la materia, y se desvelan en la patente de los Estados Unidos N° 4.676.980 junto con un gran número de técnicas reticulantes.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descritos en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar utilizando una unión química. Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985) describe un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se separan proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen con la presencia de arsenito de sodio del agente que forma complejos con el ditiol para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces a derivados del tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab' -TNB se reconvierte entonces en Fab' -tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar de otro derivado Fab' -TNB para formar un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Descubrimientos actuales han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab' -SH de *E. coli*, que se pueden unir químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico $F(ab')_2$ completamente humanizada. Cada fragmento Fab' se secretó de manera separada a partir de *E. coli* y se sometió a unión química dirigida *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico formado era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor HER2 y las células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito varias técnicas para realizar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny y col., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros del anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a aparearse con los dominios complementarios V_L y V_H de otro fragmento, formando, por lo tanto, dos lugares de unión del antígeno. También se ha informado otra estrategia para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros FV de cadena única (sFv). Consultar Gruber y col., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt y col. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(vii) *Otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos*

Se contemplan la(s) modificación(es) de la secuencia de aminoácidos descritas en la presente memoria. Por ejemplo, se puede querer mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se pueden preparar al introducir cambios nucleótidos adecuados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis del péptido. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de y/o inserciones dentro y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias del aminoácido del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios aminoacídicos también pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo, como por ejemplo cambiar el número o la posición de los lugares de glicosilación.

Un procedimiento útil para identificar ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se llaman "mutagénesis de barrido de alanina" tal como lo describe Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). Aquí, se identifica un residuo o un grupo de residuos dianas (*por ej.* residuos cargados como por ejemplo arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplazan por aminoácidos cargados neutra o negativamente (preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Estas ubicaciones de los aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan al introducir más u otras variantes en, o por, los sitios de sustitución. Por lo tanto, a pesar de que el lugar para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminada, la naturaleza de la mutación *per se* no se necesita predeterminar. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un lugar dado, se realiza el barrido de alanina o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las variantes expresadas del anticuerpo se monitorizan para detectar la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones en los extremos amino y/o carboxi terminal que abarcan desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más de residuos, así como inserciones dentro de la secuencia de uno o múltiples residuos de aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionil en el extremo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o terminal o C del anticuerpo a una enzima (*por ej.* para ADEPT) o un polipéptido que aumente la semivida sérica del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución aminoacídica. Estas variantes reemplazan al menos un residuo de aminoácidos en la molécula del anticuerpo por un residuo diferente. Los lugares de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero las alteraciones FR también se contemplan. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 debajo del encabezado "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones ocasionan un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe a continuación con referencia a las clases de aminoácidos, y los productos se pueden monitorizar.

Tabla 1

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la columna vertebral del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación plana o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el lugar diana, o (c) el residuo de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo a similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda ed., págs. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

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

Alternativamente, los residuos que aparecen naturalmente se pueden dividir en grupos basándose en sus propiedades comunes de las cadenas laterales:

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

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína no implicado en mantener la conformación adecuada del anticuerpo también se puede sustituir, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar interacciones atípicas. A la inversa, la(s) unión(es) de cisteína se pueden agregar al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo como por ejemplo un fragmento Fv).

Un tipo de variante de sustitución particularmente preferido implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo parental (*por ej.* un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para mayor desarrollo tendrá(n) propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental desde el cual se generaron. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución involucra la maduración de afinidad utilizando una presentación en fagos. De manera resumida, varios lugares de región hipervariable (*por ej.* 6-7 lugares) se mutan para generar todas las sustituciones posibles de aminoácidos en cada lugar. Las variantes del anticuerpo generadas de esta manera se presentan de manera monovalente de las partículas fagos filamentosas como fusiones al producto del gen III de M13 dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se monitorizan para detectar su actividad biológica (*por ej.* afinidad de unión) como se desvela en esta memoria descriptiva. Para identificar los lugares de la región hipervariable candidatos para la modificación, se pueden realizar barridos de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión del antígeno. De manera alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el HER2 humano. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes son candidatos a la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente memoria descriptiva. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes está sujeto a monitorización tal como se describe en la presente memoria descriptiva y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para mayor desarrollo.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Alterar significa borrar uno o más residuos glucídicos encontrados en el anticuerpo, y/o agregar uno o más lugares de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de anticuerpos es generalmente por enlace tipo N o tipo O. Por enlace tipo N se refiere al anclaje del residuo glucídico en la cadena lateral de un residuo de asparragina. Las secuencias de tripéptidos asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto la prolina, son las

secuencias de reconocimiento para los anclajes enzimáticos del residuo glucídico a la cadena lateral de asparragina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un lugar de glicosilación potencial. La glicosilación por enlace tipo O se refiere al anclaje de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, a pesar de que también se puede utilizar 5-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente al alterar la secuencia del aminoácido para que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descrita anteriormente (para lugares de glicosilación unidos por enlace tipo N). La alteración también se puede realizar además mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para lugares de glicosilación unidos por enlace tipo O).

Donde el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido al mismo. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidratos madura que no tienen fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la solicitud de patente de los Estados Unidos N° 2003/0157108 A1, Presta, L. Ver también los documentos US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) biceptriz en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo se describe en el documento WO03/011878, Jean-Mairet *y col.* y en la patente de los Estados Unidos N° 6,602,684, Umana *y col.* Los anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se describe en el documento WO97/30087, Patel *y col.* Consultar, también, los documentos WO98/58964 (Raju, S.) y WO99/22764 (Raju, S.) con respecto a los anticuerpos con carbohidratos alterados unidos a la región Fc del mismo.

Puede quererse modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, *por ej.* para incrementar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede lograr al introducir uno o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc del anticuerpo. De manera alternativa o adicional, un(os) residuo(s) de cisteína se puede(n) introducir en la región Fc, por lo tanto permitiendo la formación de un puente disulfuro entre las cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener mayor capacidad de internalización y/o mayor muerte celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Consultar Caron *y col.*, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con mayor actividad antitumoral también se pueden preparar utilizando reticuladores heterobifuncionales tal como se describe en Wolff *y col.* *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). De manera alternativa, se puede diseñar un anticuerpo con dobles regiones Fc y se puede, por lo tanto, potenciar la lisis por complemento y las capacidades ADCC. Consultar Stevenson *y col.* *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

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

Los anticuerpos con unión C1q alterada y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) se describen en el documento WO99/51642, la patente de los Estados Unidos N° 6.194.551B1, la patente de los Estados Unidos N° 6.242.195B1, la patente de los Estados Unidos N° 6.528.624B1 y la patente de los Estados Unidos N° 6.538.124 (Idusogie y col.) Los anticuerpos comprenden la sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones del aminoácido 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de la región Fc del mismo.

Para incrementar la semivida sérica del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento del anticuerpo) tal como se describe en la patente de los Estados Unidos 5.739.277, por ejemplo. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "epítipo de unión a receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (*por ej.* IgG₁, IgG₂, IgG₃, or IgG₄) que es responsable de incrementar la semivida sérica *in vivo* de la molécula IgG.

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

También se contemplan los anticuerpos diseñados con dos o más (preferentemente cuatro) lugares funcionales de unión al antígeno (solicitud de patente N° US2002/0004587 A1, Miller y col.).

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la materia. Estos procedimientos incluyen, pero no están limitados a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de la secuencia de los aminoácidos que aparezcan naturalmente) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigido al lugar), mutagénesis dirigida mediante PCR y mutagénesis por inserción de un casete de una variante preparada anteriormente o de una versión no variante del anticuerpo.

(viii) Monitorización para encontrar anticuerpos con las propiedades deseadas

Anteriormente se han descrito técnicas para generar anticuerpos. Se pueden seleccionar más anticuerpos con ciertas características biológicas, tal como se desee.

Para identificar un anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER, se puede determinar la capacidad del anticuerpo de bloquear el ligando HER que se une a las células que expresan el receptor HER (*por ej.* junto con otro receptor HER con el cual el receptor HER de interés forma un heteroligómero HER). Por ejemplo, las células que naturalmente expresan, o transfectadas para expresar, receptores HER del heteroligómero HER se pueden incubar con el anticuerpo y después exponerse al ligando HER marcado. Se puede evaluar la capacidad del anticuerpo de bloquear un ligando que se une a un receptor HER en el heteroligómero HER.

Por ejemplo, la inhibición de la unión del HRG a líneas celulares de tumor de mama MCF7 por anticuerpos HER2 se puede realizar utilizando cultivos de MCF7 en monocapa en hielo en un formato de placa de 24 pocillos esencialmente como se describe en el documento WO01/00245. Los anticuerpos monoclonales HER2 se pueden

agregar a cada pocillo e incubar durante 30 minutos. Se puede agregar rHRG β 1₁₇₇₋₂₂₄ etiquetado con I¹²⁵(25 pm), y entonces la incubación puede continuar de 4 a 16 horas. Se pueden preparar curvas dosis-respuesta y se puede calcular un valor IC₅₀ para el anticuerpo de interés. En una forma de realización, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER tendrá una IC₅₀ para inhibir la unión de HRG a las células MCF7 en este ensayo, de aproximadamente 50 nM o menos, más preferentemente 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo como por ejemplo el fragmento Fab, la IC₅₀ para inhibir la unión HRG a las células MCF7 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menos, preferentemente 50 nM o menos.

De manera alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar la capacidad de un anticuerpo de bloquear la fosforilación de tirosina estimulada por el ligando de HER de un receptor HER presente en un heteroligómero HER. Por ejemplo, las células que expresan de manera endógena los receptores HER o transfectadas para expresarlos se pueden incubar con el anticuerpo y después evaluarse para detectar la actividad de fosforilación de tirosina estimulada por ligando HER utilizando un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (que se conjuga de manera óptima con una marca detectable). El ensayo de activación del receptor quinasa descrito en la patente de los Estados Unidos N° 5.766.863 también está disponible para determinar la activación y del receptor HER y el bloqueo de esa actividad por parte de un anticuerpo.

En otra forma de realización, se puede monitorizar un anticuerpo que inhibe la estimulación por HRG de la fosforilación de tirosina p180 en células MCF7 esencialmente como se describe en el documento WO01/00245. Por ejemplo, las células MCF7 se pueden colocar en placas de 24 pocillos y los anticuerpos monoclonales contra HER2 se pueden agregar a cada pocillo e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente; después, se puede agregar rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ a cada pocillo para obtener una concentración final de 0,2 nM, y la incubación se puede prolongar durante 8 minutos. El medio se puede aspirar de cada pocillo, y las reacciones se pueden detener mediante la adición de 100 μ l de tampón de muestra con SDS (5% SDS, DTT 25 mM, y Tris-HCl 25 mM, pH 6,8). Cada muestra (25 μ l) se puede someter a electroforesis en un gel con gradiente de 4-12% (Novex) y después se puede transferir electroforéticamente a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Se pueden desarrollar inmunotransferencias de antifosfotirosina (a 1 μ g/ml), y la intensidad de la banda reactiva predominante a M_r ~180,000 se puede cuantificar mediante densitometría de reflectancia. El anticuerpo seleccionado preferentemente inhibirá de manera significativa la estimulación por HRG de la fosforilación de la tirosina p180 hasta aproximadamente un 0-35% del control de este ensayo. Se puede preparar una curva dosis-respuesta para la inhibición de la estimulación por HRG de la fosforilación de la tirosina p180 tal como lo determine la densitometría de reflectancia y se puede calcular una IC₅₀ para el anticuerpo de interés. En una forma de realización, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER tendrá una IC₅₀ para inhibir la estimulación por HRG de la fosforilación de la tirosina p180 en este ensayo, de aproximadamente 50 nM o menos, más preferentemente 10 nM o menos. Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo como por ejemplo el fragmento Fab, la IC₅₀ para inhibir la estimulación por HRG de la fosforilación de la tirosina p180 en este ensayo puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o menos, preferentemente 50 nM o menos.

También se puede evaluar los efectos de la inhibición del crecimiento del anticuerpo en células MDA-MB-175, por ej., esencialmente como se describe en Schaefer y col. *Oncogene* 15:1385-1394 (1997). De acuerdo con este

ensayo, las células MDA-MB-175 se pueden tratar con un anticuerpo monoclonal HER2 (10 µg/mL) durante 4 días y se puede teñir con cristal violeta. La incubación con un anticuerpo anti HER2 puede mostrar un efecto de inhibición del crecimiento en esta línea celular similar al que muestra un anticuerpo monoclonal 2C4. En otra forma de realización, la HRG exógena no revertirá significativamente esta inhibición. Preferentemente, el anticuerpo será capaz de inhibir la proliferación celular de células MDA-MB-175 en mayor medida que un anticuerpo monoclonal 4D5 (y opcionalmente en mayor medida que un anticuerpo monoclonal 7F3), ambos en presencia y ausencia de HRG exógena.

En otra forma de realización, el anticuerpo anti HER2 de interés puede bloquear la asociación dependiente de heregulina de HER2 con HER3 tanto en células MCF7 como SK-BR-3, tal y como se determina en un experimento de coimmunoprecipitación como por ejemplo aquél descrito en el documento WO01/00245, de manera más eficaz que el anticuerpo monoclonal 4D5, y preferentemente de manera más eficaz que el anticuerpo monoclonal 7F3.

Para identificar los anticuerpos contra el HER2 inhibidores del crecimiento, se puede buscar anticuerpos que inhiban el crecimiento de las células cancerígenas que sobreexpresan HER2. En otra forma de realización, el anticuerpo inhibidor del crecimiento de elección es capaz de inhibir el crecimiento de las células SK-BR-3 en un cultivo celular en aproximadamente un 20-100% y preferentemente en aproximadamente un 50-100% a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. Para identificar dichos anticuerpos, se puede realizar el ensayo SK-BR-3 descrito en la patente de los Estados Unidos 5.677.171. De acuerdo con este ensayo, las células SK-BR-3 crecen en una mezcla 1:1 de medio F12 y DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino, glutamina y estreptomycin-penicilina. Las células SK-BR-3 se colocan a razón de 20.000 células en una placa de cultivo celular de 35 mm (2 ml/placa de 35 mm). Se agregan 0,5 a 30 µg/ml del anticuerpo contra el HER2 por placa. Después de seis días, se cuenta la cantidad de células, comparada con las células no tratadas, mediante un contador celular electrónico COULTER™. Aquellos anticuerpos que inhiben el crecimiento de las células SK-BR-3 en aproximadamente un 20-100% o aproximadamente un 50-100% se pueden seleccionar como anticuerpos inhibidores del crecimiento. Consultar la patente de los Estados Unidos 5.677.171 para ensayos para detectar anticuerpos inhibidores del crecimiento como por ejemplo 4D5 y 3E8.

Para seleccionar anticuerpos que producen apoptosis, se encuentra disponible un ensayo de unión a anexina que utiliza células BT474. Las células BT474 se cultivan y se siembran en placas tal y como se describe en el párrafo anterior. Después el medio se retira y se reemplaza con un medio nuevo sólo o que contenga 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal. Después de un período de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se separan por tripsinización. Después las células se centrifugan, se resuspenden en un tampón de unión a Ca²⁺ y se alicuotan en tubos tal y como se describe anteriormente para un ensayo de células muertas. Después, se añade a los tubos la anexina marcada (*por ej.* anexina V-FTIC) (1 µg/ml). Las muestras se analizan utilizando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Estos anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina en relación al control se seleccionan como anticuerpos inductores de apoptosis. Además del ensayo de unión a anexina, hay disponible un ensayo de tinción de ADN que utiliza células BT474. Para realizar este ensayo, las células BT474 que se han tratado con el anticuerpo de interés, tal y como se

describe en los dos párrafos anteriores, se incuban con 9 µg/ml de HOECHST 33342™ durante 2 horas a 37°C, después se analizan con un citómetro de flujo EPICS ELITE™ (Coulter Corporation) utilizando el programa MODFIT LT™ (Verity Software House). Los anticuerpos que inducen un cambio en el porcentaje de células apoptóticas de 2 veces o más (y preferentemente 3 veces o más) que las células no tratadas (hasta células apoptóticas de 100%) se seleccionan como anticuerpos proapoptóticos utilizando este ensayo. Consultar el documento WO98/17797 para obtener ensayos para monitorizar anticuerpos que inducen la apoptosis, como por ejemplo 7C2 y 7F3.

Para monitorizar anticuerpos que se unen a un epítipo en el HER2 unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado habitual, como el que se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988), para evaluar si el anticuerpo realiza un bloqueo cruzado de la unión de un anticuerpo, como por ejemplo 2C4 o pertuzumab, a un HER2. De manera alternativa, o adicional, el mapeo del epítipo se puede realizar mediante procedimientos conocidos en la materia y/o se puede estudiar la estructura del anticuerpo anti HER2 (Franklin y col. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)) para ver qué dominio(s) de HER2 está/están unido(s) al anticuerpo.

(ix) *Composiciones de pertuzumab*

En una forma de realización, la composición del anticuerpo contra el HER2 comprende una mezcla de las especies principales del anticuerpo pertuzumab y una o más variantes del mismo. La forma de realización preferida en esta memoria descriptiva de las especies principales del anticuerpo pertuzumab es una que comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena variable ligera y variable pesada con los identificadores de secuencia N° 3 y 4, y preferentemente que comprenda una secuencia de aminoácidos de cadena ligera seleccionada de los identificadores de secuencia N° 13 y 17, y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada de los identificadores de secuencia N° 14 y 18 (incluyendo las variantes desamidada y/u oxidada de esas secuencias). En una forma de realización, la composición comprende una mezcla de las especies principales del anticuerpo pertuzumab y una variante de la secuencia de aminoácidos del mismo que comprenda una extensión líder del extremo amino terminal. Preferentemente, la extensión líder del extremo amino terminal se encuentra en una cadena ligera del anticuerpo variante (*por ej.* en una o dos cadenas ligeras del anticuerpo variante). La especie principal del anticuerpo contra el HER2 o la variante del anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo (*por ej.* fragmentos Fab del F(ab')₂), pero preferentemente los dos son anticuerpos de longitud completa. La variante del anticuerpo de la presente memoria descriptiva comprende una extensión líder del extremo amino terminal en cualquiera de una o más cadenas pesadas o ligeras del mismo. Preferentemente, la extensión líder del amino-terminal se encuentra en una o más de las cadenas ligeras del anticuerpo. La extensión líder del extremo amino terminal, preferentemente, comprende o está compuesto por VHS-. La presencia de la extensión líder del extremo amino terminal en la composición se puede detectar mediante varias técnicas analíticas que incluyen, pero no se limitan a, análisis de la secuencia del extremo N terminal, ensayo para heterogeneidad de carga (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico o electroforesis de zona capilar), espectrometría de masas, etc. La cantidad de la variante del anticuerpo en la composición generalmente oscila entre una cantidad que constituye el límite de detección de cualquier ensayo (preferentemente el análisis de secuencia del extremo N terminal) utilizado para

detectar la variante hasta una cantidad menor que la cantidad del anticuerpo de la especie principal. Generalmente, aproximadamente el 20% o menos (*por ej.* desde aproximadamente 1% hasta aproximadamente 15%, por ejemplo desde 5% hasta aproximadamente 15%) de las moléculas del anticuerpo en la composición comprende una extensión líder del extremo amino terminal. Dichas cantidades porcentuales se determinan preferentemente utilizando un análisis cuantitativo de la secuencia de extremo N terminal o un análisis de intercambio catiónico (preferentemente utilizando una columna de alta resolución e intercambio catiónico débil, como por ejemplo la columna de intercambio catiónico PROPAC WCX-10™). Además de la variante de la extensión líder del amino-terminal, se contemplan más alteraciones de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo y/o de la variante de la especie principal, incluyendo pero no limitado a un anticuerpo que comprenda un residuo de lisina en el extremo C terminal de una o de las dos cadenas pesadas del mismo, una variante del anticuerpo desamidada, etc.

Además, el anticuerpo o variante de la especie principal puede también constar de variantes de glicosilación, de los cuales ejemplos no limitantes incluyen un anticuerpo que comprenda una estructura oligosacárida G1 o G2 unida a la región Fc del mismo, un anticuerpo que comprenda un residuo glucídico unido a una cadena ligera del mismo (*por ej.* uno o dos residuos glucídicos, tales como glucosa o galactosa, unidos a una o dos cadenas ligeras del anticuerpo, por ejemplo unidas a uno o más residuos de lisina), un anticuerpo que comprenda una o dos cadenas pesadas no glicosiladas, o un anticuerpo que comprenda un oligosacárido sializado unido a una o dos cadenas pesadas del mismo, etc.

La composición se puede recuperar de una línea celular genéticamente modificada, *por ej.* una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) que exprese el anticuerpo contra el HER2, o se puede preparar mediante la síntesis del péptido.

(x) *Inmunos conjugados*

La invención también se relaciona con los inmunos conjugados que comprendan un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico como por ejemplo un agente quimioterapéutico, toxina (*por ej.* una toxina de molécula pequeña o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de la misma), un isótopo radiactivo (*es decir*, un radioconjugado).

Los agentes quimioterapéuticos son útiles en la generación de dichos inmunos conjugados que se han descrito anteriormente. Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, como por ejemplo una calicheamicina, una maitansina (patente de los Estados Unidos N° 5.208.020) un tricoteno, y CC1065 también se contemplan en la presente memoria descriptiva.

En una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo se conjuga con una o más moléculas de maitansina (*por ej.* de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina, por ejemplo, se puede convertir a May-SS-Me que se puede reducir a May-SH3 y hacer reaccionar con un anticuerpo modificado (Chari y col. *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)) para generar un inmunos conjugado maitansinoide-anticuerpo.

Otro inmunos conjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia de antibióticos de la calicheamicina es capaz de producir la ruptura del ADN de hebra doble en concentraciones por debajo de picomolar. Los análogos estructurales de la calicheamicina que se pueden

utilizar incluyen, pero no están limitados a, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG y θ_1^I (Hinman y col. *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993) and Lode y col. *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)). Consultar también las Patentes de los Estados Unidos N° 5.714.586; 5.712.374; 5.264.586; y 5.773.001 expresamente incorporadas en la presente memoria descriptiva por referencia.

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modicina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de la Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de la Saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y el tricotecenos. Consultar, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

Esta invención también contempla un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ej. un ribonucleasa o una endonucleasa de ADN como por ejemplo la desoxiribonucleasa; ADNasa).

Hay disponibles una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos contra el HER2 radioconjugados. Ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radiactivos de Lu.

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden realizar utilizando una variedad de agentes de unión a proteína bifuncionales como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como por ejemplo el dimetiladipimidato HCL), ésteres activos (como por ejemplo disuccinimidil suberato), aldehídos (como por ejemplo glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como por ejemplo bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como por ejemplo bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (como por ejemplo 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis-activos de fluoruro (como por ejemplo 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta y col. *Science* 238: 1098 (1987). El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido a un anticuerpo. Consultar el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación de la droga citotóxica en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil al ácido, un enlazador sensible a la peptidasa, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contenga disulfuro (Chari y col. *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)).

Alternativamente, se puede realizar una fusión de proteínas que contengan el anticuerpo y el agente citotóxico, por ej. mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos.

En la presente memoria descriptiva se contemplan otros inmunoconjugados. Por ejemplo, el anticuerpo se puede unir a uno o varios polímeros no proteináceos, por ej. polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también se puede atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), en

sistemas de presentación de fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16 edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Los anticuerpos desvelados en la presente memoria descriptiva también se formulan como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la materia, como por ejemplo el descrito en Epstein y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); patentes de los Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545; y documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con mayor tiempo de circulación se desvelan en la patente de los Estados Unidos N° 5.013.556.

Los liposomas particularmente útiles se pueden generar mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprenda fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para obtener liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo presentes en esta invención se pueden conjugar con los liposomas tal y como se describe en Martin y col. *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente, el liposoma puede contener un agente quimioterapéutico. Consultar Gabizon y col. *J. National Cancer Inst.* 81(19)1484 (1989).

IV. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de los anticuerpos utilizados de acuerdo con esta invención se preparan para su almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales que sean farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16 edición, Oslo, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones como el fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y metionina; conservantes (como por ejemplo el cloruro de octadecildimetilbenzilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de benzetonio; fenol; alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos como por ejemplo metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como por ejemplo polivinilpirrolidona; aminoácidos como por ejemplo la glicina, glutamina, asparragina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como por ejemplo EDTA; azúcares como por ejemplo sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales como por ejemplo sodio; complejos metálicos (*por ej.* complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos como por ejemplo TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones de anticuerpos liofilizados tal y como se describen en el documento WO 97/04801, se incorporan específicamente por referencia en la presente memoria descriptiva. La formulación de pertuzumab preferida para uso terapéutico comprende 30 mg/mL de pertuzumab en acetato de histidina 20 mM, sacarosa 120 mM, 0,02% de polisorbato 20 con un pH de 6,0. Una formulación alternativa de pertuzumab comprende 25 mg/mL de pertuzumab, solución de histidina-HCl 10 mM, sacarosa 240 mM, 0,02% de polisorbato 20, con un pH de 6,0.

La formulación de la presente memoria descriptiva también contiene más de un compuesto activo tal y como sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. Varios fármacos que se pueden combinar con el inhibidor de HER se describen en el procedimiento del tratamiento de la siguiente sección. Dichas moléculas están presentes en combinación en cantidades que sean eficaces para el fin que se busca.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas de presentación de fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16 edición, Osol, A., Ed., (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de elementos moldeados, *por ej.* películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación controlada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli-(2-hidroxietil-metacrilato), o poli-(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de los Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico degradables como por ejemplo LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones para utilizar en administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

V. Tratamiento con inhibidores de HER

Un paciente con un perfil de expresión tal y como se menciona anteriormente, es candidato para la terapia con un inhibidor de HER, como por ejemplo pertuzumab. En la sección anterior de definiciones se enumeran ejemplos de varios cánceres que se pueden tratar. Este procedimiento se considera particularmente aplicable para la terapia de cáncer de ovario, peritoneal o de las trompas de Falopio; cáncer de mama, incluyendo cáncer de mama metastásico (MBC), cáncer de mama sin sobreexpresión de HER2; y cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC). En una forma de realización, el cáncer que se trata es un cáncer resistente a la quimioterapia o un cáncer resistente al platino. El tratamiento del paciente con el perfil de expresión ocasionará una mejora en los signos o síntomas del cáncer. Por ejemplo, dicha terapia puede ocasionar una mejora en la supervivencia (supervivencia total y/o supervivencia sin progresión) con respecto a un paciente sin el perfil de expresión, y/o puede ocasionar una respuesta clínica objetiva (parcial o completa).

Además del cáncer, los inhibidores de HER se pueden utilizar para tratar varios tipos de enfermedades o desórdenes no malignos con los perfiles de expresión mencionados anteriormente. Dichas enfermedades o trastornos no malignos incluyen enfermedades autoinmunes (*por ej.* psoriasis, consultar definición más arriba) endometriosis; escleroderma; reestenosis; pólipos como por ejemplo pólipos de colon, pólipos nasales o pólipos gastrointestinales; fibroadenoma; enfermedades respiratorias (consultar definición más arriba), colecistitis; neurofibromatosis;

poliquistosis renal; enfermedades inflamatorias; trastornos de la piel que incluye psoriasis y dermatitis; enfermedad vascular (consultar la definición más arriba), dolencias que impliquen la proliferación anormal de células del epitelio vascular; úlceras gastrointestinales; enfermedad de Menetrier, adenoma secretor o síndrome de pérdida de proteínas; trastornos renales; trastornos angiogénicos; enfermedades oculares como por ejemplo la degeneración macular relacionada con la edad, presunto síndrome de histoplasmosis ocular, neovascularización retinal por retinopatía diabética proliferativa, vascularización retinal, retinopatía diabética o degeneración macular relacionada con la edad; patologías óseas como por ejemplo osteoartritis, raquitismo y osteoporosis; daños después de un evento isquémico cerebral; enfermedades fibróticas o con edemas como por ejemplo la cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, tiroiditis, síndrome de hiperviscosidad sistémica, enfermedad de Osler Weber-Rendu, enfermedad pulmonar oclusiva crónica o edema después de quemaduras, traumas, radiación, ataques, hipoxia o isquemia; reacción hipersensible de la piel; retinopatía diabética y nefropatía diabética; síndrome de Guillain-Barre; enfermedad del injerto contra el huésped o rechazo al trasplante; enfermedad de Paget, inflamación ósea o articular, fotoenvejecimiento (*por ej.* ocasionado por la radiación de rayos UV en la piel de los humanos); hipertrofia prostática benigna; ciertas infecciones microbianas que incluyen patógenos microbianos seleccionados de adenovirus, hantavirus, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia spp.* y *Bordetella pertussis*; trombos ocasionados por agregación plaquetaria; dolencias reproductivas como por ejemplo endometriosis, síndrome de hiperestimulación ovárica, preeclampsia, sangrado uterino disfuncional o menometrorragia; sinovitis; ateroma; nefropatías agudas o crónicas (incluyendo glomerulonefritis proliferativa y enfermedad renal inducida por la diabetes); eccemas; formación de cicatrices hipertróficas; shock endotóxico e infección por hongos; poliposis adenomatosa familiar; enfermedades neurodegenerativas (*por ej.* enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con el SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinal y degeneración cerebelosa); síndromes mielodisplásicos; anemia aplástica; lesión isquémica; fibrosis del pulmón, riñón o hígado; enfermedad de hipersensibilidad mediada por células T; estenosis pilórica hipertrófica infantil; síndrome obstructivo urinario; artritis psoriática y tiroiditis de Hashimoto. Las indicaciones no malignas preferidas para la terapia en la presente memoria descriptiva incluyen psoriasis, endometriosis, escleroderma, enfermedad vascular (*por ej.* enfermedad arterial coronaria o hipertensión), pólipos del colon, fibroadenoma o enfermedad respiratoria (*por ej.* asma, bronquitis crónica, bronquiectasia o fibrosis quística).

Preferentemente, el anticuerpo administrado es un anticuerpo desnudo. Sin embargo, el anticuerpo administrado se puede conjugar con un agente citotóxico. Preferentemente, el inmunoconjugado y/o antígeno al que se une lo internaliza la célula, ocasionando una mayor eficacia terapéutica del inmunoconjugado para matar la célula cancerígena a la cuál se une. En una forma de realización preferida, el agente citotóxico actúa o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerígena. Ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen maitansinoides, calicheamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

El inhibidor de HER2 se administra al paciente humano de acuerdo con los procedimientos conocidos, como por ejemplo la administración intravenosa, *por ej.* como un bolo o una infusión continua durante un período de tiempo, mediante vías intramusculares, intraperitoneales, cefalorraquídeas, subcutáneas, intraarticulares, intrasinoviales, intratecales, orales, tópicas o por inhalación. Se prefiere la administración intravenosa del anticuerpo.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada del inhibidor de HER dependerá del tipo de enfermedad que se tratará, tal y como se define anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el fármaco se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al fármaco, y la discreción del médico tratante. El inhibidor de HER se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis inicial candidata para la administración en un paciente es de aproximadamente de 1 µg/kg a 50 mg/kg (*por ej.* 0,1-20 mg/kg) de inhibidor de HER, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante una infusión continua. La dosis preferida del anticuerpo contra el HER se encontrará en el intervalo de aproximadamente de 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, se puede administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg; 2,0 mg/kg; 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de manera intermitente, *por ej.* una vez por semana o cada tres semanas (*por ej.* de modo que el paciente reciba desde aproximadamente dos a aproximadamente veinte, *por ej.* aproximadamente seis dosis del anticuerpo contra el HER). Se puede administrar una mayor carga de dosis inicial seguida de una o más dosis menores. En una forma de realización, un anticuerpo contra el HER se administra como una carga de dosis de aproximadamente 840 mg seguida de aproximadamente 420 mg aproximadamente cada 3 semanas. En otra forma de realización, un anticuerpo contra el HER se administra como una dosis de aproximadamente 1050 mg administrada aproximadamente cada 3 semanas.

Cuando la enfermedad sea cáncer, el paciente se trata preferentemente con una combinación del inhibidor de HER, y uno o más agentes quimioterapéuticos. Preferentemente al menos uno de los agentes quimioterapéuticos es un agente quimioterapéutico antimetabolito como por ejemplo la gemcitabina. La administración combinada incluye la coadministración o administración concurrente, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente exista un período en el cuál ambos (o todos los) agentes activos ejerzan simultáneamente sus actividades biológicas. Por lo tanto, el agente antimetabolito quimioterapéutico se puede administrar antes de, o después de, la administración del inhibidor de HER. En esta forma de realización, el tiempo entre al menos una administración del agente antimetabolito quimioterapéutico y al menos una administración del inhibidor de HER es preferentemente de aproximadamente 1 mes o menos, y más preferentemente de aproximadamente 2 semanas o menos. Alternativamente, el agente antimetabolito quimioterapéutico y el inhibidor de HER se administran al mismo tiempo al paciente, en una única formulación o en formulaciones separadas. El tratamiento con la combinación del agente quimioterapéutico (*por ej.* agente antimetabolito quimioterapéutico como por ejemplo la gemcitabina) y el inhibidor de HER (*por ej.* pertuzumab) puede ocasionar un beneficio terapéutico sinérgico, o mayor en vez de aditivo, para el paciente.

Un agente antimetabolito quimioterapéutico, si se administra, se administra generalmente en dosis conocidas, u opcionalmente disminuidas debido a la acción combinada de los fármacos o a los efectos colaterales negativos atribuibles a la administración del agente antimetabolito quimioterapéutico. Los calendarios de preparación y dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar de acuerdo a las instrucciones del fabricante y tal y como lo determine empíricamente el médico cualificado. Cuando el agente antimetabolito quimioterapéutico

es la gemcitabina, preferentemente, se administra a una dosis de aproximadamente 600 mg/m² a 1250 mg/m² (por ejemplo aproximadamente 1000 mg/m²), por ejemplo, en los días 1 y 8 de un ciclo de 3 semanas.

Además del inhibidor de HER y el agente antimetabolito quimioterapéutico, se pueden combinar otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, se puede administrar un segundo (tercero, cuarto, etc.) agente quimioterapéutico, en donde el segundo agente quimioterapéutico sea otro agente antimetabolito quimioterapéutico diferente o un agente quimioterapéutico que no sea un antimetabolito. Por ejemplo, el segundo agente quimioterapéutico puede ser un taxano (como por ejemplo Paclitaxel o Docetaxel), capecitabino, o un agente quimioterapéutico basado en platino (como por ejemplo Carboplatina, Cisplatina, u Oxaliplatina), antraciclina (como por ejemplo doxorubicina, incluyendo, doxirubicina liposomal), topotecán, pemetrexed, alcaloide de la vinca (como por ejemplo vinorelbina), y TLK 286. Se puede administrar un "Cóctel" de diferentes agentes quimioterapéuticos.

Otros agentes terapéuticos que se pueden combinar con el inhibidor de HER incluyen uno o más de: un segundo inhibidor de HER diferente (por ejemplo, un anticuerpo contra el HER2 inhibidor del crecimiento como por ejemplo trastuzumab, o un anticuerpo contra el HER2 que induzca a la apoptosis de la célula que sobreexpresa el HER2, como por ejemplo 7C2, 7F3, o las variantes humanizadas de ellos); un anticuerpo dirigido contra un tumor diferente asociado al antígeno, como por ejemplo, EGFR, HER3, HER4; compuestos antihormonales, *por ej.* un compuesto antiestrogénico como por ejemplo el tamoxifén, o un inhibidor de la aromatasas, un cardioprotector (para evitar o disminuir cualquier disfunción miocárdica asociada con la terapia); una citoquina; un fármaco que actúe sobre la EGFR (como por ejemplo TARCEVA®, IRESSA® o Cetuximab); un agente antiangiogénico (especialmente Bevacizumab vendido por Genentech bajo la marca registrada de AVASTIN™); un inhibidor de la tirosina quinasa; un inhibidor de la COX (por ejemplo un inhibidor de la COX-1 o la COX-2); un fármaco antiinflamatorio no esteroideo; Celecoxib (CELEBREX®); inhibidor de la farnesil transferasa (por ejemplo Tipifarnib/ZARNESTRA® R115777 disponible de Johnson and Johnson o Lonafarnib SCH66336 disponible de Schering-Plough); anticuerpo que une la proteína CA 125 oncofetal como por ejemplo Oregovomab (MoAb B43.13); vacuna contra el HER2 (como por ejemplo la vacuna HER2 AutoVac de Pharmexia o la vacuna proteica APC8024 de Dendreon, o la vacuna peptídica contra el HER2 de GSK/Corixa); otra terapia contra HER (*por ej.* trastuzumab, cetuximab, gefitinib, erlotinib, CI1033, GW2016 etc.); inhibidor de la Raf y/o ras (consultar, por ejemplo, documento WO 2003/86467); Doxil; Topotecan; taxano; GW572016; TLK286; EMD-7200; un medicamento que trate las náuseas como por ejemplo un antagonista de la serotonina, un esteroide o una benzodiacepina; un medicamento que evite o trate los sarpullidos cutáneos o terapias estándar contra el acné, incluyendo antibióticos tópicos u orales; un medicamento que disminuya la temperatura corporal como por ejemplo acetaminofeno, difenhidramina o meperidina; o factor de crecimiento hematopoyético, etc.

Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados antes mencionados son aquellas que se utilizan actualmente y se pueden disminuir debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el inhibidor de HER.

Además de los regímenes terapéuticos antes mencionados, el paciente puede someterse a la eliminación quirúrgica de las células cancerígenas y/o a radioterapia.

Además de la administración de la proteína del anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración de un inhibidor del anticuerpo o proteína mediante terapia génica. Consultar, por ejemplo, el

documento WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996 con respecto al uso de la terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Existen dos enfoques más importantes para introducir el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células de un paciente; *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo* el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, generalmente en el lugar en donde se requiere el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, se retiran las células del paciente, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente ya sea directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (consultar, *por ej.* patentes de los Estados Unidos N° 4.892.538 y 5.283.187). Existe una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a una célula en cultivo *in vitro*, o en células *in vivo* del huésped deseado. Las técnicas adecuadas para transferir ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico, etc. Un vector comúnmente utilizado para la administración *ex vivo* del gen es un retrovirus.

Las técnicas actualmente preferidas para la transferencia de ácido nucleico *in vivo* incluyen la transfección con vectores virales (como por ejemplo un adenovirus, el virus de la Herpes simple 1 o un adenovirus asociado) y sistemas basados en lípidos (los lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son DOTMA, DOPE y DC-Col, por ejemplo). En algunas situaciones es deseable proporcionar la fuente del ácido nucleico con un agente que actúe sobre las células dianas, como por ejemplo un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se empleen liposomas, las proteínas que se unen a una proteína de membrana de la superficie celular asociada a endocitosis se pueden utilizar para actuar y/o facilitar la unión, *por ej.* proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas con tropismo por un tipo de célula en particular, anticuerpos para proteínas que sufren internalización en ciclos y proteínas que actúan en la localización intracelular y mejoran la semivida intracelular. La técnica de endocitosis mediada por un receptor se describe, por ejemplo, en Wu y col., *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987); y Wagner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3410-3414 (1990). Como revisión de los protocolos actualmente conocidos para la marcación de genes y la terapia génica, consultar Anderson y col., *Science* 256:808-813 (1992). Consultar también el documento WO 93/25673 y la referencia citada en el mismo.

VI. Depósito de materiales

Las siguientes líneas celulares de hibridoma se han depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

Designación del anticuerpo	ATCC N°	Fecha de depósito
7C2	ATCC HB-12215	17 de octubre de 1996
7F3	ATCC HB-12216	17 de octubre de 1996
4D5	ATCC CRL 10463	24 de mayo de 1990
2C4	ATCC HB-12697	8 de abril de 1999

En los siguientes ejemplos no limitantes se proporciona mayores detalles de la invención. Las divulgaciones de todas las citas de la memoria descriptiva están expresamente incorporadas allí por referencia.

Ejemplo 1

Perfil de expresión génica asociado con la fosforilación de HER2

Se trazó el perfil de la expresión génica de muestras tumorales ováricas recién tomadas de pacientes con cáncer de ovario tratados con pertuzumab utilizando un análisis de micromatrices AFFYMETRIX® para un subconjunto de genes seleccionados. Se realizó un análisis de micromatrices AFFYMETRIX® de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los datos de la expresión de las micromatrices se analizaron para identificar los patrones génicos que se asociarían al estado de fosforilación de HER2. Sorprendentemente, emergió un patrón en donde los tumores con altos niveles relativos de expresión de EGFR, HER2, HER3 y del ligando de HER betacelulina también fueron positivos para la fosforilación de HER2. La Fig. 10 muestra una agrupación no supervisada de los tumores con los genes antes mencionados que resulta en seis de los seis grupos de tumores positivos en fosforilación juntos. La Fig. 11 muestra que se puede predecir el estado de fosforilación en los tumores de ovario utilizando un algoritmo en donde una muestra se predice como positiva que tiene una expresión de betacelulina y HER2 dentro de la mediana o por encima de la mediana y/o una expresión de EGFR y/o HER3 en la mediana o por encima de la mediana. La correlación fue positiva en seis de los seis casos positivos de fosforilación de HER2, y ninguno de los casos negativos de fosforilación de HER2 se predijeron como negativos utilizando datos de expresión de micromatriz como base para el algoritmo.

En un segundo análisis, la predicción del estado de fosforilación de HER2 se logró utilizando un único gen solamente, llamado betacelulina. La Fig. 12 muestra que todos los seis tumores positivos en la fosforilación de HER2 tenían una expresión de betacelulina por encima de la mediana, nuevamente utilizando datos de expresión de las micromatrices.

Ejemplo 2

Comparación del análisis de la micromatriz y la RT-PCR cuantitativa para medir la expresión del gen

En este ejemplo, se utilizó un segundo procedimiento de cuantificación de la expresión génica, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-PCR cuantitativa), para validar, y comparar con, los datos de la micromatriz. RT-PCT cuantitativa sería un procedimiento preferido para medir la expresión génica en una muestra típica de un paciente disponible en un entorno clínico. Para este procedimiento ya están establecidas plataformas de tecnología diagnóstica.

La RT-PCR cuantitativa se realizó de acuerdo a como se describe en Cronin y col., *Am. J. Pathol.* 164(1):35-42 (2004); y Ma y col., *Cancer Cell* 5:607-616 (2004). El ARN se extrajo de tumores de ovario congelados utilizando reactivos comercialmente disponibles de Qiagen, Valencia, California. Se diseñaron cebadores y sondas para el análisis por RT-PCR cuantitativa TAQMAN™ para proporcionar longitudes del "amplicón" de aproximadamente 100 bases o menos. Los transcritos se cuantificaron por RT-PCR cuantitativa utilizando un instrumento TAQMAN™ (Applied BioSystems), con niveles de expresión de los genes de prueba normalizados con respecto a los genes de referencia. La Fig. 13 muestra las características básicas de los ensayos de RT-PCR

cuantitativa establecidos. El gen "de mantenimiento" GUS se seleccionó como el gen de control debido a su baja variación y su alta expresión.

Para validar primero las medidas de la micromatriz, los resultados de la RT-PCR cuantitativa se compararon con aquellos obtenidos por la micromatriz para evaluar si existía una estrecha correlación, y para determinar si también se podría predecir la fosforilación de HER2 mediante este procedimiento alternativo. Para todas las comparaciones de los genes discutidas anteriormente, se lograron buenas correlaciones.

La Fig. 14 muestra una agrupación no supervisada de los tumores con EGFR, HER2, HER3 y betacelulina. Cinco de los seis tumores positivos en fosforilación agrupados usando datos de la RT-PCR cuantitativa.

La Fig. 15 muestra que se puede predecir el estado de fosforilación de los tumores de ovario utilizando un algoritmo en donde la muestra que se predice positiva tiene una expresión de betacelulina y HER2 dentro la mediana o por encima de la mediana y/o una expresión de EGFR y/o HER3 dentro de la mediana o por encima de la mediana. La correlación fue positiva para cuatro de seis casos positivos de fosforilación de HER2. Sólo cinco de los diecinueve casos negativos de fosforilación de HER2 se predijeron como positivos utilizando los datos de expresión de la RT-PCR cuantitativa como base para el algoritmo.

En un segundo análisis, que se muestra en la Fig. 16, la predicción del estado de fosforilación de HER2 se logró utilizando un único gen solamente, llamado betacelulina. Tal y como se muestra en esta figura, cinco de los seis tumores positivos en fosforilación de HER2 tenían expresión de betacelulina por encima la mediana, nuevamente utilizando los datos de expresión de la RT-PCR cuantitativa.

Al evaluar otros ligandos de HER, a saber epirregulina, anfirregulina y alfa-TGF, la anfirregulina se identificó como un segundo ligando con una utilidad similar a la de la betacelulina para correlacionar con el estado de fosforilación de HER2. Consultar Fig. 17.

Ejemplo 3

Terapia de pacientes con un perfil de expresión génica asociado con la fosforilación de HER2

Los anteriores ejemplos 1 y 2 demuestran que los perfiles de expresión génica se pueden utilizar como una alternativa para la fosforilación de HER2. En este ejemplo, los pacientes con tumores que tienen un perfil de expresión génica específico asociado con la fosforilación de HER2 se tratan con el inhibidor de HER, pertuzumab.

La RT-PCR cuantitativa se realiza de acuerdo a como se describe en Cronin y col., *Am. J. Pathol.* 164(1):35-42 (2004); y Ma y col., *Cancer Cell* 5:607-616 (2004). El ARN se extrae de tumores de ovario congelados utilizando reactivos comercialmente disponibles de Qiagen, Valencia, California. Se diseñan cebadores y sondas para el análisis por RT-PCR cuantitativa TAQMAN™ para proporcionar longitudes del "amplicón" de aproximadamente 100 bases o menos. Los transcritos se cuantifican por RT-PCR cuantitativa utilizando un instrumento TAQMAN™ (Applied BioSystems), con niveles de expresión de los genes de prueba normalizados con respecto a los genes de referencia.

En los ejemplos 1 y 2 se ha desarrollado un algoritmo basado en los datos de creación de perfiles de expresión génica con estados de fosforilación de HER2 conocidos, mediante ELISA. Un tumor se considera positivo para un perfil de expresión génica asociado con la fosforilación de HER2 que tiene una expresión de betacelulina o anfirregulina y HER2 dentro de la mediana o por encima de la mediana y/o una expresión de EGFR y/o HER3 dentro

de la mediana o por encima de la mediana. De manera alternativa, sólo la expresión de betacelulina o anfirregulina se puede medir mediante la RT-PCR cuantitativa para identificar los tumores con fosforilación de HER2 predicha.

Los pacientes que hayan progresado mientras recibieron un régimen de quimioterapia basado en platino, o los pacientes que han progresado dentro de los 6 meses después de completar un régimen basado en platino, podrán participar en este estudio. Los pacientes se agruparán de manera aleatoria para recibir gemcitabina junto con pertuzumab, o gemcitabina junto con un placebo.

La gemcitabina se administrará a razón de 1000 mg/m² en los días 1 y 8 del ciclo de 21 días por un máximo de 8 ciclos. La gemcitabina se administrará primero por infusión durante 30 minutos. Se permitirán reducciones de dosis por cuestión de toxicidad. El placebo o el pertuzumab se administrará el día 1 del ciclo de 21 días. Los sujetos aleatorizados para recibir pertuzumab recibirán una dosis de carga inicial de 840 mg (Ciclo 1) seguida de una de 420 mg en el ciclo 2 y posteriores. Los sujetos aleatorizados para recibir el placebo recibirán el mismo volumen de placebo que para el pertuzumab para el ciclo 1, ciclo 2 y posteriores. Después de 8 ciclos de gemcitabina, se continuará con pertuzumab y placebo hasta 9 ciclos adicionales (1 año en total).

A los pacientes se les reducirá la dosis estándar de gemcitabina y tendrán dosis mantenidas como resultado de citopenias, el pertzumab también se mantendrá para cualquier dosis de gemcitabina mantenida del día 1. Las dosis siguientes serán en dosis reducidas y no se incrementarán. Si la reducción o mantenimiento de una dosis es necesaria en más de 4 ocasiones, o si las dosis se mantienen durante más de 3 semanas, entonces suspenderá el tratamiento con gemcitabina y con la aprobación del médico tratante y el monitor médico se continuará con el fármaco ciego hasta obtener la progresión de la enfermedad. Si en el día 8 se mantienen las dosis de gemcitabina, entonces la dosis del Día 8 se omitirá y el tratamiento siguiente comenzará con el próximo ciclo (Día 22 del ciclo anterior).

La gemcitabina se mantendrá y la dosis se disminuirá tal y como se recomienda en la siguiente tabla:

Recuento absoluto de granulocitos (x10 ⁶ /L)	Recuento plaquetario (x10 ⁶ /L)	% de la dosis completa
>1000	>100.000	100
500-999	50.000-99.000	75
<500	<50.000	Mantener

Las dosis siguientes para cualquier paciente que necesite una reducción de la dosis será a la dosis reducida. Si las dosis se mantienen durante más de 3 semanas como resultado de citopenias, se asumirá que los pacientes tienen una toxicidad inaceptable y se suspenderá el uso de gemcitabina. Si no existen otras toxicidades de grado III o IV adicionales, la continuación con el fármaco ciego será criterio exclusivo del médico o del monitor médico. La toxicidad hematológica de la gemcitabina se ha relacionado con la tasa de administración de la dosis. La gemcitabina se administrará durante 30 minutos sin importar la dosis total. La utilización de agentes estimulantes de colonia para las citopenias NCI-CTC de grado 2 se puede utilizar según criterio del médico tratante.

Se ofrecerá la opción de pasar a un único agente pertuzumab. Una dosis de carga de 840 mg se administrará en el siguiente ciclo y se continuará con 420 mg cada 21 días en los ciclos subsiguientes.

La respuesta se evaluará en los ciclos 3, 5, 7, 9, 13 y 17. La enfermedad mensurable se evaluará utilizando el criterio de evaluación de respuesta para tumores sólidos (RECIST), mediante una evaluación clínica y una tomografía computerizada o equivalente. La respuesta para sujetos con enfermedad evaluable se valorará de acuerdo con los cambios a la CA-125 y la evidencia clínica y radiológica de enfermedad. Las respuestas se deberán confirmar de 4 a 8 semanas después de la documentación inicial de la respuesta.

Se evaluarán las siguientes medidas de los resultados.

Variable primaria de valoración de eficacia

Supervivencia sin progresión, tal y como lo determina la evaluación del investigador utilizando RECIST o cambios CA-125.

Variables secundarias de valoración de eficacia

Respuesta objetiva (respuesta parcial (PR) o respuesta completa (CR))

Duración de la respuesta

Período de supervivencia

Ausencia de progresión a los 4 meses

Período para la mejora de los síntomas tal y como se evalúa mediante FOSI

Para evitar o tratar posibles náuseas o vómitos, el paciente se puede medicar previamente con antagonistas de la serotonina, esteroides y/o benzodiacepinas. Para evitar o tratar posibles sarpullidos, se pueden utilizar terapias de acné estándar, que incluyan antibióticos tópicos y/u orales. Otros posibles medicamentos concomitantes son cualquier medicamento recetado o preparaciones sin receta utilizados por un sujeto en el intervalo que comienza 7 días antes del día 1 y continúa hasta el último día del período de seguimiento. Los sujetos que experimentan elevaciones de la temperatura $>38,5^{\circ}\text{C}$ asociadas a la infusión u otros síntomas asociados a las infusiones se puede tratar sintomáticamente con acetaminofeno, difenhidramina o meperidina. Los factores de crecimiento hematopoyéticos no experimentales se pueden administrar en caso de citopenias NCI-CTC de grado 2.

El paciente tratado tal y como se describe anteriormente mostrará una mejora en los signos y síntomas del cáncer de ovario, carcinoma peritoneal primario o carcinoma de las trompas de Falopio, tal y como se evalúa mediante una o más de las variables primarias o secundarias de eficacia. Los pacientes con perfiles de expresión génica asociados con la fosforilación de HER2 obtendrán mayores beneficios clínicos del tratamiento con pertuzumab en comparación con los pacientes que no tienen este perfil de expresión.

Las reivindicaciones son:

1. Un procedimiento para tratar el cáncer que comprende la administración a una paciente de una cantidad eficaz para tratar el cáncer, de un inhibidor de HER, en el que una muestra tumoral de la paciente expresa dos o más receptores HER y uno o más ligandos de HER.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que los receptores HER se seleccionan de un grupo compuesto por EGFR, HER2 y HER3.
3. El procedimiento de la reivindicación 2 en el que los receptores HER son EGFR y HER2.
4. El procedimiento de la reivindicación 2 en el que los receptores HER son HER2 y HER3.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el ligando de HER se selecciona de un grupo compuesto por betacelulina, anfirregulina, epirregulina y TGF- α .
6. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que el ligando de HER es la betacelulina.
7. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que el ligando de HER es la anfirregulina.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la muestra tumoral expresa HER2 y EGFR o HER3, así como betacelulina o anfirregulina.
9. El procedimiento de la reivindicación 8 en donde la muestra tumoral expresa HER2 y EGFR, así como betacelulina.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el inhibidor de HER es un inhibidor de la dimerización de HER.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el inhibidor de HER es un anticuerpo contra HER.
12. El procedimiento de la reivindicación 11 en el que el anticuerpo contra HER es un anticuerpo contra HER2.
13. El procedimiento de la reivindicación 12 en el que el anticuerpo contra HER2 se une al Dominio II del dominio extracelular de HER2.
14. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que el anticuerpo contra HER2 es pertuzumab.
15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones de la 11 a la 14 en el que el anticuerpo contra HER es un anticuerpo desnudo.
16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones de la 11 a la 15 en el que el anticuerpo contra HER es un anticuerpo intacto.
17. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones de la 11 a la 15 en el que el anticuerpo contra HER2 es un fragmento de anticuerpo que consta de una región de unión a antígeno.
18. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la expresión se determina por la cuantificación del ARNm que codifica el receptor o ligando HER.
19. El procedimiento de la reivindicación 18 en el que el ARNm se cuantifica utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

20. El procedimiento de la reivindicación 19 en el que la PCR es una PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR cuantitativa).
21. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la muestra tumoral es una muestra de tumor fijada.
22. El procedimiento de la reivindicación 21 en el que la muestra tumoral es una muestra tumoral fijada con formol y embebida en parafina (FFPE).
23. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores de la 1 a la 20 en el que la muestra tumoral es una muestra tumoral congelada.
24. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la expresión de los receptores HER y del ligando de HER está dentro de la mediana o por encima de la mediana.
25. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el cáncer es ovárico, peritoneal o de las trompas de Falopio.
26. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 en el que el cáncer es un cáncer de mama metastásico (MBC).
27. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 en el que el cáncer es un cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC).
28. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprenda la administración de un agente quimioterapéutico al paciente.
29. El procedimiento de la reivindicación 28 en el que el agente quimioterapéutico es un agente quimioterapéutico antimetabolito.
30. El procedimiento de la reivindicación 29 en el que el agente quimioterapéutico antimetabolito es la gemcitabina.
31. Un procedimiento para tratar el cáncer que comprende la administración a una paciente de una cantidad eficaz de un inhibidor de HER para tratar el cáncer, en el que la muestra del tumor de la paciente expresa betacelulina o anfirregulina.
32. El procedimiento de la reivindicación 31 en el que el inhibidor de HER inhibe la heterodimerización de HER2 con EGFR o HER3.
33. Un procedimiento para tratar el cáncer que comprende la administración a una paciente de una cantidad eficaz de un anticuerpo contra HER2 que se une al dominio II de HER2, en el que la muestra del tumor de la paciente expresa HER2 y EGFR o HER3, así como betacelulina o anfirregulina.
34. El procedimiento de la reivindicación 33 que une la unión entre los dominios I, II y III de HER2.
35. Un procedimiento para evaluar la fosforilación o activación de HER en una muestra biológica que comprende la determinación de la expresión de dos o más receptores HER y uno o más ligandos de HER en la muestra, caso en que dicha expresión indica la fosforilación o activación de HER en la muestra.

36. El procedimiento de la reivindicación 35 en el que la muestra es una muestra tumoral fijada con formol y embebida en parafina.
37. Un procedimiento para evaluar la fosforilación o activación de HER en una muestra biológica que comprende la determinación de la expresión de betacelulina o anfirregulina en la muestra, caso en que dicha expresión indica la fosforilación o activación de HER en la muestra.
38. Un procedimiento para identificar a una paciente para una terapia con un inhibidor de la dimerización de HER que comprende la determinación de la expresión de dos o más receptores HER y uno o más ligandos de HER en una muestra de la paciente, caso en que dicha expresión indica que la paciente posiblemente responderá a la terapia con el inhibidor de la dimerización de HER.
39. El procedimiento de la reivindicación 38 en el que la paciente es una paciente con cáncer.
40. Un procedimiento para tratar el cáncer de ovario que comprende la administración a una paciente de una cantidad eficaz de un inhibidor de HER para tratar el cáncer de ovario, con lo cual la muestra del tumor de la paciente expresa betacelulina o anfirregulina.
41. El procedimiento de la reivindicación 40 en donde la muestra tumoral también expresa dos o más receptores HER.

SELECCIÓN DE PACIENTES PARA UNA TERAPIA CON UN INHIBIDOR DE HER

RESUMEN DE LA REVELACIÓN

Se describe un procedimiento de selección de pacientes para una terapia con un inhibidor de HER, como el pertuzumab, sobre la base del análisis de la expresión génica. También se describe un procedimiento para evaluar la fosforilación o activación de HER en una muestra biológica a través del análisis de la expresión génica.

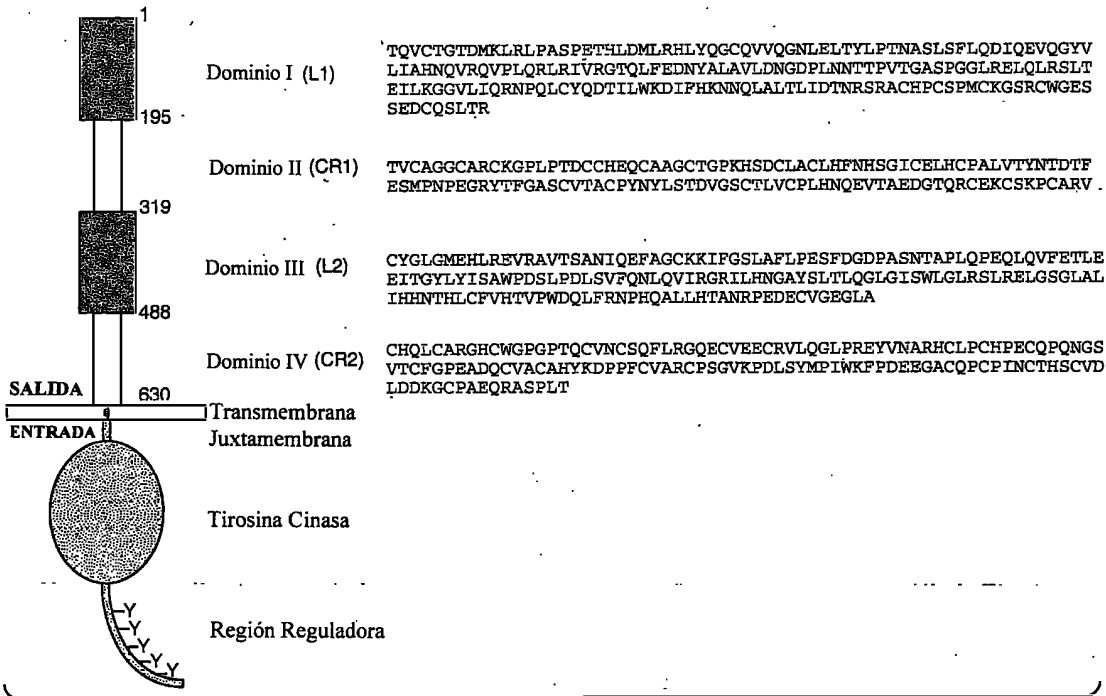


FIG. 1

10/191

Variable Ligera

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

FIG. 2A

Variable Pesada

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

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

FIG. 2B

192

Secuencia de Aminoácidos para la Cadena Ligera de Pertuzumab

1 10 20 30 40 50 60
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQOKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP
70 80 90 100 110 120
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
130 140 150 160 170 180
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
190 200 210
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 3A

Secuencia de Aminoácidos para la Cadena Pesada de Pertuzumab

1 10 20 30 40 50 60
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY
70 80 90 100 110 120
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSA
130 140 150 160 170 180
STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
190 200 210 220 230 240
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
250 260 270 280 290 300
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
310 320 330 340 350 360
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
370 380 390 400 410 420
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
430 440 448
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

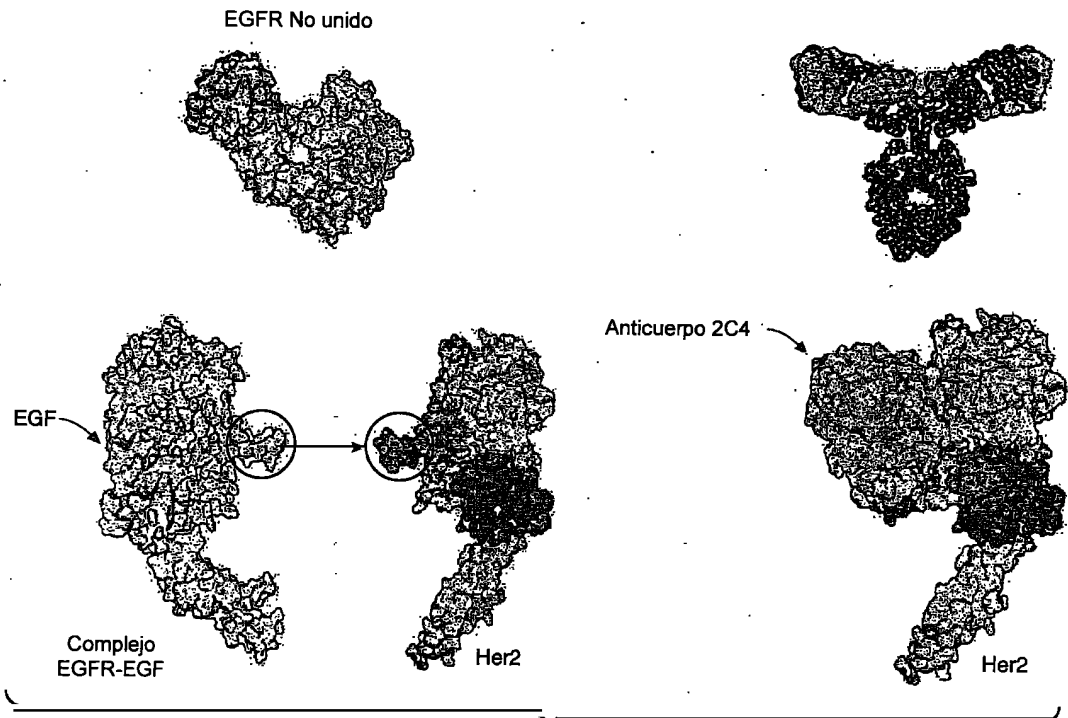
FIG. 3B

EGFR activado por ligando se heterodimeriza con HER2. 2C4 se une en el Sitio Heterodimérico de Unión

W/O 2006/063042

4 / 19

PCT/US2005/044247



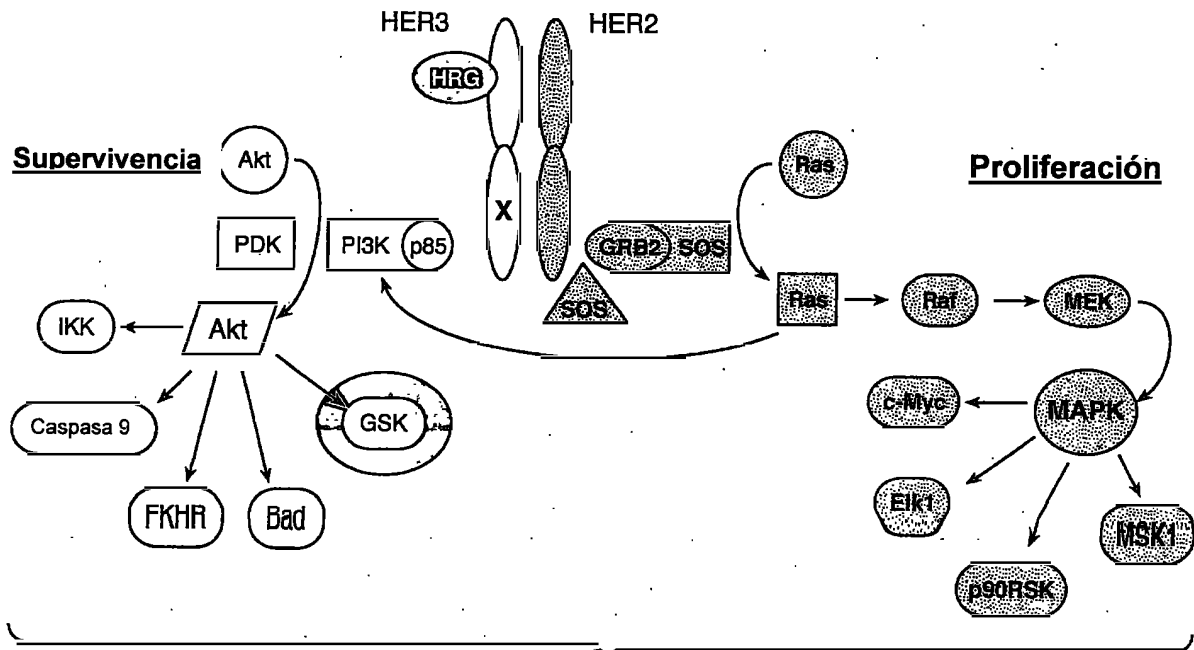
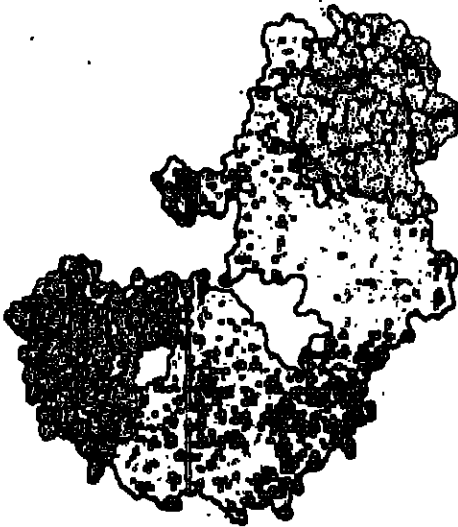


FIG. 5

Trastuzumab
Herceptina

- Se une en IV cerca de JM.
- Protege contra el desprendimiento del receptor
- Afecta moderadamente la modulación por disminución del receptor
- Ligero efecto sobre el papel de HER2 como un co-receptor

Pertuzumab
Omnitarg

- Se une en II en la interfase de dimerización.
- No impide el desprendimiento del receptor
- Afecta moderadamente la modulación por disminución del receptor
- Efecto importante sobre el papel de HER2 como un co-receptor

FIG. 6

Cadena Ligera

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

7/19

FIG. 7A

~~196~~

Cadena Pesada

1 15 30 45
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL
46 60 75 90
EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED
91 105 120 135
TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S
136 150 165 180
KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
181 195 210 225
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
226 240 255 270
THTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
271 285 300 315
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY N STYRVVSVLTVLHQD
316 330 345 360
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
361 375 390 405
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
406 420 435 449
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G

FIG. 7B

[Handwritten signature]

1 15 30 45
V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K
46 60 75 90
A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y
91 105 120 135
C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V
136 150 165 180
V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S
181 195 210 217
T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

FIG. 8A

[Handwritten signature]

1 15 30 45
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L
46 60 75 90
E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D
91 105 120 135
T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K
136 150 165 180
S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G
181 195 210 225
L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T
226 240 255 270
H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H
271 285 300 315
E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W
316 330 345 360
L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M
361 375 390 405
T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S
406 420 435 449
F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

FIG. 8B

FIG. 9A

Estructuras de Oligosacáridos Observadas Comúnmente en Anticuerpos IgG

Estructuras	Abreviatura	Masa
$\begin{matrix} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{matrix} \begin{matrix} > \\ > \end{matrix} \begin{matrix} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{matrix} \begin{matrix} > \\ > \end{matrix} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$	Man5	1235
$\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2) \begin{cases} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{cases} \begin{matrix} > \\ > \end{matrix} \begin{matrix} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{matrix} \begin{matrix} > \\ > \end{matrix} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$ $\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow6)$$$	G-1	1260
$\begin{matrix} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{matrix} \begin{matrix} > \\ > \end{matrix} \begin{matrix} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{matrix} \begin{matrix} > \\ > \end{matrix} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$	G0-F	1317
$\begin{matrix} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{matrix} \begin{matrix} > \\ > \end{matrix} \begin{matrix} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{matrix} \begin{matrix} > \\ > \end{matrix} \begin{matrix} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{matrix} \begin{matrix} > \\ > \end{matrix} \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}-$	Man6	1398

11 / 19

Estructuras de Oligosacáridos Observadas Comúnmente en Anticuerpos IgG

Estructuras	Abreviatura	Masa
$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\left\{ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Man}\alpha(1\rightarrow3) \end{array} \right\} > \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \\ \text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \end{array}$	G1-1	1423
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) > \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \\ \text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \end{array}$	G0	1463
$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) > \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \\ \text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \end{array}$	G1 (1-6)	1626
$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) > \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \\ \text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \end{array}$	G1 (1-3)	1626
$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow6) \\ \text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}\alpha(1\rightarrow3) > \text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \\ \text{Fuca}\alpha(1\rightarrow6) \\ \\ \text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}- \end{array}$	G2	1788

Las masas mostradas en esta Figura corresponden a los valores (M+Na)⁺

FIG. 9B

Handwritten signature

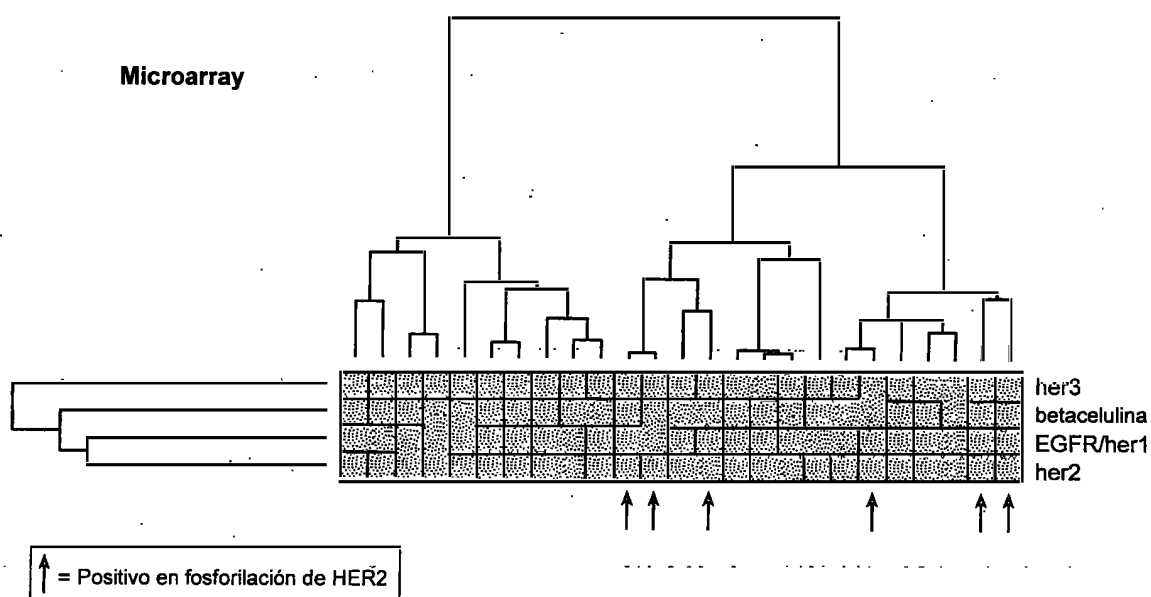


FIG. 10

202

% Células Tumorales viabiles para Elisa	Total HER2 ng/mL	Phospho HER2 U/ml	Expresión génica por Microarray					
			pher2	predicción	her2	betacelulina	EGFR/her1	her3
90	62.7	246.8	pos	pos	2509	7864.7	453.1	8605.4
50	62.1	154.6	pos	pos	3580.1	443.4	545.9	1540.5
70	83.8	74.5	pos	pos	4027.1	963.4	1707	1785
80	100.3	74.2	pos	pos	1632.533	537.033333	216.6667	2506
60	59.6	71.9	pos	pos	3115.8	645.1	529.8	2441.2
95	140.6	59.0	pos	pos	2818.8	584.9	273.3	5094.2
95	24.2	<54	neg	neg	736.1	2764.3	529	413.2
95	25.6	<54	neg	neg	1089.1	174.8	138.5	2756
80	11.2	<54	neg	neg	1198.8	155.3	1534.1	284.6
30	34.8	<54	neg	neg	1209.2	431.1	345.5	3429.2
30	22.2	<54	neg	neg	1234.9	713.3	344	3285.5
80	71.0	<54	neg	neg	1302.1	99.2	424.4	2719
80	35.7	<54	neg	neg	1309.4	241.1	331.5	5443.8
75	36.5	<54	neg	neg	1336.1	459.8	597.1	2977.3
60	23.0	<54	neg	neg	1441.1	916.4	518.5	4587.9
50	84.0	<54	neg	neg	1618.9	338.3	509.8	1848.2
70	55.9	<54	neg	neg	1647	205.6	177.9	2029
70	52.5	<54	neg	neg	1696.4	54	354.6	1432
70	32.4	<54	neg	neg	1719.4	215.7	344	3111.5
80	46.6	<54	neg	neg	1723.3	271.4	452.7	3770.3
75	46.1	<54	neg	neg	1725.2	300.3	749.8	899.7
70	23.2	<54	neg	neg	2004.7	200.7	611.6	4305.3
40	39.3	<54	neg	neg	2557.9	211.4	609.2	2516.1
60	42.3	<54	neg	neg	2766.5	193.8	256.9	964.3
30	25.8	<54	neg	neg	3321.3	456.3	356.9	2520
Muestras en o por encima de la expresión media =					1719.4	338.3	452.7	2606 median

FIG. 11

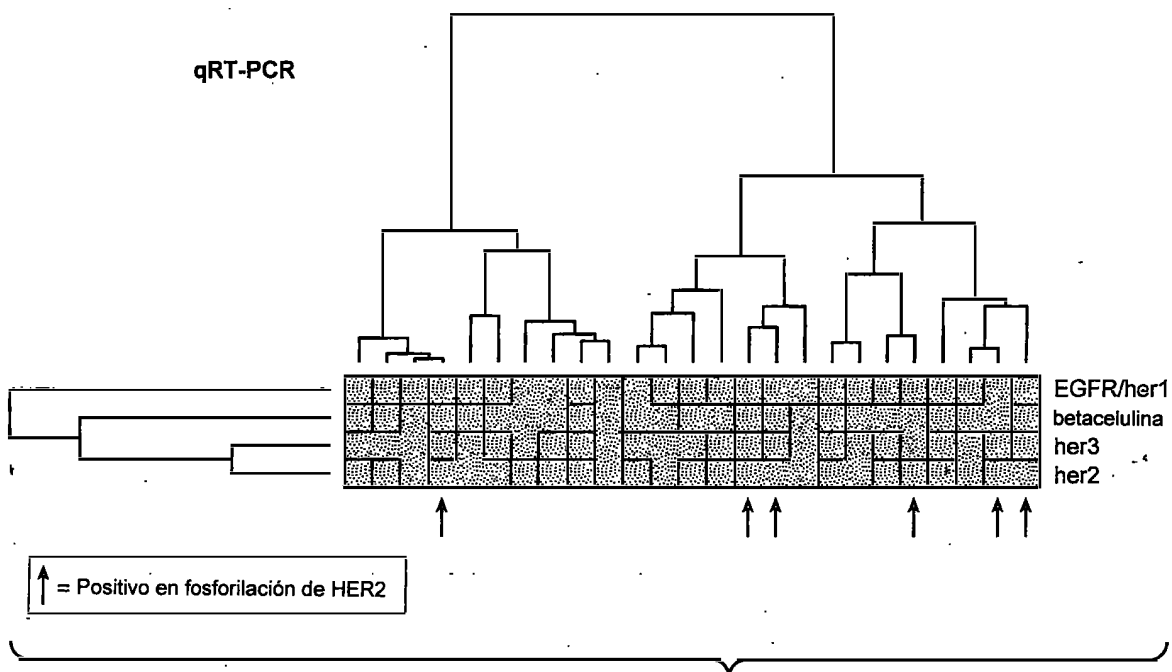
20x

% Células Tumorales viables para Elisa	Total HER2 ng/mL	Phospho HER2 U/ml	Expresión Génica por Microarray		
			pher2	betacelulina	
90	62.7	246.8	pos	1664.7	
95	24.2	<54	neg	2764.3	
70	83.8	74.5	pos	983.4	
60	23.0	<54	neg	916.4	
30	22.2	<54	neg	711.3	
60	59.6	71.9	pos	645.7	
95	140.6	59.0	pos	584.9	
80	100.3	74.2	pos	537.8833	
75	36.5	<54	neg	459.8	
30	25.8	<54	neg	456.3	
50	62.1	154.6	pos	440.4	
30	34.8	<54	neg	431.7	
50	84.0	<54	neg	333.3	
75	46.1	<54	neg	300.3	
80	46.6	<54	neg	271.4	
80	35.7	<54	neg	241.1	
70	32.4	<54	neg	215.7	
40	39.3	<54	neg	211.4	
70	55.9	<54	neg	205.6	
70	23.2	<54	neg	200.7	
60	42.3	<54	neg	193.8	
95	25.6	<54	neg	174.8	
80	11.2	<54	neg	155.3	
80	71.0	<54	neg	99.2	
70	52.5	<54	neg	54	
				338.3	media
Muestras en o por encima de la expresión media =					
Predicción incorrecta					

FIG. 12

Genes	Media +/- STD (CT)	Rango (CT)
GUS	26.76 +/- 0.70	3.92
EGFR	28.09 +/- 1.11	4.94
HER2	26.09 +/- 1.09	4.72
HER3	28.30 +/- 1.68	8.43
HER4	29.26 +/- 2.62	10.84
Betacelulina	31.92 +/- 1.72	8.42
Epirregulina	33.45 +/- 2.28	12.22
Anfirregulina	33.58 +/- 1.82	8.21
TGF-alpha	31.44 +/- 1.51	7.12

FIG. 13



% Células Tumorales viabiles para Elisa	Total HER2 ng/mL	Phospho HER2 U/ml	pher2	predicción	Expresión Génica por qRT-PCR				
					her2	anfirregulina	EGFR/her1	her3	
90	62.7	246.8	pos	neg	4.59	11.6644	3.20	44.78	
50	62.1	154.6	pos	pos	9.28	45.39798	5.97	24.12	
70	83.8	74.5	pos	pos	9.59	67.88056	4.03	27.54	
80	100.3	74.2	pos	pos	5.60	37.01868	1.60	51.02	
60	59.6	71.9	pos	neg	3.59	9.201785	5.54	21.77	
95	140.6	59	pos	pos	6.51	17.23189	1.99	88.96	
95	24.2	<54	neg	neg	1.26	61.28652	3.15	5.79	
95	25.6	<54	neg	pos	14.41	7.756674	2.49	118.55	
80	11.2	<54	neg	neg	1.49	3.237223	18.45	2.16	
30	34.8	<54	neg	pos	10.49	11.10794	5.69	110.83	
30	22.2	<54	neg	neg	2.09	5.582936	3.92	26.72	
80	71	<54	neg	neg	4.66	7.790626	6.09	47.88	
80	35.7	<54	neg	neg	3.83	15.56794	1.39	47.39	
75	36.5	<54	neg	pos	6.38	2.183314	8.05	39.54	
60	23	<54	neg	neg	3.70	10.77946	4.56	41.67	
50	84	<54	neg	neg	5.25	32.68562	5.48	15.31	
70	55.9	<54	neg	neg	5.77	13.99794	1.52	44.04	
70	52.5	<54	neg	neg	2.38	3.985562	1.01	18.23	
70	32.4	<54	neg	neg	10.03	5.808624	3.44	97.62	
80	46.6	<54	neg	neg	3.10	1.884399	3.09	35.74	
75	46.1	<54	neg	neg	3.96	14.63391	6.88	18.10	
70	23.2	<54	neg	neg	6.21	1.307397	6.97	67.03	
40	39.3	<54	neg	pos	10.78	14.82455	10.63	53.66	
60	42.3	<54	neg	neg	6.93	6.42934	1.71	17.07	
30	25.8	<54	neg	pos	12.62	42.9993	3.58	44.73	
Muestras en o por encima de la expresión media =					5.60	11.10794	3.92	41.67	media
Predicción incorrecta									

FIG. 15

% Células Tumorales viables para Eíisa	Total HER2 ng/mL	Expresión Génica por qRT-PCR			
		Phospho HER2 U/ml	pher2	betacelulina	
90	62.7	246.8	pos	239.63	
95	24.2	<54	neg	114.96	
60	23	<54	neg	41.28	
70	83.8	74.5	pos	34.07	
75	36.5	<54	neg	31.65	
30	22.2	<54	neg	27.51	
30	25.8	<54	neg	24.88	
80	100.3	74.2	pos	23.62	
30	34.8	<54	neg	23.51	
95	140.6	59	pos	19.26	
95	25.6	<54	neg	15.38	
50	62.1	154.6	pos	15.23	
40	39.3	<54	neg	12.62	
50	84	<54	neg	12.51	
70	55.9	<54	neg	11.18	
75	46.1	<54	neg	11.03	
70	32.4	<54	neg	10.48	
60	59.6	71.9	pos	8.85	
70	23.2	<54	neg	7.05	
80	46.6	<54	neg	6.71	
80	35.7	<54	neg	5.47	
60	42.3	<54	neg	4.88	
80	11.2	<54	neg	3.41	
80	71	<54	neg	2.32	
70	52.5	<54	neg	1.02	
				12.62	media
Muestras en o por encima de la expresión media =					
Predicción incorrecta					

FIG. 16

208

Handwritten signature

% Células Tumorales viabiles para Elisa	Expresión Génica por qRT-PCR				anfirregulina
	Total HER2 ng/mL	Phospho HER2 U/ml	pher2		
70	83.8	74.5	pos	67.8805624	
95	24.2	<54	neg	61.2865153	
50	62.1	154.6	pos	46.3679783	
30	25.8	<54	neg	42.9082085	
80	100.3	74.2	pos	37.0186826	
50	84	<54	neg	32.6855186	
95	140.6	59	pos	27.2318938	
80	35.7	<54	neg	15.6679394	
40	39.3	<54	neg	14.6245265	
75	46.1	<54	neg	14.6039112	
70	55.9	<54	neg	13.9078409	
90	62.7	246.8	pos	13.6644672	
30	34.8	<54	neg	13.1079374	
60	23	<54	neg	10.7794592	
60	59.6	71.9	pos	9.20178485	
80	71	<54	neg	7.7906265	
95	25.6	<54	neg	7.75667358	
60	42.3	<54	neg	6.42934028	
70	32.4	<54	neg	5.80862367	
30	22.2	<54	neg	5.58293613	
70	52.5	<54	neg	3.98556197	
80	11.2	<54	neg	3.23722253	
75	36.5	<54	neg	2.18331441	
80	46.6	<54	neg	1.88439857	
70	23.2	<54	neg	1.30739693	
				11.1079374	media
Muestras en o por encima de la expresión media =					
Predicción incorrecta =					

FIG. 17

Listado de Secuencias

<110> GENENTECH, INC.
Amler, Lukas C.
Januario, Thomas E.

<120> SELECCIÓN DE PACIENTES PARA UNA TERAPIA CON UN INHIBIDOR DE HER

<130> P2148R1

<141> 2005-12-06

<150> US 60/633,941

<151> 2004-12-07

<160> 22

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Asp	Thr	Val	Met	Thr	Gln	Ser	His	Lys	Ile	Met	Ser	Thr	Ser	Val
1				5					10					15

Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
				20					25					30

Ile	Gly	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys
				35					40					45

Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp
				50					55					60

Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile
				65					70					75

Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90

Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
				95					100					105

Ile Lys

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
1				5					10					15

Thr	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr
				20					25					30

Asp	Tyr	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu
				35					40					45

Glu	Trp	Ile	Gly	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

210

	50		55		60									
Asn	Gln	Arg	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Ser	Leu	Thr	Val	Asp	Arg	Ser
				65					70					75
Ser	Arg	Ile	Val	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Phe	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr
				95					100					105
Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	
				110					115					

<210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Se sintetiza la secuencia

<400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys

<210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Se sintetiza la secuencia

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

212

211

	35		40		45
Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr					
	50		55		60
Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser					
	65		70		75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp					
	80		85		90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr					
	95		100		105
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
	110		115		

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 5

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser					
	20		25		30

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

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser					
	50		55		60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile					
	65		70		75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln					
	80		85		90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu					
	95		100		105

Ile Lys

212

<210> 6
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Se sintetiza la secuencia

<400> 6
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly 15
 1 5 10
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser 30
 20 25
 Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 45
 35 40
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr 60
 50 55
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser 75
 65 70
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp 90
 80 85
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu 105
 95 100
 Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115
 110 115

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Se sintetiza la secuencia

<220>
 <221> Xaa
 <222> 10
 <223> Xaa es preferiblemente D o S

<400> 7
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa 10
 1 5

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Se sintetiza la secuencia

<400> 8
 Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe 15
 1 5 10
 Lys Gly

214
213

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 9
Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 10
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<220>
<221> Xaa
<222> 5
<223> Xaa es preferiblemente R o L

<220>
<221> Xaa
<222> 6
<223> Xaa es preferiblemente Y o E

<220>
<221> Xaa
<222> 7
<223> Xaa es preferiblemente T o S

<400> 11
Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 12
Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
1 5

211 214

<210> 13
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Se sintetiza la secuencia

<400> 13
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 185 190 195
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 200 205 210
 Arg Gly Glu Cys

<210> 14
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Se sintetiza la secuencia

<400> 14

215

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
 20 25 30
 Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr
 95 100 105
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 125 130 135
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 140 145 150
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 155 160 165
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 170 175 180
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 185 190 195
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 200 205 210
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 215 220 225
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315

216

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 320 325 330
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 335 340 345
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 350 355 360
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 365 370 375
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 380 385 390
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 395 400 405
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 410 415 420
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 425 430 435
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 15

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30

Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135

217

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140 145 150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155 160 165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210
Arg Gly Glu Cys

<210> 16
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
20 25 30
Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
50 55 60
Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
95 100 105
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
110 115 120
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
125 130 135
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
140 145 150
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
155 160 165
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
170 175 180

219
218

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 185 190 195
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 200 205 210
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 215 220 225
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 320 325 330
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 335 340 345
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 350 355 360
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 365 370 375
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 380 385 390
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 395 400 405
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 410 415 420
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 425 430 435
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 440 445

<210> 17

<211> 217

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 17

219

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

<210> 18

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Se sintetiza la secuencia

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
20 25 30

Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

22/220

Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
 95 100 105
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 110 115 120
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 125 130 135
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 140 145 150
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 155 160 165
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 170 175 180
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 185 190 195
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 200 205 210
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 215 220 225
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 320 325 330
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 335 340 345
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 350 355 360

2222

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 365 370 375
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 380 385 390
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 395 400 405
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 410 415 420
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 425 430 435
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 440 445

<210> 19
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly
 20 25 30
 Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr
 35 40 45
 Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly
 50 55 60
 Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln
 65 70 75
 Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 80 85 90
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr
 95 100 105
 Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu
 110 115 120
 Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg
 125 130 135
 Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile
 140 145 150
 Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn
 155 160 165
 Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser
 170 175 180
 Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg
 185 190 195

227 222

<210> 20
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro
 1 5 10 15
 Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro
 20 25 30
 Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly
 35 40 45
 Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp
 50 55 60
 Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly
 65 70 75
 Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp
 80 85 90
 Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val
 95 100 105
 Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro
 110 115 120
 Cys Ala Arg Val

<210> 21
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val
 1 5 10 15
 Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe
 20 25 30
 Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala
 35 40 45
 Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu
 50 55 60
 Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 65 70 75
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile
 80 85 90
 Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln
 95 100 105
 Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu
 110 115 120

22/223

Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe
125 130 135

Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln
140 145 150

Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly
155 160 165

Glu Gly Leu Ala

<210> 22

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro
1 5 10 15

Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys
20 25 30

Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val
35 40 45

Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln
50 55 60

Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val
65 70 75

Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys
80 85 90

Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys
95 100 105

Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys
110 115 120

Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu
125 130 135

Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr
140

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT 22/ 224

To:

GENENTECH, INC.
Attn. Lee, Wendy M.
1 DNA Way MS49
South San Francisco, CA 94080
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

RECEIVED

SEP 14 2006

GENENTECH, INC.
LEGAL DEPT.NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year)

12/09/2006

Applicant's or agent's file reference

P2148R1

Calendared/LRS

FOR FURTHER ACTION

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2005/044247

International filing date
(day/month/year)

06/12/2005

Applicant

GENENTECH, INC.

12 Due Date
Nov 06Chap II Demand Deadline
Respond to Written Opinion
12 Dec 06

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 48):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of receipt of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.92.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

Calendared/LRS
1DSDue (PCT Search)
14 OCT 06 (30 days)

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the Declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority

European Patent Office, P.B. 5818 Patenlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Henriëtte Huysing-Solles

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 298).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P2148R1	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2005/044247	International filing date (day/month/year) 06/12/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 07/12/2004
Applicant GENENTECH, INC.		

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 9 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:

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. _____
☐ 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. 227

PCT/US2005/044247

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet) 227

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:

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68

228

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)

C12Q G01N A61K C07K

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, BIOSIS, PAJ, WPI Data, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/106161 A1 (BOSSENMAIER BIRGIT ET AL) 3 June 2004 (2004-06-03) the whole document	1-23, 25-30
X	WO 01/00245 A (GENENTECH, INC) 4 January 2001 (2001-01-04) the whole document	1-23, 25-30
X	TORRING N ET AL: "Possible autocrine loop of the epidermal growth factor system in patients with benign prostatic hyperplasia treated with finasteride: A placebo-controlled randomized study" BJU INTERNATIONAL, vol. 89, no. 6, April 2002 (2002-04), pages 583-590, XP002378992 ISSN: 1464-4096 the whole document	1-3, 5-9, 21-23
-/-		

☒ 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.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 August 2006

Date of mailing of the international search report

12/09/2006

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

Betz, J

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

229

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEYLAND-JONES B: "DOSE SCHEDULING - HERCEPTIN(R)" ONCOLOGY, S. KARGER AG, BASEL, CH, vol. 61, no. SUPPL 2, October 2001 (2001-10), pages 31-36, XP009063513 ISSN: 0030-2414 the whole document	1-30
Y	WITTON CAROLINE J ET AL: "Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer." JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 200, no. 3, July 2003 (2003-07), pages 290-297, XP002378993 ISSN: 0022-3417 the whole document	1-30
Y	WITTON C J ET AL: "Coexpression of EGFr, HER2, HER3 and HER4 in primary human breast carcinoma" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 37, September 2001 (2001-09), pages 21-22, XP004359109 ISSN: 0959-8049 the whole document	1-30
Y	NAHTA RITA ET AL: "The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells" CANCER RESEARCH, vol. 64, no. 7, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 2343-2346, XP002378994 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-30
Y	BADACHE ALI ET AL: "A new therapeutic antibody masks ErbB2 to its partners" CANCER CELL, vol. 5, no. 4, April 2004 (2004-04), pages 299-301, XP002378995 ISSN: 1535-6108 the whole document	1-30
Y	WO 01/00238 A (GENENTECH, INC; SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 4 January 2001 (2001-01-04) the whole document	1-30
	----- -/-	

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No. 230
X	FREIMANN S ET AL: "Drug development for ovarian hyper-stimulation and anti-cancer treatment: blocking of gonadotropin signaling for epiregulin and amphiregulin biosynthesis" BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 68, no. 6, 15 September 2004 (2004-09-15), pages 989-996, XP002396186 ISSN: 0006-2952 the whole document	31,32, 40,41
X	SEWELL J M ET AL: "Targeting the EGF receptor in ovarian cancer with the tyrosine kinase inhibitor ZD 1839 ("Iressa")." BRITISH JOURNAL OF CANCER. 1 FEB 2002, vol. 86, no. 3, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 456-462, XP002396187 ISSN: 0007-0920 the whole document	31,40,41
X	D'ANTONIO ANTONIO ET AL: "Transforming growth factor alpha, amphiregulin and cripto-1 are frequently expressed in advanced human ovarian carcinomas" INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 21, no. 5, November 2002 (2002-11), pages 941-948, XP008068106 ISSN: 1019-6439 the whole document	31-33, 40,41
X	AGUS D B ET AL: "Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth" SIGNALING NETWORKS AND CELL CYCLE CONTROL: THE MOLECULAR BASIS OF CANCER AND OTHER DISEASES, XX, XX, vol. 2, August 2002 (2002-08), pages 127-137, XP002988666 the whole document	33,34, 38,39
X	VALLE J W ET AL: "287 A phase Ib study of pertuzumab (P), a recombinant humanized antibody to HER2, and capecitabine (C) in patients with advanced solid tumors" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER. SUPPLEMENT, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 2, no. 8, September 2004 (2004-09), page 88, XP004639731 ISSN: 1359-6349 the whole document	33,34, 38,39
	-/--	

232

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No. 231
A	FRANKLIN M C ET AL: "Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex" CANCER CELL, XX, US, vol. 5, no. 4, April 2004 (2004-04), pages 317-328, XP002372929 ISSN: 1535-6108 the whole document	33,34
A	ROSKOSKI R: "The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 319, no. 1, 18 June 2004 (2004-06-18), pages 1-11, XP004509841 ISSN: 0006-291X the whole document	33,34
X	FLEISIG H ET AL: "Regulation of ErbB4 phosphorylation and cleavage by a novel histidine acid phosphatase" NEUROSCIENCE, vol. 127, no. 1, 2004, pages 91-100, XP002396188 ISSN: 0306-4522 the whole document	35,37
X	SAITO TSUGUMICHI ET AL: "Differential activation of epidermal growth factor (EGF) receptor downstream signaling pathways by betacellulin and EGF" ENDOCRINOLOGY, vol. 145, no. 9, September 2004 (2004-09), pages 4232-4243, XP002396189 ISSN: 0013-7227 the whole document	35,37
X	BURGESS ANTONY W ET AL: "An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors." MOLECULAR CELL. SEP 2003, vol. 12, no. 3, September 2003 (2003-09), pages 541-552, XP002396190 ISSN: 1097-2765 the whole document	33-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/044247

232

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, 31, 33 and 40 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 compound/ 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 dependent 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:

see additional sheet

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.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

233

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-30 (completely)

Invention Number 1:

A method for treating cancer comprising administering to a patient a HER inhibitor in an amount effective to treat the cancer, wherein a tumour sample from the patient expresses two or more HER receptors and one or more HER ligands.

2. claims: 31, 32, 40, 41 (completely)

Invention Number 2:

A method for treating cancer, particularly ovarian cancer, comprising administering to a patient a HER inhibitor in an amount effective to treat the cancer, wherein a tumour sample from the patient expresses betacellulin or amphiregulin.

3. claims: 33, 34 (completely)

Invention Number 3:

A method for treating cancer, comprising administering to a patient a HER2 antibody that binds to DOMAIN II of HER2 in an amount effective to treat the cancer, wherein a tumor sample from the patient expresses HER2 and EGFR or HER3, as well as betacellulin or amphiregulin.

4. claims: 35, 36, 37 (completely)

Invention Number 4:

A method of assessing HER phosphorylation or activation in a biological sample, comprising determining expression of two or more HER receptors and one or more HER ligands in the sample, wherein expression of the two or more HER receptors and one or more HER ligands indicates HER phosphorylation or activation in the sample, or, wherein expression of betacellulin or amphiregulin indicates HER phosphorylation or activation in the sample.

5. claims: 38, 39 (completely)

Invention Number 5:

A method of identifying a patient for therapy with a HER dimerization inhibitor comprising determining expression of two or more HER receptors and one or more HER ligands in a sample from the patient, wherein expression of the HER receptors and HER ligand indicates that the patient is likely to respond to therapy with the HER dimerization inhibitor.

231

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

234

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004106161	A1	03-06-2004	NONE
WO 0100245	A	04-01-2001	AT 500848 A1 15-04-2006
		AU 784045 B2 19-01-2006	
		AU 5763200 A 31-01-2001	
		BR 0012198 A 02-04-2002	
		CA 2376596 A1 04-01-2001	
		CH 694589 A5 15-04-2005	
		CN 1370082 A 18-09-2002	
		CZ 20014596 A3 12-02-2003	
		DE 10084743 T0 14-08-2002	
		EP 1189641 A2 27-03-2002	
		GB 2368796 A 15-05-2002	
		HU 0201695 A2 28-09-2002	
		JP 2003503366 T 28-01-2003	
		MX PA01013458 A 30-07-2002	
		NO 20016329 A 25-02-2002	
		NZ 516830 A 30-07-2004	
		NZ 531426 A 28-10-2005	
		PL 352321 A1 11-08-2003	
		TR 200103756 T2 21-06-2002	
		ZA 200109786 A 28-11-2002	
		ZA 200110263 A 13-12-2002	
WO 0100238	A	04-01-2001	AU 779209 B2 13-01-2005
		AU 5499200 A 31-01-2001	
		BR 0012195 A 23-07-2002	
		CA 2383493 A1 04-01-2001	
		CN 1379684 A 13-11-2002	
		EP 1189634 A1 27-03-2002	
		JP 2003503361 T 28-01-2003	
		MX PA01013395 A 04-09-2003	
		US 2006083739 A1 20-04-2006	
		ZA 200110088 A 26-08-2002	

PATENT COOPERATION TREATY

257 236

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

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/US2005/044247	International filing date (day/month/year) 06.12.2005	Priority date (day/month/year) 07.12.2004
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC INV. C12Q1/68		
Applicant GENENTECH, INC.		

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 66.1bis(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 - P.B. 5818 Patentlaag 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Date of completion of this opinion See form PCT/ISA/210	Authorized Officer Botz, J Telephone No. +31 70 340-4513 
--	--	---

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/044247

237

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**

274
International application No.
PCT/US2005/044247

238

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. 1,31,33,40 (industrial applicability)

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):
- ☐ 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. 1,31,33,40 (incompletely / industrial applicability)
- ☐ 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/US2005/044247

239

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☒ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos.

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	15-17,36,38,39
	No: Claims	1-14,18-35,37,40
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	2-30,32,34-39,41
	No: Claims	1,31,33,40 (method of treatment)

2. Citations and explanations

see separate sheet

IV. Lack of unity (Continuation)

- 2.1 The claims of the underlying application are not so linked as to form a single general inventive concept (**Rule 13.1 PCT**). The underlying common element is part of the state of the art and therefore the requisite of unity of invention (**Rule 13.1 PCT**) no longer exists.
- 2.2 The International Preliminary Examination Authority (IPEA) has found **5 different inventions** in the underlying application. For the formulation of the different inventions please refer to the International Search Report.
- 2.3 The underlying application comprises methods of treating cancer and of assessing phosphorylation in said cancers, whereby the **common concept** of the underlying methods is ***the treatment of cancers / tumours / detection of phosphorylation states of said cancers, which express more than 1 HER receptor and one or more HER ligand(s)***. The treatment of cancers expressing more than one HER receptor and one or more HER ligands is known from the prior art.
- 2.4 **This common concept though is known from the prior art:**
In D1 a method is provided for identifying a tumor as responsive to treatment with an anti-HER2 antibody comprising the detection of the presence of a HER2/HER3 and/or HER2/HER1 protein receptor complex in a sample of said tumor, and, additionally, identifying a tumor as responsive to treatment with anti-HER2 antibody when a complex is detected. The antibody thereby is an anti-HER2 antibody that blocks ligand activation of an ErbB heterodimer comprising HER2. The ErbB ligand is being recruited from the group consisting of EGF, TGF-[alpha], amphiregulin, betacellulin, HB-EGF and epiregulin. ErbB4 include betacellulin, epiregulin, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 and heregulins. In e.g. Example 7, a clinical study is launched to identify cancer patients for treatment with rhuMAb 2C4 whereby a biological sample comprising cancer cells is obtained from candidates for the treatment, e.g., by biopsy of tumor tissue. The biological sample is analyzed for HER2 phosphorylation, e.g., by immunoprecipitation and Western blot analysis, and/or for the presence of HER2/HER3, HER2/HER1 and/or HER2/HER4 heterodimers by any of the techniques described in D1. Subjects whose biological sample is positive for HER2 phosphorylation and/or the presence of

HER2/HER3, HER2/HER1 and/or HER2/HER4 heterodimers, are likely to show a better response to treatment with rhuMAb 2C4 than patients whose tumor sample showed no HER2 phosphorylation or where no heterodimer was detected. For example, subjects diagnosed with ovarian cancer will undergo a biopsy of tumor tissue or aspiration of tumor cells from ascites fluid. This tissue will be analyzed for HER2 phosphorylation by immunoprecipitation and Western blot analysis, care also for the claims. Another prior art, D2, provides with Examples 10 - 13 and the claims, therapies for various kinds of cancers, comprising the use of the RhuMAB2C4 antibody, directed against the Erb-B2 receptor (=HER2) (thereby blocking HER2-ligand binding) and of an additional EGFR-targeted drug (=specific for HER-1). The use of said drug combination implying the expression of Erb-B2 (=HER2) as well as Erb-B1 (=HER1) and an Erb-B2 dependent ligand.

- 2.5 Since the common concept of the underlying application is known from the prior art, the different methods of treating HER-dependent cancers as well as the methods for assessing HER-dependent phosphorylation must be considered as separate inventions. The solutions provided by the applicant therefore constitute alternative solutions to a problem already solved in the art, namely the problem of therapy of cancers expressing 2 or more HER-receptors and at least 1 or more HER-ligands. Because no other technical features can be distinguished which, in view of the prior art could be regarded as special technical features in the sense of Rule 13.2 PCT, the ISA is of the opinion that there is no single inventive concept underlying the plurality of the claimed inventions of the present application in the sense of Rule 13.1 PCT. Consequently there is a lack of unity, and the methods claimed are different inventions not belonging to a common and inventive concept. The ISA has identified 5 inventions.
- 2.7 Restriction of the claims to one of the aforementioned groups of inventions has not taken place but instead the applicant chose to pay all additional search-fees. **Therefore a written opinion will be issued providing an view of the subject-matter relating to Invention 1 - 5.**

V. Reasoned statement (Continuation)

1. CITATIONS

- D1:** US 2004/106161 A1 (BOSSENMAIER BIRGIT ET AL) 3 June 2004 (2004-06-03)
- D2:** WO 01/00245 A (GENENTECH, INC) 4 January 2001 (2001-01-04)
- D3:** FREIMANN S ET AL: "Drug development for ovarian hyper-stimulation and anti-cancer treatment: blocking of gonadotropin signaling for epiregulin and amphiregulin biosynthesis" BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 68, no. 6, 15 September 2004 (2004-09-15), pages 989-996, XP002396186 ISSN: 0006-2952
- D4:** SEWELL J M ET AL: "Targeting the EGF receptor in ovarian cancer with the tyrosine kinase inhibitor ZD 1839 ("Iressa")." BRITISH JOURNAL OF CANCER. 1 FEB 2002, vol. 86, no. 3, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 456-462, XP002396187 ISSN: 0007-0920
- D5:** D'ANTONIO ANTONIO ET AL: "Transforming growth factor alpha, amphiregulin and cripto-1 are frequently expressed in advanced human ovarian carcinomas" INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 21, no. 5, November 2002 (2002-11), pages 941-948, XP008068106 ISSN: 1019-6439
- D6:** WITTON CAROLINE J ET AL: "Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer." JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 200, no. 3, July 2003 (2003-07), pages 290-297, XP002378993 ISSN: 0022-3417
- D7:** WITTON C J ET AL: "Coexpression of EGFr, HER2, HER3 and HER4 in primary human breast carcinoma" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 37, September 2001 (2001-09), pages 21-22, XP004359109 ISSN: 0959-8049
- D8:** BURGESS ANTONY W ET AL: "An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors." MOLECULAR CELL. SEP 2003, vol. 12, no. 3, September 2003 (2003-09), pages 541-552, XP002396190 ISSN: 1097-2765
- D9:** AGUS D B ET AL: "Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth" SIGNALING NETWORKS AND CELL CYCLE CONTROL:

THE MOLECULAR BASIS OF CANCER AND OTHER DISEASES, XX, XX, vol. 2,
August 2002 (2002-08), pages 127-137, XP002988666

D10: FLEISIG H ET AL: "Regulation of ErbB4 phosphorylation and cleavage
by a novel histidine acid phosphatase" NEUROSCIENCE, vol. 127, no.
1, 2004, pages 91-100, XP002396188 ISSN: 0306-4522

With respect to the Invention Number 1 the ISA holds the following opinion:

2. **NOVELTY** (Art. 33(2) PCT)

1. **D1 and D2** have been extensively discussed further above. They disclose the subject-matter of **claims 1 - 14 and 18 - 30** of the underlying invention. Therefore, the present application does not satisfy the criterion set forth in **Article 33(2) PCT** because the subject-matter of said claims is not new in respect of prior art as defined in the regulations (**Rule 64(1)-(3) PCT**).

3. **INVENTIVE STEP** (Art. 33(3) PCT)

1. Dependent **claims 15 - 17** do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, involve an inventive step.
2. The present application does therefore not satisfy the criterion set forth in **Article 33(3) PCT** and the subject-matter of **claims 1 - 30** does not involve an inventive step (**Rule 65(1)(2) PCT**).

With respect to the Invention Number 2 the ISA holds the following opinion:

4. **NOVELTY** (Art. 33(2) PCT)

1. **D3** reveals that by blocking / attenuating the expression of epiregulin and amphiregulin by means of anti-sense or siRNA techniques, one suppresses the expression of said latter two genes, thereby at the same time inactivating the HER-Receptor and consequently contributing to the downregulation of ovarian stimulation. This again reduces the chance for cancer of the ovary. Also mentioned is the arrest of the receptor (HER-receptor) expression; **D3** anticipates the intellectual concept of the second invention and thereby destroys its novelty. Therefore, the present application does not satisfy the criterion set forth in **Article 33(2) PCT** because the subject-matter of **claims 31, 32 and 40** is not new in respect of prior art as defined in the regulations (Rule 64(1)-(3) PCT).
2. **D4** reveals the finding, that in ovarian cancer, said cancer expressing amphiregulin, the tyrosine-kinase inhibitor ZD 1839 specifically targets the EGF receptor (HER-1), thereby inhibiting growth of ovarian cancer cell lines in vitro. The authors imply / speculate on a therapeutic effect for patients. **D4** anticipates the novelty of **claims 31 and 40** and therefore the present application does not satisfy the criterion set forth in **Article 33(2) PCT** because the subject-matter of **claims 31 and 40** is not new in respect of prior art as defined in the regulations (**Rule 64(1)-(3) PCT**).

5. **INVENTIVE STEP** (Art. 33(3) PCT)

1. In case the novelty objections were somehow overcome, the ISA holds the opinion, that (1.) betacellulin and / or amphiregulin are known ligands of the HER-receptor family, and as outlined in **D3** and **D4** are found to be expressed together with various representatives of the HER-receptor family in a great variety of cancers, particularly ovarian cancer. (2.) It is known by the skilled in the art that a number of cancer tissues express not only one species of HER-receptor but a whole variety of different species: this is known not only

for ovarian cancer, where the receptors expressed simultaneously are for example the EGF-receptor (HER-1) as well as ERBB4-receptor (HER-4), c.f. Figure 2 of D3. Further examples of co-expression of more than one species of HER-receptor is breast cancer tissue, where prior arts D6 and D7 provide evidence for co-expression in 38.6% of the cases; here one or more of HER-1, -2 or -3 receptors were overexpressed. (3.) As outlined further above, c.f. example for the characterization of D1, the antibody used in the underlying application 2C4 has been shown to disrupt dimerization of HER2 with other ErbB receptor family members; the monoclonal antibody designated 2C4 is the agent known as pertuzumab.

2. In summary, the subject-matter of **invention 2** (claims 31, 32, 40 and 41), describing a method for treating cancer, particularly ovarian cancer, comprising administering to a patient a HER-inhibitor in an amount effective to treat the cancer, wherein a tumour sample from said patient expresses betacellulin or amphiregulin, is not surprising but known to the skilled in the art. Therefore, the criterion set forth in **Article 33(3) PCT** is not satisfied, and the subject-matter of **claims 31, 32, 40 and 41** does not involve an inventive step (**Rule 65(1)(2) PCT**).

6. **Article 5 PCT**

1. The ISA was unable to find disclosure for **claims 31, 32, 40 and 41** within the description, particularly disclosure for the treatment of cancer with reflecting an expression profile as detailed in **claims 31, 32, 40 and 41, Article 5 PCT**.

With respect to the **invention Number 3** the ISA holds the following opinion:

7. **NOVELTY** (Art. 33(2) PCT)

1. With respect to **claims 33 and 34** the skilled in the art is aware of the fact that

dimerization of HER-receptor species only takes place in the presence of the ligands binding to them. This is nicely documented in the review of prior art **D8**. Therefore, even in the absence of a particular mentioning of ligand-expression, the mere fact that the receptors are dimerized and therefore activated requires the presence / expression of EGFR-family ligands. Document **D2** (c.f. summary of the invention) now introduces the antibody 2C4, said antibody interfering with hetero-dimerization of EGF-receptor species, namely with the dimerization of EGFR/ErbB2 (=HER2) or ErbB2/ErbB3 (=HER2/HER3) by recognizing and binding to ErbB2 (=HER2). **D2** further provides a method of treating cancer in a human, wherein the cancer expresses epidermal growth factor receptor (EGFR), comprising administering to the human a therapeutically effective amount of an antibody which binds ErbB2. **D2** is novelty-destroying to **claims 33 and 34** and therefore, the present application does not satisfy the criterion set forth in **Article 33(2) PCT** because the subject-matter of **claims 33 and 34** is not new in respect of prior art as defined in the regulations (**Rule 64(1)-(3) PCT**).

2. **D9** provides an antibody against epitope 2C4, said epitope comprising residues from domain II in the extracellular domain of HER2. 2C4 and Pertuzumab bind to the extracellular domain of HER2 at the junction of domains I, II and III. Authors demonstrate the in-vivo and in-vitro growth inhibition of several breast and prostate tumours. In the results section it is described that said antibody blocks the dimerization of ErbB2 (HER-2) and ErbB3 (HER-3). **D9** is novelty-destroying to **claims 33 and 34** and therefore, the present application does not satisfy the criterion set forth in **Article 33(2) PCT** because the subject-matter of **claims 33 and 34** is not new in respect of prior art as defined in the regulations (**Rule 64(1)-(3) PCT**).

8. INVENTIVE STEP (Art. 33(3) PCT)

1. Consequently, the criterion set forth in **Article 33(3) PCT** is not satisfied, and the subject-matter of **claims 33 and 34** does not involve an inventive step

(Rule 65(1)(2) PCT).

9. **Article 5 PCT**

1. The ISA was unable to find disclosure for **claims 33 and 34** within the description, particularly disclosure for the treatment of cancer reflecting an expression profile as detailed in **claims 33 and 34, Article 5 PCT**.

With respect to the **Invention Number 4** the ISA holds the following opinion:

10. **NOVELTY** (Art. 33(2) PCT)

1. Considering the pathways of activated EGF-receptors such as HER-1 to HER-4, it becomes evident that the general mode of action is (1.) the binding of the ligand to the receptor followed by (2.) the subsequent receptor-dimerization and (3.) the accompanying activation of the tyrosine kinase activity, resulting ultimately in the tyrosine autophosphorylation of said particular receptor. Therefore it is obvious that provided a plurality of HER-receptors as well as one or more HER ligands are expressed, the skilled in the art would expect a HER-receptor phosphorylation to occur. The subject-matter of **claims 35 and 37** is provided within the review of **D8**, c.f. paragraph on "ErbB Receptors are activated by Ligand-Induced Dimerization", and therefore, the present application does not satisfy the criterion set forth in **Article 33(2) PCT** because the subject-matter of **claims 35 and 37** is not new in respect of prior art as defined in the regulations (**Rule 64(1)-(3) PCT**).
2. Also anticipating the novelty of **claims 35 and 37** is the subject-matter of **D10**. The present application does not satisfy the criterion set forth in **Article 33(2) PCT** because the subject-matter of **claims 35 and 37** is not new in respect of prior art as defined in the regulations (**Rule 64(1)-(3) PCT**).

11. **INVENTIVE STEP** (Art. 33(3) PCT)

1. Consequently, the criterion set forth in **Article 33(3) PCT** is not satisfied, and the subject-matter of **claims 35 and 37** does not involve an inventive step (**Rule 65(1)(2) PCT**). The content of claim 36 seems not to contribute to the criterion as set forth in **Article 33(3) PCT**, and therefore the whole of **claims 35 - 37** is not considered inventive, **Article 33(3) PCT**.

With respect to the **Invention Number 5** the **ISA** holds the following opinion:

12. **NOVELTY** (Art. 33(2) PCT)

1. The subject-matter of **claims 38 and 39** seems to be novel in the sense of **Article 33(2) EPC**.

13. **INVENTIVE STEP** (Art. 33(3) PCT)

1. Due to what has been stated further above with respect to the pathway / mechanism of HER-receptor activation in cancer, it is obvious for the skilled in the art to expect a cancer patient, expressing two or more HER-receptors and one or more HER-ligands in a patient's sample, to be treatable with e.g. antibodies functioning as dimerization inhibitors, thereby assuming that the blockade of dimerization is comparable to an inactivated HER-receptor, going along with an aborted autophos-phorylation reaction of said receptor together with a subsequent interruption of the signal cascade. With respect to **claims 38 and 39** the criterion set forth in **Article 33(3) PCT** is not satisfied, and the subject-matter of **claims 38 and 39** does not involve an inventive step (**Rule**

65(1)(2) PCT).

14. Article 5 PCT

1. The ISA was unable to find disclosure for **claims 38 and 39** within the description, particularly disclosure for the patient identification process described with **claim 38** and reflecting an expression profile as detailed in **claim 38, Article 5 PCT.**

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

To:

LEE, Wendy, M.
c/o Genentech, INC.
1 DNA Way MS 49
South San Francisco, CA 94080
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 03 April 2006 (03.04.2006)	
Applicant's or agent's file reference P2148R1	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2005/044247	International filing date (day/month/year) 06 December 2005 (06.12.2005)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 07 December 2004 (07.12.2004)
Applicant GENENTECH, INC. et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
07 December 2004 (07.12.2004)	60/633,941	US	15 March 2006 (15.03.2006)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Gijsbertus Beijer

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Telephone No. +41 22 338 95 61

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

251

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RQ/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.175)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	P2148R1
I	Title of invention	SELECTING PATIENTS FOR THERAPY WITH A HER INHIBITOR
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	GENENTECH, INC.
II-5	Address	MS 49 1 DNA Way South San Francisco, California 94080 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	650-225-1000
II-9	Facsimile No.	650-952-9881
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	AMLER, Lukas C.
III-1-5	Address	845 Grenada Lane Foster City, California 94404 United States of America
III-1-6	State of nationality	DE
III-1-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	JANUARIO, Thomas E.
III-2-5	Address	221 Clara Street Apartment 14 San Francisco, California 94107 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	LEE, Wendy M.
IV-1-2	Address	c/o Genentech, Inc. 1 DNA Way MS 49 South San Francisco, California 94080 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	650-225-4463
IV-1-4	Facsimile No.	650-952-9881
IV-1-6	Agent's registration No.	40378
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	ATULYA, Agarwal R.; ANDRUS, Alex; BARNES, Elizabeth M.; CARPENTER, David A.; COBURN, Cara M.; CONLEY, Deirdre L.; CUI, Steven X.; ELLIOTT, Jennifer; EVANS, David; HASAK, Janet E.; JOHNSTON, Sean A.; KALINOWSKI, Grant; KRESNAK, Mark T.; KUBINEC, Jeffrey S.; MARSCHANG, Diane L.; NAIK, Paul; PASQUALONE, Danielle; PLEASURE, Irene; SCHWARTZ, Timothy R.; SHERMAN, Daniel; SHIN, Elinor K.; SVOBODA, Craig G.; TAN, Lee K.; YEUNG, Bonnie

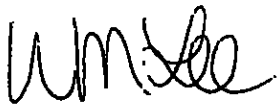
PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

V	DESIGNATIONS		
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.		
VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	07 December 2004 (07.12.2004)	
VI-1-2	Number	60/633,941	
VI-1-3	Country	US	
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	✓
IX-2	Description	65	-
IX-3	Claims	3	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	19	-
IX-7	TOTAL	92	

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-11	Copy of general power of attorney	reference no. NONE	-
IX-16(A)	Sequence listing in electronic form	-	-
IX-16(A) - (ii)	additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	-	1 Diskette
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-18	other	Paper copy of sequence listing	
IX-18	other	Statement regarding sequence listing	
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	NONE	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	LEE, Wendy M.	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--



UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office
ASSISTANT SECRETARY AND COMMISSIONER
OF PATENTS AND TRADEMARKS
Washington, D.C. 20231



APRIL 20, 2005

PTAS

700163088A

WENDY M. LEE
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 703-308-9723. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, ASSIGNMENT DIVISION, BOX ASSIGNMENTS, CG-4, 1213 JEFFERSON DAVIS HWY, SUITE 320, WASHINGTON, D.C. 20231.

RECORDATION DATE: 03/18/2005

REEL/FRAME: 015920/0356
NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:

ANLER, LUKAS C.

DOC DATE: 03/10/2005

ASSIGNOR:

JANUARIO, THOMAS E.

DOC DATE: 03/10/2005

ASSIGNEE:

GENENTECH, INC.

1 DNA WAY

SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA

94080-4990

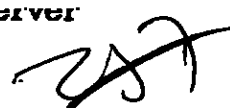
SERIAL NUMBER: 60633941

FILING DATE: 12/07/2004

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: SELECTING PATIENTS FOR THERAPY WITH A HER INHIBITOR



256

015920/0356 PAGE 2

STEVEN POST, EXAMINER
ASSIGNMENT DIVISION
OFFICE OF PUBLIC RECORDS

ASSIGNMENT

WHEREAS, Lukas C. Amler, a citizen of Germany, residing at 845 Grenada Lane, Foster City, CA 94404, and Thomas E. Januario, a citizen of U.S., residing at 221 Clara Street, Apt. 14, San Francisco, CA 94107, (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

SELECTING PATIENTS FOR THERAPY WITH A HER INHIBITOR

for which a provisional application Serial No. 60/633,941 (Docket No. PR2148) has been filed by them on December 7, 2004; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4490, is desirous of acquiring an interest in and to said invention; and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows:

South San Francisco

Dated:

3/10/2005

Lukas C. Amier

South San Francisco

Dated:

3/10/2005

Thomas E. Januario

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

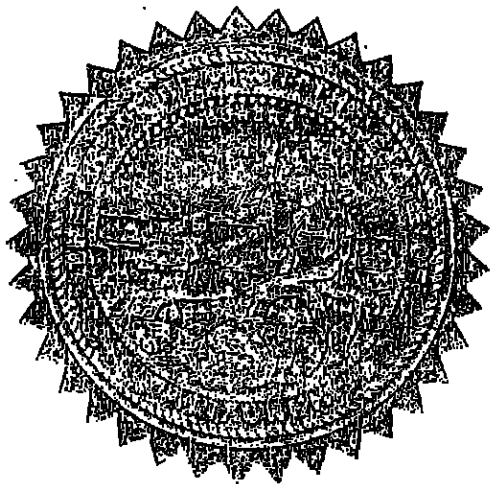
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by AIDA MICLAT GUIAM
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of AIDA MICLAT GUIAM, Notary Public,
State of California

CERTIFIED

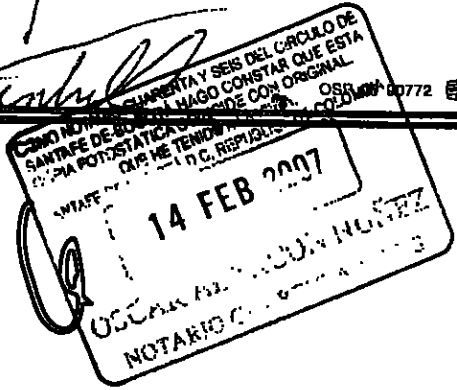
5. At Sacramento, California
6. the 15th day of December 2005
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 267083
9. Seal/Stamp:

10. Signature



[Handwritten Signature]

Secretary of State



261

Not

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of San Mateo } ss.

On December 6, 2005 before me, Aida Mielat Guian
Date Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")
personally appeared Timothy R. Schwartz
Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me
☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.

Aida Mielat Guian
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____ Number of Pages: _____

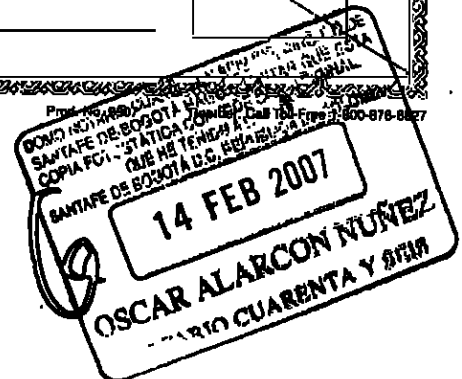
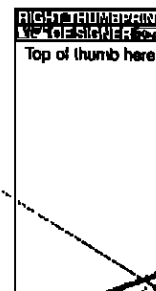
Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

- ☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____



TORNEY

262

POWER OF ATTORNEY

1 (We)

South San F

domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990**
USA

Hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages: claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

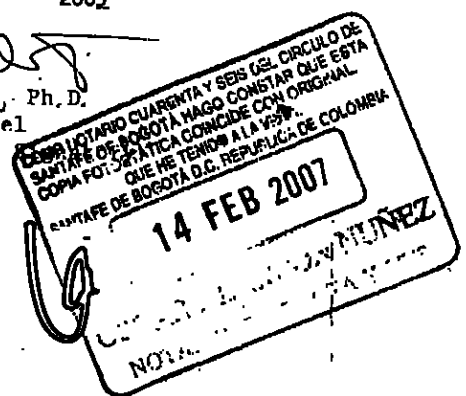
This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciled in Carrera 7 No. 16-58, Piso 8, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

**South San Francisco, California
USA**

Granted and signed in

this 6th day of December 2005

Signature 
Name Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Title Section Patent Counsel
Authorized Corporate
Genentech, Inc.



Hot

263

AUTHORIZATION

Genentech, Inc. hereby authorizes any of Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec and Timothy R. Schwartz, for so long as they remain employees of Genentech, Inc., to execute, on its behalf, any submissions associated with the filing, prosecution, granting, and extension and maintenance of grant of patent and trademark applications in the U.S. and foreign countries, contracts relating to biological deposits with the American Type Culture Collection, and assignments to publishers of copyrights covering works authored by Genentech employees.

August 27, 2002

Dated

Sean Johnston

Sean A. Johnston

Vice President, Intellectual Property
Genentech, Inc.



265
264

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por Genentech, Inc. domiciliada en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, Estados Unidos de América.

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América
Esta documento público
2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público
Estado de California

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el 15 de diciembre de 2005
7. por el Secretario de Estado Delegado, Estado de California
8. No. 267083
9. Sello/Timbre

10. Firma

(Firma)

Secretario de Estado



[Handwritten signature]

265

RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

Estado de California)
 } ss.
Condado de San Mateo)

El 6 de diciembre de 2005, ante mi, AIDA MICLAT GUIAM, apareció personalmente
Thimoty R. Schwartz

☐ a quien conozco personalmente

☒ quien demostró ante mi en base a
evidencia satisfactoria ser la persona cuyo
nombre esta suscrito en el instrumento y
quien reconoció ante mi que ejecutó el
mismo en su capacidad autorizada, y que
por su firma en el instrumento la persona o
la entidad a nombre de la cual la persona
actuó, ejecutó el instrumento.

Hay un sello que dice:
AIDA MICLAT GUIAM
COMISIÓN # 14556612
Notario Público-California
Condado de San Mateo
Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

OPCIONAL

Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y puede
prevenir la remoción y readhesión fraudulenta de esta forma a otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: _____

Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____

Firmante(s) diferente(s) a (los) nombrado(s) arriba: _____

Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante: _____

- ☐ Individuo
- ☐ Funcionario Corporativo – Título(s): _____
- ☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
- ☐ Abogado de hecho
- ☐ Fideicomisario
- ☐ Guardián o conservador
- ☐ Otro: _____

El firmante representa: _____

Huella Índice
derecho del firmante
Parte alta del dedo aquí



267
266

AUTORIZACION

Genentech, Inc. por la presente autoriza a cualquiera de Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec y Thomity R. Schwartz, mientras permanezcan como empleados de Genentech, Inc., a ejecutar, a su nombre, cualquier solicitud asociada con presentación, procesamiento, consecución, y extensión y mantenimiento de concesión de solicitudes de patente y marca-registrada en los Estados Unidos y países extranjeros, contratos relacionados con depósitos biológicos con la Colección Americana de Tipo de Cultivo, y cesiones a publicistas de derechos de autor que cubran los trabajos de autoría de los empleados de Genentech.

27 de Agosto de 2002

Fechado

(Firma)

Sean A. Johnston

Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

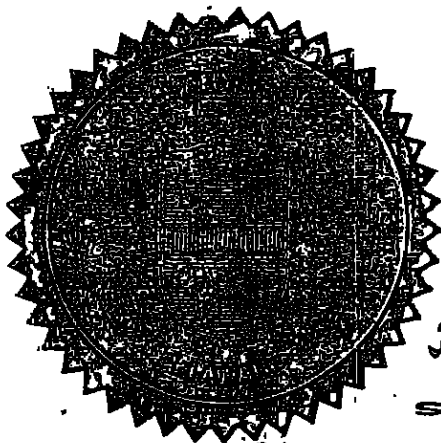
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254030

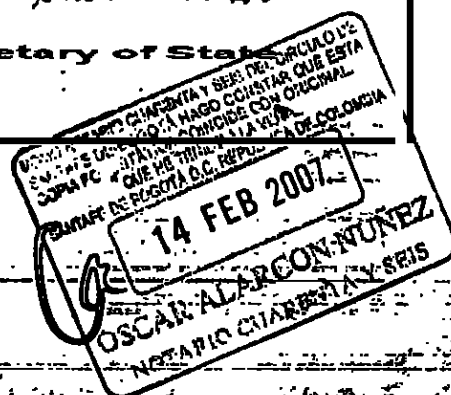
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



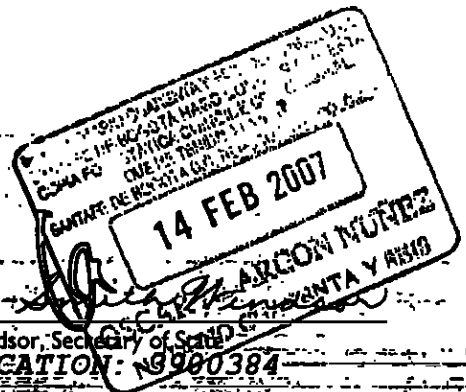
267

Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.



2112549

050426506

HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE

AUTHENTICATION: N9900384

DATE: 05-24-05

270 269

AMENDED AND RESTATED

CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "Corporation"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("Delaware Law").



270

ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

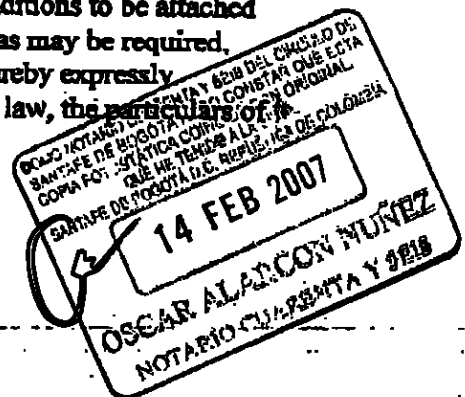
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

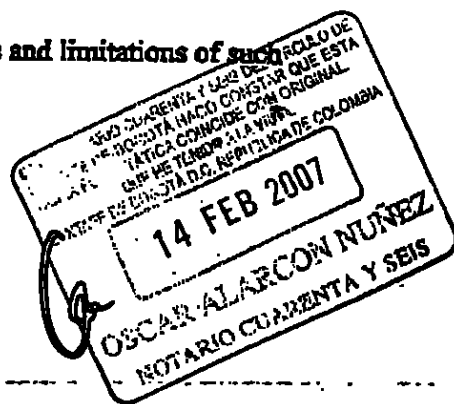
(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of



271

the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

- (i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;
- (ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;
- (iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;
- (iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;
- (v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;
- (vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;
- (vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and
- (viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.



275

272

ARTICLE 5

SECTION 5.01. Amendment of Bylaws by Directors. (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

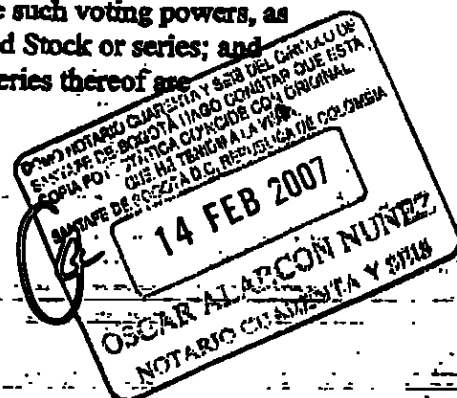
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. Amendment of Certificate of Incorporation. Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. Election of Directors by Holders of Preferred Stock. During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are



273

divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

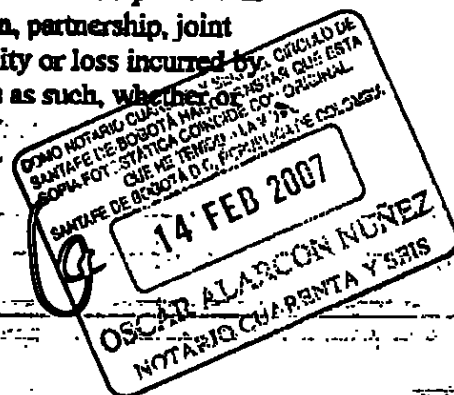
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors.* (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or not



274

not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

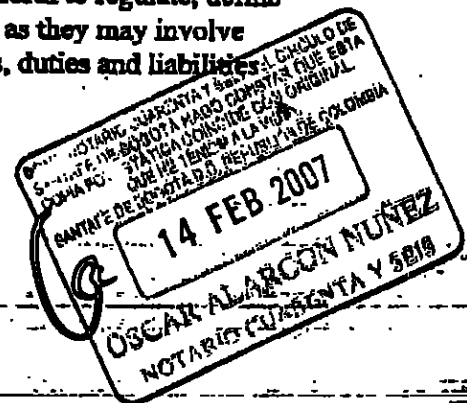
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, rescission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities



275

of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

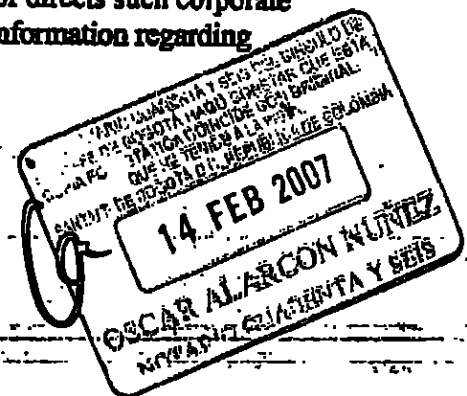
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.



276

277

SECTION 8.04. Deemed Consent of Stockholders. Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

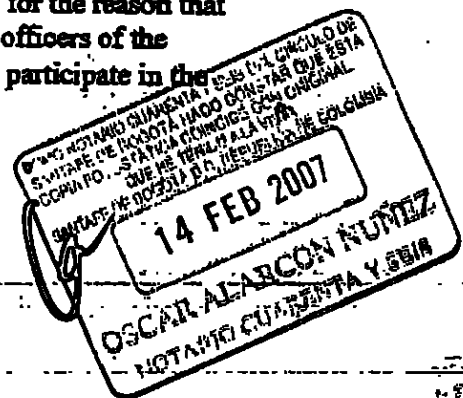
SECTION 8.05. Definitions. For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term "Roche" shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are "affiliates" (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. Termination: Binding Effect. Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. Article 9. The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. Contracts Not Void. No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the



278 277

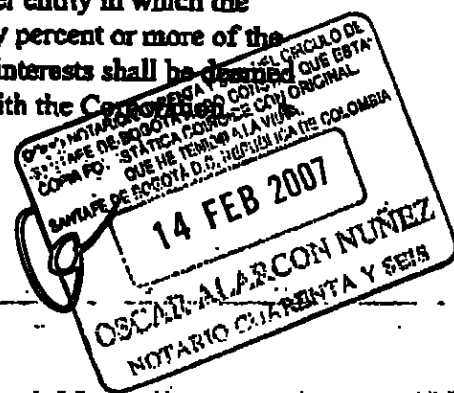
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "Corporation" and "Roche" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer or director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

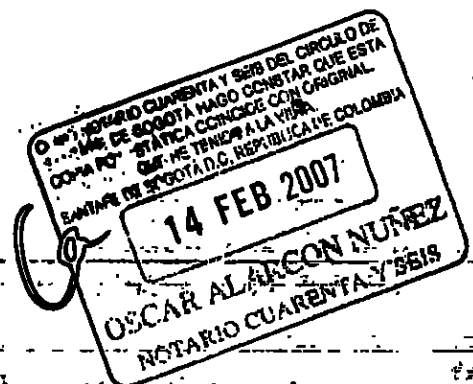
SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.



275 238

SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.

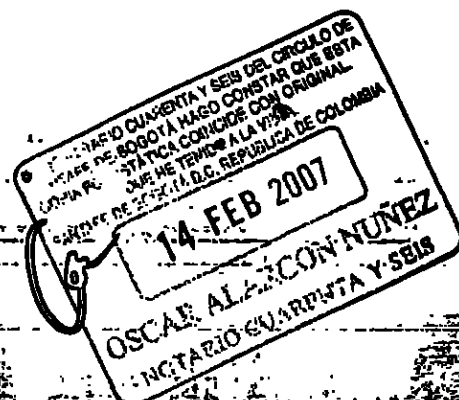


240 279

IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254030
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



281

preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Trecientos millones (300,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la Corporación con derecho a votar por la misma independiente de las consideraciones de la Sección 242(b)(2) de la Ley de Delaware.

000

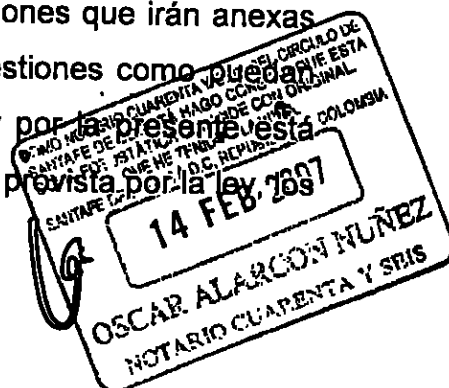
SECCION 4.02. *Acción Común.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquier acción sin emitir o del tesoro del las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

(b) *Dividendos.* Sujeto a los derechos de los accionistas de las Acciones Preferenciales, los accionistas de Acciones Comunes deberán tener el derecho a recibir, cuando y como se declare por la Junta Directiva, de los activos de la Corporación los cuales están disponibles para ello por ley, dividendos pagables ya sea en dinero, propiedad, o acciones y los accionistas de la Acción Preferencial no tendrán derecho a participar en tales dividendos (a menos que la Junta Directiva determine lo contrario en cualquier resolución que condiciona la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

000

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

(a) *Serie y Límites de Variaciones entre Series.* Cualquier acción no emitida o del tesoro de las Acciones Preferenciales puede emitirse cada cierto tiempo en una o más series para tal consideración como pueda ser fijada cada cierto tiempo por la Junta Directiva. Antes de que se emita cualquier acción de las Acciones Preferenciales de cualquier serie particular, se deberá presentar un certificado ante el Secretario de Estado de Delaware estableciendo las designaciones, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones que irán anexas a las Acciones Preferenciales de tal serie y tales otras cuestiones como puedan requerirse, y la Junta Directiva deberá fijar y determinar, y por la presente está expresamente autorizada para fijar y determinar, en la forma prevista por la ley 7697



282

CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
GENENTECH, INC.

Genentech, Inc (la "Corporación"), una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, por la presente corrige el Certificado de Incorporación, el fue presentado originalmente el 23 de diciembre de 1986, bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y corregido subsiguientemente.

Por la presente se vuelve a redactar el certificado de incorporación de la Corporación y se corrige aun más para que diga en su totalidad lo que sigue:

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

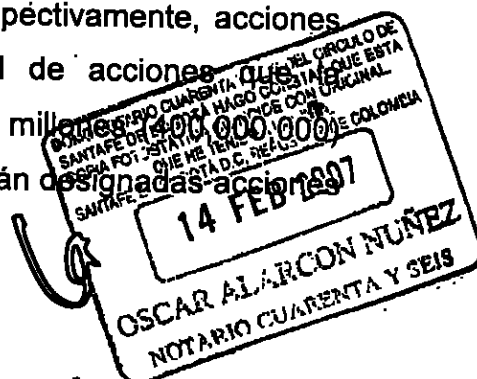
La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de a Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones pueden ser organizadas bajo la Ley General de Corporación del Estado de Delaware como existe o puede se modificada la misma en adelante ("Delaware Law").

ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de cuatrocientos mil (400,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones



283

particulares de las acciones de tal serie (siempre y cuando no sean inconsistentes con las condiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes:

(i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, numero que puede incrementarse (excepto cuando lo determine de otro modo la Junta Directiva al crear tal serie) o reducida (pero no por debajo del número de acciones de las mismas que están vigentes) cada cierto tiempo por una acción semejante de la Junta Directiva;

(ii) la tasa anual de dividendos a pagar sobre las acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales se pagarán tales dividendos y le fecha a partir de la cual los dividendos serán acumulativos en el evento que la Junta Directiva determine que los dividendos serán acumulativos;

(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(iv) si tal serie tendrá o no privilegios de conversión y, de ser así, los términos y condiciones de tal conversión, incluyendo, pero sin estar limitado a, la condición para ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y de tal forma como la Junta Directiva lo determine;

(v) si las acciones de tal serie serán o no redimibles y, de ser así, los términos y condiciones de tal redención, incluyendo la fecha o fechas en las cuales o después de las cuales pueden ser redimibles, y la cantidad a pagar por acción en caso de redención, cantidad que variará bajo diferentes condiciones y en diferentes fechas de redención;

(vi) si tal serie tendrá o no un fondo de inversión para la redención o compra de acciones de esa serie y, de ser así, los términos y la cantidad de tal fondo de inversión;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de liquidación, disolución o cierre voluntaria o involuntaria de la Corporación;



284

los derechos relativos de prioridad, de haber, de pago de acciones de esa serie; y

(viii) cualquier otro derecho relativo, preferencia y limitación de tal serie.

ARTICULO 5

SECCION 5.01. *Enmiendas a los estatutos por los Directores.* (a) En adición y no limitando los poderes conferidos por estatutos, la Junta Directiva esta expresamente autorizada para hacer, alterar, enmendar, rechazar y rescindir los estatutos de la Corporación, sujetos a las secciones 5.01(b) y 5.01(c) a continuación.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden ser alteradas, enmendadas, repelidas, o rescindidas por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar las mismas.

SECCION 5.02. *Enmienda del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación solo puede ser alterada, enmendada, repelida, o rescindida por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a voto sobre la misma que representen a más del 60% de las acciones con derecho a votar la misma. La sección 5.01(c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar la misma que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar la misma.

ARTICULO 6

SECCION 6.01: *Elección del Directorio por los Accionistas de Acción Preferencial.* Durante cualquier periodo cuando los accionistas de acción preferencial...



~~250~~

285

○
○
○

corporación o es o estaba
ector de otra corporación
o u otra empresa, insere
corporación hasta donde
14 FEB 2007
OSCAR ALARCON NUNEZ
NOTARIO CUARENTA Y SEIS

286

permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión con cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta tal punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurrida por tal persona en cualquier capacidad o que surge de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán exclusivos de ningún otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirir de aquí en adelante.

(f) Ni la alteración, enmienda, rechazo o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de ninguna condición de este Certificado de Incorporación o de los Estatutos de la Corporación, ni, hasta donde lo permite la Ley de Delaware, ninguna modificación de la ley, debe eliminar o reducir el efecto de esta Sección 6.03 respecto a ninguno de los actos u omisiones que ocurran antes de tal alteración, enmienda, rechazo, rescisión, adopción o modificación.

ARTICULO 7

SECCION 7.01, Sección 203 de la Ley de Delaware. Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware



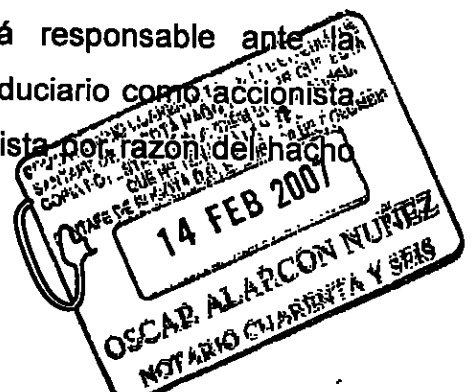
SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este artículo 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionarios y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

SECCIÓN 8.02. *Actividades en Negocios Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc. pueda de otra forma acordarlo por escrito,

(a) Roche no tendrá el deber de abstenerse de entrar directamente o indirectamente en actividades de negocios o líneas de negocios semejantes o similares a las de la Corporación, y

(b) ni Roche ni ninguno de sus funcionarios o director de la misma será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar cualquier deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades de Roche o de la participación de tal persona en las mismas.

En el evento que Roche adquiera conocimientos de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hecho



000

000

289

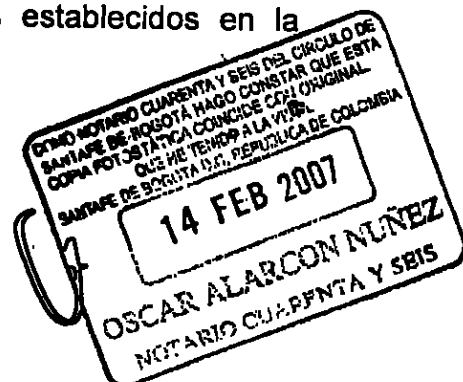
define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc.

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante*. Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cese de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que se director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07. *Artículo 9*. Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos no nulos*. Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo u anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "*Corporación*" y "*Roche*" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.



~~221~~ 290

SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo). Las acciones vigentes de las Acciones Comunes de propiedad de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de accionistas que autorice o apruebe tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo).

SECCION 9.03. *No responsabilidad por acciones de buena fe.* Ni Roche ni ningún funcionario o director de la misma será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar cualquiera de los deberes fiduciarios o deberes de lealtad o por fallar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o por derivación de cualquier beneficio personal por razón del hecho que Roche o un funcionario o director de la misma de buena fe tome cualquier acción o ejerza cualquier derecho o de o retenga cualquier consentimiento en conexión con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto dado u otra acción tomada por cualquier persona que es un funcionario, director o representante de Roche, donde el voto o acción es tomado por tal persona en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho o un consentimiento de Roche para los propósitos de cualquiera de tal acuerdo o contrato.

SECCION 9.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 9.

SECCION 9.05. *Contratos cubiertos.* Para propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o cualquier corporación, sociedad, sociedad de riesgo conjunto, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) el cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poderes de voto o intereses de voto similares vigentes se considerará un contrato, acuerdo o transacción con la Corporación.



245
291

SECCION 9.06. *Efecto obligante.* Ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 9 ni la adopción de alguna condición inconsistente con cualquier condición de este Artículo 9 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 respecto a cualquier materia que ocurra, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, a no ser por este Artículo 9, pueda acaecer o surgir, antes de tal alteración, enmienda, cambio, rechazo o adopción.

SECCION 9.07. *Artículo 8.* Las condiciones de este Artículo 9 son adicionales a las condiciones del Artículo 8.

O.O.O.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, el cual ha sido adoptado de acuerdo con las secciones 242 y 245 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware y por consentimiento escrito de el único accionista de la Corporación de acuerdo con la sección 228 de Ley General de Corporación del Estado de Delaware, ha sido ejecutado este 22 de Julio de 1999.

GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente

Consejo General y Secretaría



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

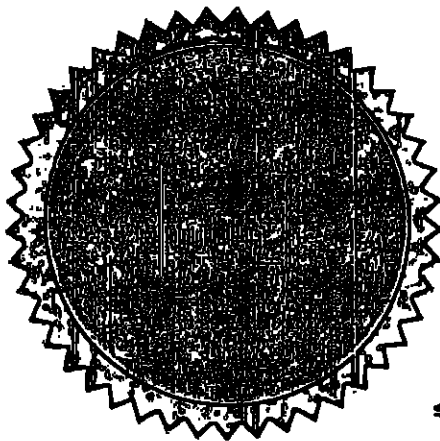
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254031

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



Delaware

PAGE 1

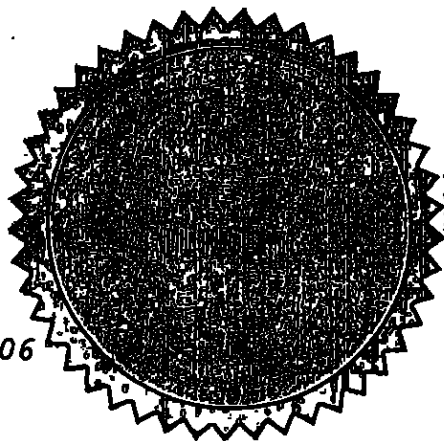
293

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.

2112549

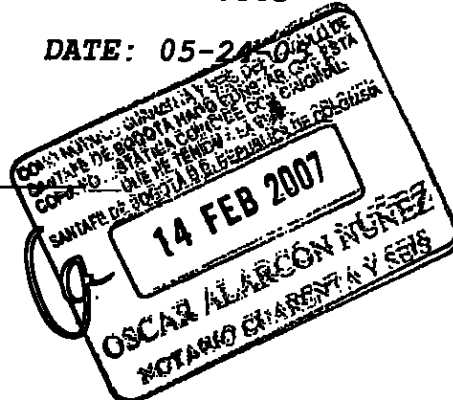
050426506



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-2000



CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

294

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

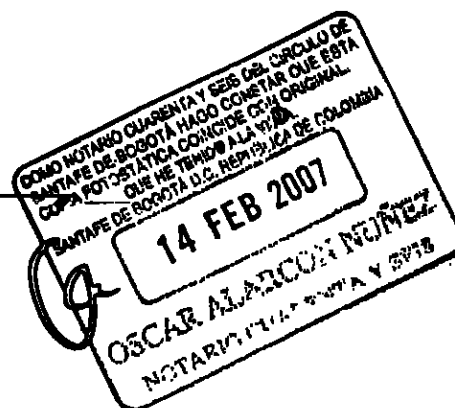
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary



APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254031
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOQUINTO DIA DE MAYO, A. D. 2000; A LAS 5 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385

FECHA: 05 - 24 - 05

297 297

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL VIGÉSIMO SEGUNDO DÍA DE JULIO, A. D. 1999, A LAS 9 EN PUNTO DE LA MAÑANA.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900384

FECHA: 05 - 24 - 05

299 298

CERTIFICADO DE ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

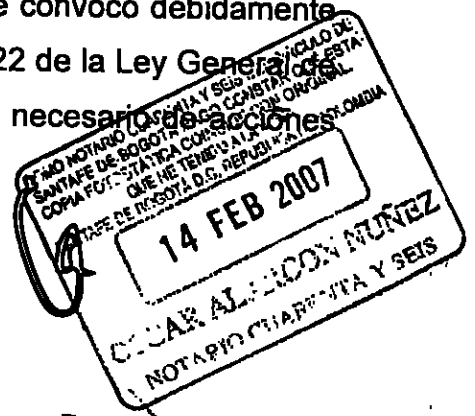
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de setecientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



306

299

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

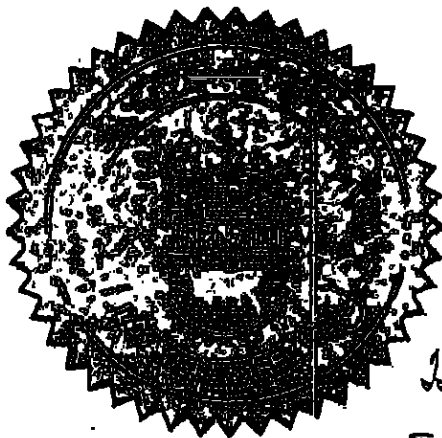
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No.. 0254033

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



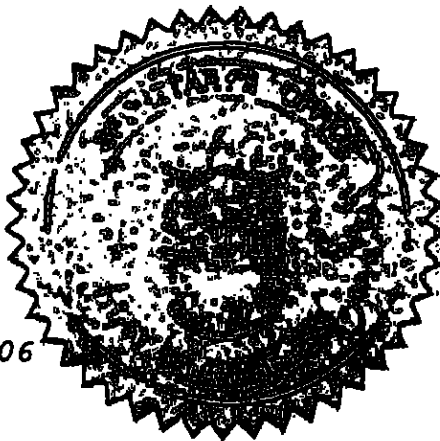
Delaware

PAGE 1

301

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.



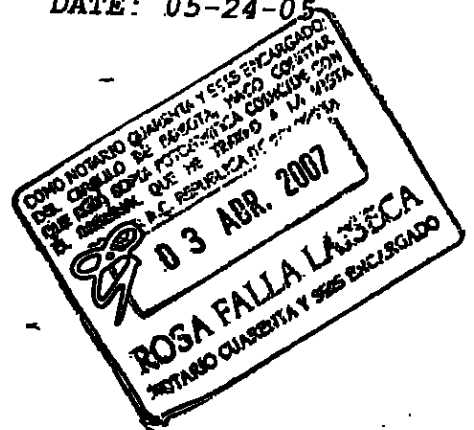
2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05



CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

302

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

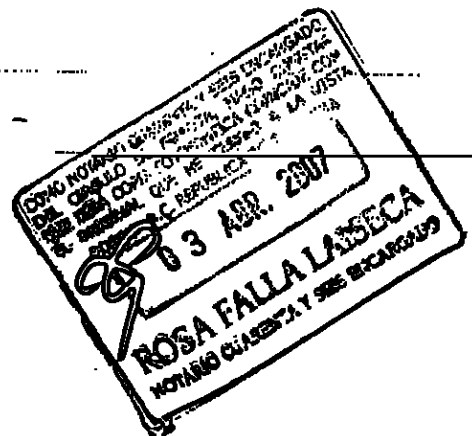
GENENTECH, INC.

By: Stephen G. Juelsgaard

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel
and Secretary

#153087



APOSTILLA

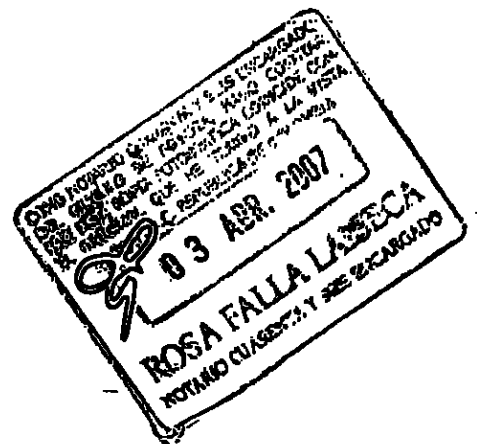
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



305

304

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOSEXTO DIA DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.

Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado



305

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

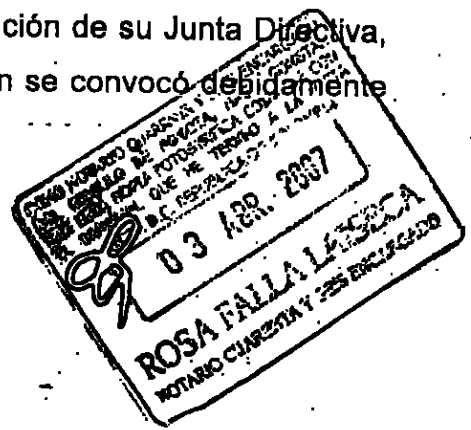
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente.



306

307

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



71 200
44
307

208

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

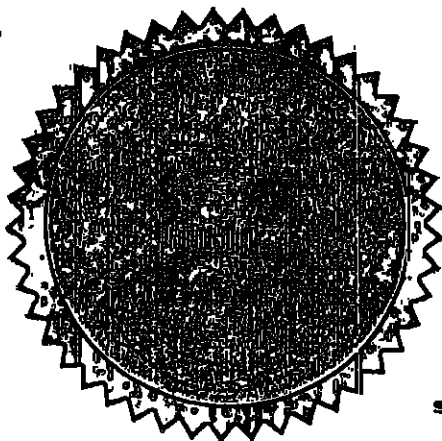
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

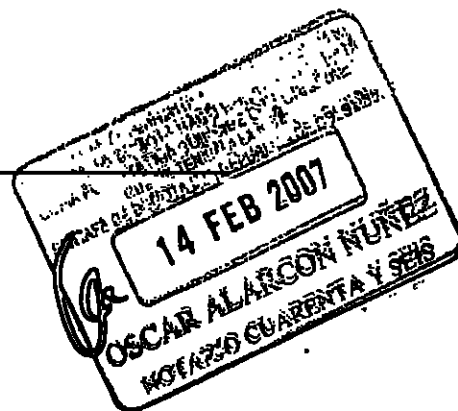
8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor
Secretary of State



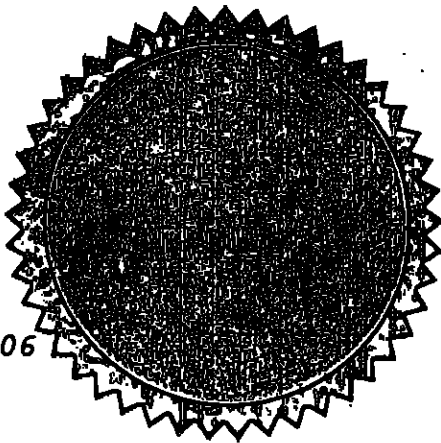
Delaware

308

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.



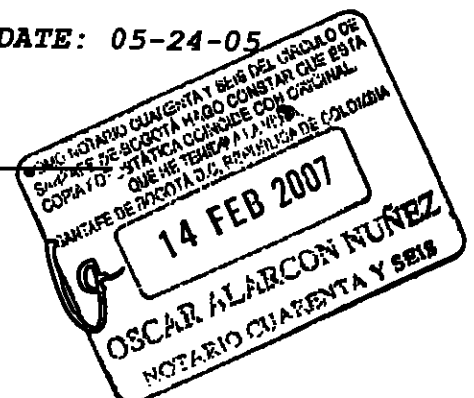
2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State
AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05



309

CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

86747



APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



311

DELAWARE
EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900386

FECHA: 05 - 24 - 05

312

312

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

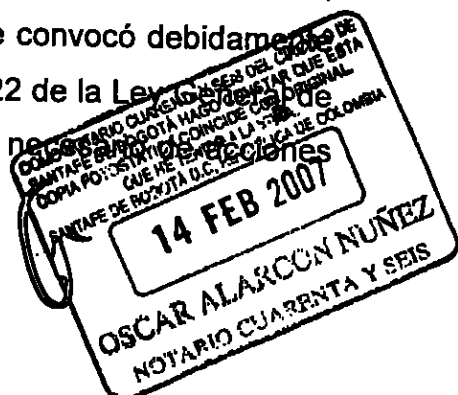
CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmienda cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de \$0.02 por acción ("Acción Común"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.



317

313

TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-055664-00000-0000

Fecha: 2007-06-01 16:10:18 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 313



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

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 ☐

Firma Responsable

01 JUN. 2007

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

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 315

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH, INC.

REFERENCIA	Radicación No.	7 55664
	Solicitud internacional	pct/us2005/044247
	Fecha inicio fase nacional	07/07/07
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	3860
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

3 SET. 2007

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

jfernand