CSA055619

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. EXPEDIENTE No. 09-79621

54. TÍTULO : "PREDICCIÓN DE RESPUESTA A UN INHIBIDOR DE SINTERIZACIÓN HER BASADO EN EXPRESIÓN DE HER3 BAJO"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL G01N 33/574

71. SOLICITANTE : GENENTECH, INC. y F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

DOMICILIO: SOUTH SAN FRANCISCO, ESTADO DE CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA Y BASILEA, SUIZA

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

22. BOGOTÁ, D.C 2009

(FORMA P 10).

T 1/5

# PETITORIO

OKD

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-079621- -00000-0000
Fecha: 2009-07-30 16:56:27 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 416

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

## FORMULARIO UNICO 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. y F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**<br>Dirección: 1 Dna Way, South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de América y 124, Grenzacherstrasse, CH-4070 Basilea, Suiza.<br>Nacionalidad o Domicilio: South San Francisco, Estado de California, Estados Unidos de América y Basilea, Suiza.<br>Lugar de Constitución: Estado de Delaware, Estados Unidos de América y Suiza.<br>Teléfono: 3264270 Fax: 6069701<br>E-mail: jllcco@lloredacamacho.com | **IDENTIFICACION**<br>C.C. ☐ NIT ☐<br>C.E. ☐ Otro ☐<br>Cual _____<br>Número _____ |
| **③ REPRESENTANTE O APODERADO** | Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**<br>Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia<br>Teléfono: 3264270 Fax: 6069701<br>E-mail: jllcco@lloredacamacho.com | C.C. ☒ NIT ☐<br>C.E. ☐ Otro ☐<br>Cual _____<br>Número 39.690.713 TP 53.215 |
| **④ INVENTOR(ES) (72)** | Nombre: AMLER, Lukas, C.; BIRKNER, Merrill; LIN, Chin-Yu; MOECKS, Joachim; STRAUSS, Andreas.<br>Dirección: 845 Grenada Lane, Foster City, CA 94404; 160 Brannan Street, Apt. 404, San Francisco, CA 94107; 300 Baltic Circle, Unit 322, Redwood City, CA 94065; Max-Joseph-Strasse 9, 68167 Mannheim y Falkenstrasse 9, 82377 Penzberg.<br>Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América y Alemania. | |

**⑤ PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/055502 Fecha: 29/02/08

Publicación Internacional No. WO 2008/109440 A3 Fecha: 12/09/08

**⑥ Título (54)** **"PREDICCIÓN DE RESPUESTA A UN INHIBIDOR DE DIMERIZACIÓN HER BASADO EN EXPRESIÓN DE HER3 BAJO"**

**⑦ Clasificación Internacional (51)** G01N 33/574

**⑧ Prioridad** SI ☒ NO ☐

| (33) País de Origen | (32) Fecha | (31) Número de Solicitud |
|---|---|---|
| US | 02-03-07 | 60/892,640 |
| US | 16-04-07 | 60/912,053 |
| US | 19-02-08 | 61/029,748 |

**⑨ Comprobante de Pago No.** 09-41,725 **Fecha:** Junio 8 de 2009

(10) **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Documento de Representación Legal.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones
- [ ] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- [ ] Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] Arte Final 12X12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros: Reporte de Búsqueda Internacional, Publicación, Notificaciones de Registro, Adición y Corrección de la Dirección del solicitante F. Hoffmann-La Roche AG y del inventor STRAUSS, Andreas, Opinión Escrita y Listado de Secuencias.

(11) **FIGURA CARACTERISTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-079621- -00000-0000

Fecha: 2009-07-30 16:56:27 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 416

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 41,725
FECHA : JUNIO 8 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

| DEPOSITANTE | TIPO PAGO | BANCO | CUENTA | No. PAGO | FECHA PGO | Vr. PAGO |
|---|---|---|---|---|---|---|
| LLOREDA Y CIA S. A | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 79464490 | 08/06/2009 | 16,869,000.00 |

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

| CANT. | RENTISTICO | CONCEPTO | | TOTAL CONCEPTO |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | | 540,000.00 |
| | | TOTAL : | $ | 540,000.00 |

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

MFR

**ANEXO**

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

ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. No. 53.215

*Traducción Oficial Nº 10-31-191*

*Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.*

## APOSTILLA

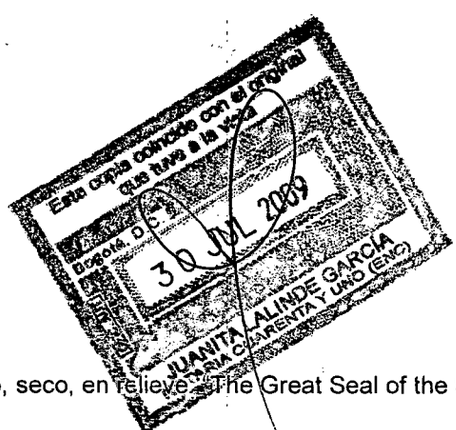
(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: TERI LEE
3. actuando en calidad de: Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello y estampilla de TERI LEE, Notario Público

## CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el día tres (3) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario Adjunto de Estado, Estado de California
8. Número: **258054**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado




**N. del T.**: hay un sello dorado, seco, en relieve: "The Great Seal of the State of California"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174484

Illegible

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:58

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Esta copia coincide con el original que tuvo a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUL 2009
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (E.N.O)

## CALIFORNIA RECONOCIMIENTO PARA TODO FIN

Estado de California )
) ss.
Condado de San Mateo )

El día 13 de Septiembre, año 2005, ante mi, TERI LEE, Notario Público, compareció personalmente TIMOTHY R. SCHWARTZ, a quien personalmente conozco cómo la persona cuyo nombre suscribe el documento, y quien reconoció en mi presencia haber formalizado el mismo dentro de su investidura, y que mediante su firma en el documento, la persona o entidad en cuyo nombre actuó, formalizó el documento.

En TESTIMONIO firmo y sello

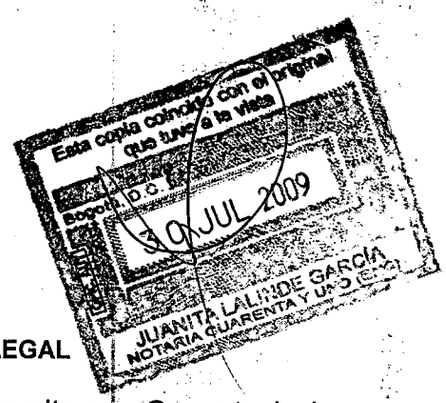
Firma (ilegible)

**N. del T**: hay un sello: TERI LEE, Comisión Nº 1514234, Notario Público, California, Condado de San Mateo.

**OPCIONAL**

**Descripción del documento adjunto**

Título o Clase de Documento: Colombia Power
Fecha: 9/13/2005
Número de páginas: 1
Firma diferente de la mencionada anteriormente: *Ninguna*




**PODER DE REPRESENTACION LEGAL**

Documento escrito en idioma Inglés y Español, suscrito por Genentech, Inc., con domicilio en 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, EEUU.

DADO Y FIRMADO EL DIA TRECE (13) DE Septiembre año 2005

Firma (ilegible)

**N. del T.:** Hay un sello de tinta: Timothy R. Schwartz, Ph. D.- Asesor Sección de Patentes – Genentech, Inc. – Signatario Corporativo Autorizado.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

*Traducción Oficial Nº 10-31-192*

*Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.*

## APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

## CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265282**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado




**N. del T.**: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174485

Elba Espana

COTA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10 59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Esta copia coincide con el original que tuvo a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUL 2009
JUANITA LALINDE GARCÍA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (E.N.O.)

**DELAWARE**

**EL PRIMER ESTADO**

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE "GENENTECH, INC." ESTA DEBIDAMENTE INCORPORADO BAJO LAS LEYES DEL ESTADO DE DELAWARE Y GOZA DE BUENA REPUTACION Y TIENE EXISTENCIA CORPORATIVA LEGAL, TAL COMO LO MUESTRAN LOS REGISTROS DE ESTE DESPACHO, EN LA FECHA DEL SIETE (7) DE OCTUBRE, AÑO 2005.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE DICHO "GENENTECH, INC." FUE INCORPORADO EL DIA VEINTITRES (23) DE DICIEMBRE DEL AÑO 1986.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS REPORTES ANUALES HAN SIDO RADICADOS HASTA LA FECHA.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS IMPUESTOS DE FRANQUICIA HAN SIDO PAGADOS HASTA LA FECHA.

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACIÓN: 4212779 FECHA 10-07-05

**N. del T.**:. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"

Esta copia fotocopia con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUL 2009
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (41)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

*Traducción Oficial Nº 10-31-193*

*Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.*

## APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

## CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265283**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUN 2009
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (E.N.C.)

**N. del T.**: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174487

Albar Espana

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista

Bogotá, D.C.

30 JUL 2009

JUANITA LALINDE GARZON
NOTARIA CUARENTA Y UNA (41) (E)

**DELAWARE**

**EL PRIMER ESTADO**

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO REFORMULADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA VEINTIDOS DE JULIO DEL AÑO 1999, A LAS 9:00 A.M.

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212780 FECHA: 10-07-05

**N. del T.** Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary´s Office – Delaware"




ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

# CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO DE GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, por el presente modifica el Certificado de Incorporación de la Corporación, qué fue registrada originalmente el 23 de diciembre,1986 bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y posteriormente modificado.

El Certificado de Incorporación de la Corporación es por el presente reformulado y adicionalmente modificado, para leerlo en su integridad como sigue:

## ARTÍCULO 1

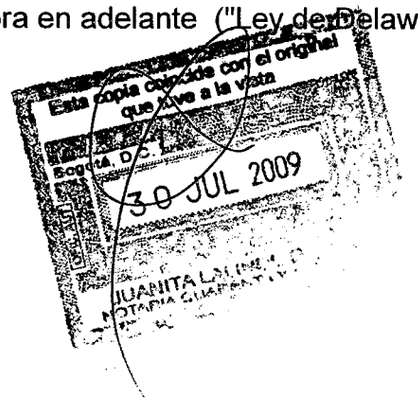
El nombre de la Corporación es: Genentech Inc.

## ARTÍCULO 2

La dirección del domicilio social de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, Condado de New Castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

## ARTÍCULO 3

El objetivo social de la Corporación es llevar a cabo cualquier acto o actividad lícita para la cual puedan organizarse las corporaciones bajo la Ley Corporativa General del Estado de Delaware como la misma existe o cómo pueda modificarse de ahora en adelante ("Ley de Delaware").




ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

10

## ARTICULO 4

SECCI0N 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas respectivamente, acción preferencial y

acción ordinaria. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de cuatrocientos millones (400.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, valor nominal $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trescientos millones (300.000.000) se denominarán acciones ordinarias, valor nominal $0.02 por acción ("**Acción Ordinaria**") La Acción Ordinaria de la Corporación, será toda de una clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones se puede aumentar o disminuir (pero no por debajo del número de acciones de las mismas, entonces circulación) mediante el voto afirmativo de una mayoría con poder de voto de la acciones en circulación de la Corporación tituladas para votar sobre ello, independiente de las disposiciones de la Sección 242(b)(2) de Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción ordinaria. (a) Emisión y Consideración.* Cualquiera Acción Ordinaria de tesorería o no emitida, puede emitirse para tal consideración según puede fijarse de acuerdo con la ley aplicable periódicamente por la Junta Directiva.

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUL 2009
JUANITA LA[illegible]
NOTARIA CUARENTA

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

11

(b) *Dividendos.* Sujeto a los derechos de los titulares de las Acciones Preferenciales, los titulares de las Acciones Ordinarias tendrán derecho a recibir, cuando y cómo lo declare la Junta Directiva, de los recursos de la Corporación que por ley están disponibles para éllo, dividendos pagables o en dinero en efectivo, o en propiedades, o en acciones y los titulares de Acciones Preferenciales no tendrán derecho a participar de tales dividendos (a menos que la Junta Directiva lo disponga de otra manera mediante una resolución, estipulando la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCI0N 4.03. *Acciones Preferenciales*

(a) Series y Límites de Variaciones entre las Series. Cualquier acción de tesorería o no emitida de Acciones Preferenciales puede emitirse periódicamente en una o más series para tal consideración, según puede fijarse periódicamente por la Junta Directiva. Antes de la emisión de alguna serie particular de Acciones Preferenciales, se debe registrar un certificado ante la Secretaría de Estado de Delaware manifestando la designación, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones a ser adjuntas a las Acciones Preferenciales de tal serie y cualesquiera otros asuntos que sean requeridos, y la Junta Directiva fijará y determinará; y por la presente está expresamente facultada para fijar y determinar, en la manera prevista por la ley, los pormenores de las acciones de tal serie (en tanto que no sean inconsistente con las disposiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluído, pero no limitado a lo siguiente:

(i) la designación característica de tal serie y el número de acciones que constituirán la misma, cuya cantidad puede aumentarse (excepto cuando la Junta Directiva lo disponga de otra manera en la creación de tal serie)

Esta copia corresponde con el que tuve a la vista
30 JUL 2009
ANITA M. GARCIA ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

disminuirse (pero no por debajo del número de acciones de las mismas entonces circulantes) periódicamente mediante acción similar de la Junta Directiva.

(ii) la tasa anual de dividendos pagables sobre acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales tales dividendos serán pagables y la fecha desde cuando los dividendos serán acumulativos; en tal evento la Junta Directiva determinará qué dividendos serán acumulativos;

(iii) si tal serie tendrá derecho a voto, además de los derechos de votación proporcionados por la ley, y si es así, las condiciones de tales derechos a voto;

(iv) si tal serie tendrá privilegios de conversión y, en ese caso, los términos y condiciones de tal conversión, incluído, pero no limitado a, disposiciones para el ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y en tal manera cómo lo determinará la Junta directiva;

(v) si o no, las acciones de tal serie serán redimibles y, en ese caso, los términos y condiciones de tal redención, incluso la fecha o fechas en o después de que ellas sean redimibles, y la cantidad pagable por acción en caso de redención, cuya cantidad puede variar bajo condiciones diferentes y en fechas diferentes de redención;

(vi) si tal serie tendrá un fondo de amortización para la redención o compra de acciones de esa serie y, en ese caso, las condiciones y cantidad de tal fondo de amortización;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de liquidación voluntaria o involuntaria, disolución o liquidación de la Corporación, y los derechos de prioridad relativos, si los hay, de pago de acciones de esa serie; y

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUL 2009

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

(viii) cualesquiera otros derechos relacionados preferencias y limitaciones de tal serie.

## ARTÍCULO 5

SECCIÓN 5.01. *Modificación de los Estatutos por los Directores.* (a.) En apoyo y no en limitación a los poderes conferidos por el estatuto, la Junta Directiva está autorizada expresamente para formular, modificar, corregir, derogar, y rescindir los estatutos de la Corporación, sujeto a las Secciones 5.01(b) y 5.01(c) del presente.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, y 5.06, de los estatutos sólo pueden ser modificados, corregidos, derogados, o rescindidos mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultados para votar sobre ello y que representen más del 60% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos sólo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario titulados para votar sobre ello, y que representen más del 90% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.

SECCIÓN 5.02. *Modificación del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación sólo puede modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para Votar sobre ella, que representen más del 60% de

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Esta copia coincide con el original que tuvo a la vista
D. C.
30 JUL 2009

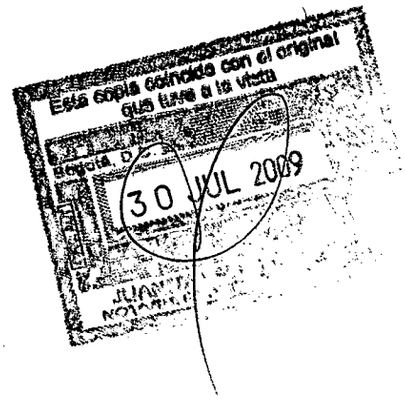
las acciones tituladas para ser votado sobre ello. La sección 5.01 (c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación sólo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para votar sobre ello, que representen más del 90% de las acciones tituladas para ser votado sobre ello.

**ARTÍCULO 6**

SECCIÓN 6.01 - *Elección de Directores por los Titulares de Acciones Preferenciales.*

Durante cualquier período cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o una o más series de las mismas, votando como una clase, sean titulados para elegir un número específico de directores, por razón de dividendos vencidos u otras disposiciones otorgándoles el derecho para hacerlo, entonces y durante ese periodo de tiempo mientras continúe el derecho (i) el entonces autorizado número de directores se aumentará por tal número especificado de directores, y los titulares de tales Acciones Preferenciales o tal serie de las mismas, votando como una clase, se facultarán para elegir a los directores adicionales previstos, de conformidad con las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie; (ii) cada director adicional desempeñará el cargo durante tal término y tendrá tales poderes de votación como sea expresado en las disposiciones relacionadas con las Acciones Preferenciales o serie; y (iii) cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o serie de las mismas son despojados de tales derechos para elegir un número específico de directores, votando como una clase, conforme a las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie, los periodos del cargo de todos los directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, votando como una clase conforme a tales

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



disposiciones, o eligieron llenar alguna vacante resultante de la muerte, dimisión o remoción de directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, terminará inmediatamente y el número autorizado de directores por consiguiente, se reducirá.

SECCIÓN 6.02. *Papeletas de votación.* Las elecciones de directores en una asamblea anual o especial no necesitan ser mediante papeletas escritas, a menos que los estatutos de la Corporación lo dispongan de otra manera.

SECCIÓN 6.03. *Eliminación de Cierta obligación Personal de los Directores.* (a.) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o ante sus accionistas por los daños y perjuicios por contravención de deberes fiduciarios monetarios como director, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y los herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quién era o es una parte o es amenazada ser hecha una parte a, o está involucrada en alguna amenaza, pendiente o a cumplirse, de acción, demanda o procedimiento, sea civil, penal, administrativo o investigativo, por causa del hecho que tal persona es o fue un director de la Corporación, o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fideicomiso u otra empresa, será indemnizada y será exonerada de responsabilidad por la Corporación, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware - El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 también incluirá el derecho a ser pagado por la Corporación por los gastos incurridos en relación con cualquiera de tales

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 6920
Agosto de 1996

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUL 2008
JUANITA
NOTARIA

procedimientos, anticipadamente a la disposición final, hasta el máximo punto autorizado por la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, mediante la acción de su Junta Directiva, proporcionar la indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta el alcance y hasta tal efecto como lo determine la Junta Directiva que sea apropiado y autorizado por la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá la facultad para adquirir y mantener seguros en nombre de cualquier persona que es o fue director, funcionario, empleado o agente, de la Corporación o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente, de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fiduciaria u otra empresa; contra cualquier gasto, obligación o pérdida, incurrida por tal persona en cualquier capacidad o surgida de su status como tal, la Corporación tuviera o no la facultad para indemnizarlo contra tal obligación bajo la Ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán excluyentes de cualquier otro derecho el cual cualquier persona de otra manera pudiera tener o adquirir de ahora en adelante.

(f) Ni la modificación, corrección, derogación o rescisión, de esta Sección 6.03, ni la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación o los Estatutos de la Corporación, tampoco, al alcance máximo permitido por la Ley de Delaware, cualquier modificación legal, eliminará o reducirá el efecto de esta Sección 6.03 con respecto de cualesquier actos u omisiones que ocurran antes de tal modificación, corrección, derogación, rescisión, adopción o modificación.

Esta copia corresponde con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUL 2009

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

17

## ARTÍCULO 7

SECCION 7.01. *Sección 203 de Ley de Delaware*. La Corporación por el presente, elige no ser regida por la Sección 203 de Ley de Delaware.

## ARTÍCULO 8

SECCIÓN 8.01. *Relación con Roche*. En anticipación a que la Corporación deje de ser una subsidiaria totalmente propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se definió en la Sección 8.05) siga siendo accionista de la Corporación, y en anticipación a que la Corporación (como se definió en la sección 8.05) y Roche puedan involucrarse en similares o en las mismas actividades o líneas comerciales y tengan 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 continuas relaciones contractuales, corporativas y comerciales con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades inherentes a cualquier director quien desea y se esfuerza plenamente para satisfacer tales obligaciones fiduciarias del director, en la determinar el alcance total de tales obligaciones en una situación particular, las disposiciones de este Artículo 8 son expresadas para regular, definir y guiar la conducta de ciertos negocios de la Corporación por cuanto ellos pueden involucrar a Roche y a sus funcionarios y directores, y las facultades, derechos obligaciones y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con las mismas.

SECCIÓN 8.02. *Actividades Comerciales Similares*. Excepto que Roche Holdings, Inc - pueda de otro modo aceptar por escrito.




ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

(a) Roche no tendrá una obligación de abstenerse, de comprometerse directa o indirectamente, en las mismas o similares actividades comerciales o líneas comerciales como la Corporación, y

(b) ni Roche ni ningún funcionario o director del mismo serán responsables ante la Corporación o ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario por causa de cualquiera de tales actividad de Roche o de la participación en ello de tal persona.

En caso que Roche tenga conocimiento de una transacción potencial o materia que pueda ser una oportunidad corporativa para Roche y 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 ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario como accionista de la Corporación o persona controladora de un accionista por el hecho que Roche prosiga o adquiera tal oportunidad corporativa para sí misma, dirija tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad o no comunique la información referente, o no ofrezca tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.03. *Oportunidades Corporativas*. En caso que un director, funcionario o empleado de la Corporación que también es director, funcionario o empleado de Roche, tenga conocimiento de una transacción potencial o material que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (si tal transacción potencial o material es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación), tal director, funcionario o empleado tendrá el privilegio de ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o a Roche, según tal director, funcionario o

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Esta copia es fotocopia del original
30 JUL 2009
JUANITA JALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO

empleado, lo juzgue apropiado bajo las circunstancias y a su entera discreción; y ningún director, funcionario o empleado, será responsable ante la Corporación o ante sus Accionistas por la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta de actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por causa del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado, ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de la Corporación) o no comunicó la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para sí mismo o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas*. Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 8.

SECCIÓN 8.05. *Definiciones*. Para los propósitos de este Artículo 8 y Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" significará la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas, asociaciones y otras entidades en las cuales la Corporación posea beneficiosamente (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones votantes en circulación, poder de voto o intereses de votación similares, y (ii) el término "**Roche**" significará Roche Holdings, Inc. y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas , asociaciones y otras entidades (diferentes de la

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Esta copia coincide con el original que tuvo a la vista
Bogotá, D.C. 30 JUL 2009
JUAN CARLOS LALINDE ORTEGA

Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta Sección 8.05) que son las "**afiliadas**" (como se definió en la Norma 12b-2 bajo las Leyes de la Bolsa de Valores (Securities Exchange) de 1934, (según enmienda) de Roche Holdings. Inc.

SECCIÓN 8.06. *Terminación: Efecto Vinculante.* No obstante algo al contrario en este Certificado de Incorporación, las disposiciones anteriores de este Artículo 8 expirarán en la fecha cuando Roche deje de poseer Acciones Ordinarias que representen por lo menos el 5% del número de acciones circulantes de Acciones Ordinarias de la Corporación y ninguna persona que siendo director o funcionario de la Corporación, sea también director o funcionario de Roche. Tampoco tal expiración, ni la modificación, corrección, cambio o derogación, de cualquier provisión de este Artículo 8, tampoco la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación Enmendado y Reformulado, inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 8, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 8, se acumulara o surgiera, antes de tal expiración, modificación, corrección, revocación o adopción.

SECCIÓN 8.07. *Artículo 9.* Las disposiciones de este Artículo 8 son adiciones a las disposiciones del Artículo 9.

**ARTÍCULO 9**

SECCIÓN 9.01. *Acuerdos no Invalidados.* Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o terminación de ellos) entre

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Esta copia coincide con el original que tuvo a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUL 2009
JUANITA LA
NOTARIA CUARENTA Y

la Corporación y Roche será inválido, nulo o anulable, solamente por la razón que Roche es una de las partes de ellos o solamente porque algunos directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados con Roche, están presentes en o participan en la asamblea de la Junta Directiva o comité de los mismos, lo cual autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, corrección, modificación o terminación, o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito; pero tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o terminación de los mismos) se regirá por las disposiciones de estos Estatutos de la Corporación Modificados y Reformulados, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y alguna otra ley aplicable. Para los propósitos de este Artículo 9, las expresiones la "**Corporación**" y "**Roche**" tienen los significados manifestados en la Sección 8.05.

SECCIÓN 9.02. *Quórum*. Los Directores de la Corporación que también son directores o funcionarios de Roche pueden ser contabilizados en la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba algún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo). Las Acciones Circulantes Ordinarias poseídas por Roche pueden contabilizarse para la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de accionistas que autoriza o aprueba cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo).




ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

SECCIÓN 9.03 - *Ninguna Responsabilidad Por Actividades de Buena Fe.* Roche ni cualquier funcionario o director será responsable ante la Corporación o ante los accionistas para la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta para actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por el hecho de que Roche o algún funcionario o director del mismo, emprende cualquier acción o ejerce algunos derechos o entrega o retiene de buena fe cualquier aprobación en relación con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto sufragado u otra acción tomada por alguna persona que es director, funcionario u otro representante de Roche, cuyo voto es sufragado o tal persona emprende una acción en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho por o un consentimiento de Roche para los efectos de algún acuerdo o contrato.

SECCIÓN 9.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas.* Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 9.

SECCIÓN 9.05 - *Contratos Protegidos.* Para los propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o con cualquier corporación, sociedad, empresa conjunta, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posea beneficios (directa o indirectamente) del cincuenta por ciento o más de la acciones votantes en circulación, poder de

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Esta copia corresponde con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUL 2009

voto o intereses de votación similares, se juzgará ser un contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación.

SECCIÓN 9.06. *Efecto Vinculante.* Ni la modificación, corrección, cambio o derogación de cualquier provisión de este Artículo 9, tampoco la adopción de cualquier provisión inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 9, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 9, se acumulara o surgiera, antes de tal alteración, modificación, cambio, revocación o adopción.

SECCIÓN 9.07. *Artículo 8.* Las disposiciones de este Artículo 9 son en adición a las disposiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado, habiendo sido debidamente adoptado de acuerdo con las Secciones 242 y 245 de la Ley Corporativa General dèl Estado de Delaware y por el consentimiento escrito del único accionista de la Corporación de acuerdo con la Sección 228 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, ha sido otorgado este día veintidós (22) de Julio, 1999.

**GENENTECH, INC.**
Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título; Vicepresidente Senior.
Asesor General y Secretario.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



*Traducción Oficial Nº 10-31-194*

*Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.*

## APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

## CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265284**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUL 2009

**N. del T.**: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

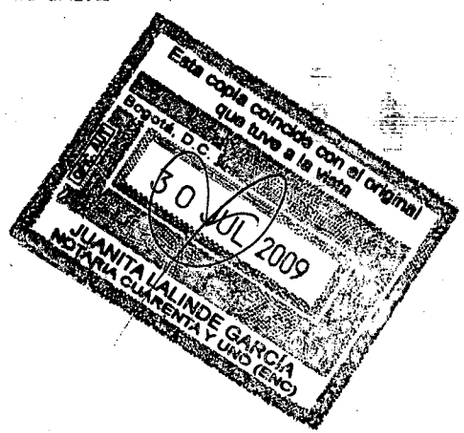
174488

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10 59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



**DELAWARE**

**EL PRIMER ESTADO**

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO DE MODIFICACION DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA QUINCE (15) DE MAYO DEL AÑO 2000, A LAS 5:00 P.M.

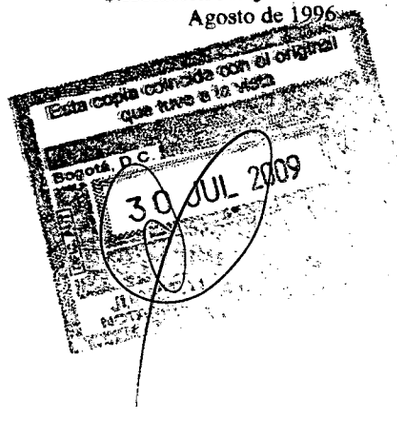
Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212781 FECHA: 10-07-05

**N. del T.** Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary´s Office, Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



ESTADO DE DELAWARE
SECRETARIA DE ESTADO
DIVISIÓN DE CORPORACIONES
ARCHIVADO 05:00 PM 05/15/2000
001245251 – 2112549

# CERTIFICADO DE MODIFICACION DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de setecientos millones

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C. 30 JUL 2009
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (ENC.)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

(700.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, su Funcionario Autorizado, este día quince (15) de Mayo, año 2000.

**GENENTECH, INC.**

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUL 2009
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (E.S.)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

*Traducción Oficial Nº 10-31-195*

*Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.*

## APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

## CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265285**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
30 JUL 2009

**N. del T.**: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174484

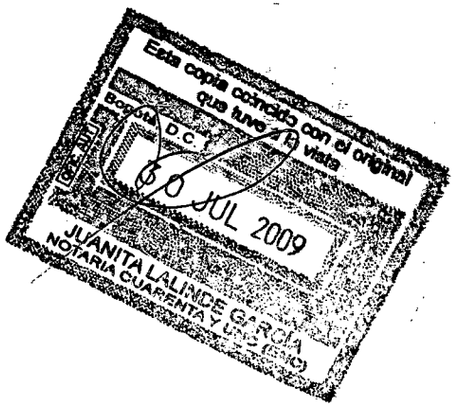
Ilbar Espand

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



**DELAWARE**

**EL PRIMER ESTADO**

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ (10) DE MAYO DEL AÑO 2001, A LAS 2:05 P.M.

Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212782 FECHA: 10-07-05

**N. del T.** Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUL 2009
JUANITA ORLINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (41)

ESTADO DE DELAWARE
SECRETARIA DE ESTADO
DIVISIÓN DE CORPORACIONES
ARCHIVADO 02:05 PM 05/10/2001
010226224 – 2112549

# CERTIFICADO DE MODIFICACION DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario*. (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de mil trescientos millones

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C. La
30 JUL 2009
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO

(1.300.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Un mil doscientos millones (1.200.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día diez (10) de Mayo, año 2001.

**GENENTECH, INC.**

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
30 DIC 2009
JUANITA LALINDE
NOTARIA CUARENTA

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

*Traducción Oficial Nº 10-31-196*

*Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.*

## APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

## CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265286**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

**N. del T.**: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

Esta copia corresponde con el original que tuvo a la vista
Bogotá, D.C. 30 JUL 2009
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

174490

2005 OCT 31 A 11:00

Ilbar Español

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Esta copia coincide con el original que tuvo a la vista

30 JUL 2009

JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (E.N.O.)

**DELAWARE**

**EL PRIMER ESTADO**

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ Y SEIS (16) DE ABRIL DEL AÑO 2004, A LAS 7:39 P.M.

Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212783 FECHA: 10-07-05

**N. del T.** Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary´s Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



ESTADO DE DELAWARE
SECRETARIA DE ESTADO
DIVISIÓN DE CORPORACIONES
ARCHIVADO 07:39 PM 04/16/2004
040281669 – 2112549

# CERTIFICADO DE TERCERA MODIFICACION DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario*. (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de tres mil cien millones

Esta copia coincide con el original que tuvo a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUL 2009
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO (E.P.)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

(3.100.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3.000.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día diez y seis (16) de Abril, año 2004.

**GENENTECH, INC.**

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

Esta copia corresponde con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
30 JUL 2009
JUANITA LALINDE GARCIA
NOTARIA CUARENTA Y UNO

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

# State of California

## SECRETARY OF STATE

# *APOSTILLE*

*(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)*

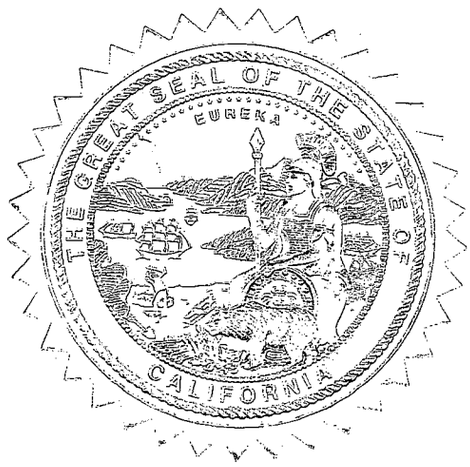
1. *Country: United States of America*
   *This public document*
2. *has been signed by TERI LEE*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of TERI LEE, Notary Public, State of California*

## *CERTIFIED*

5. *At Sacramento, California*
6. *the 3rd day of October 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 258054*
9. *Seal/Stamp:*




10. *Signature*







Secretary of State

NP-24 A (REV. 4-05)

BY

OSP 05 90772

191

## CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo } ss.

On 9/13/2005 (Date) before me, Teri Lee, Notary Public (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.

Signature of Notary Public

TERI LEE
Commission # 1514234
Notary Public - California
San Mateo County
My Comm. Expires Sep 18, 2008

### 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: Colombia Power

Document Date: 9/13/2005 Number of Pages: 1

Signer(s) Other Than Named Above: None

### 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: _____

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

Esta copia corresponde con el original que tuve a la vista
Bogotá D.C.
30 JUL 2009

© 1999 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 • www.nationalnotary.org Prod. No. 5907 Reorder: Call Toll-Free 1-800-876-6827

Los abajo firmados,

GENENTECH, INC.
Una sociedad organizada y existente bajo las leyes del Estado de Delaware Estados Unidos de America.

con domicilio en

1 DNA way
South San Francisco, CA 94080, USA

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

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

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

Dado y firmado a los 13 dias de Sep. 2005

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Section Patent Counsel
Genentech, Inc.
Authorized Corporate Signatory

The undersigned,

Genentech, Inc
A Corporate organized and existing under the laws od State of Delaware
domiciled at 1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, USA

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

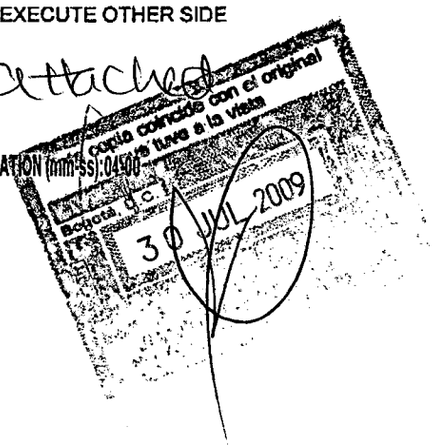
Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property,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

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

Given and signed this 13 Sept 2005

NOTA RY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

See attached



(2)

# 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

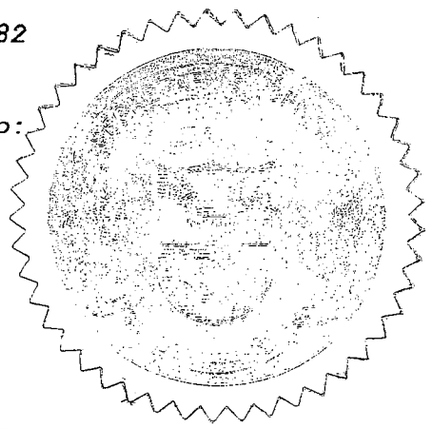
5. *at Dover, Delaware*

6. *the seventh day of October, A.D. 2005*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0265282*

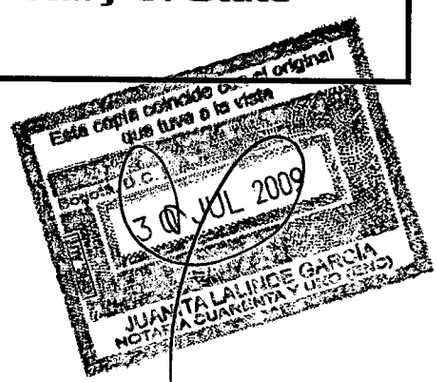
9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature:*

Harriet Smith Windsor

Secretary of State




192

# Delaware



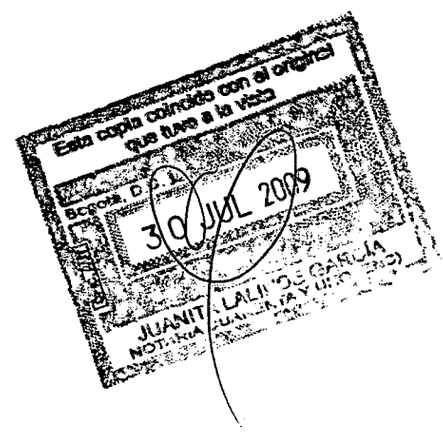
*The First State*

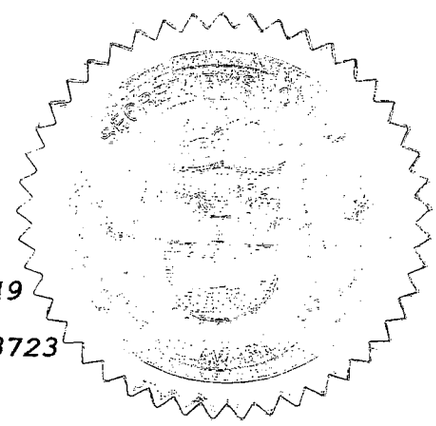
I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "GENENTECH, INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE SEVENTH DAY OF OCTOBER, A.D. 2005.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE SAID "GENENTECH, INC." WAS INCORPORATED ON THE TWENTY-THIRD DAY OF DECEMBER, A.D. 1986.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE ANNUAL REPORTS HAVE BEEN FILED TO DATE.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE FRANCHISE TAXES HAVE BEEN PAID TO DATE.



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212779

DATE: 10-07-05

(3)

# 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

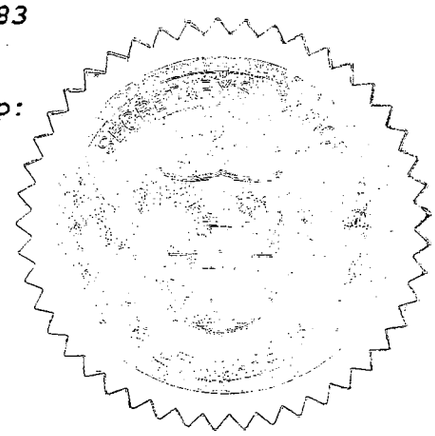
5. *at Dover, Delaware*

6. *the seventh day of October, A.D. 2005*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0265283*

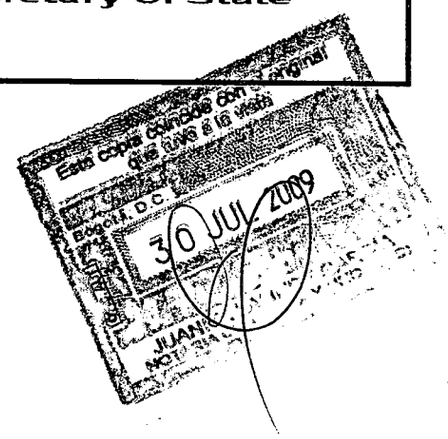
9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature:*

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



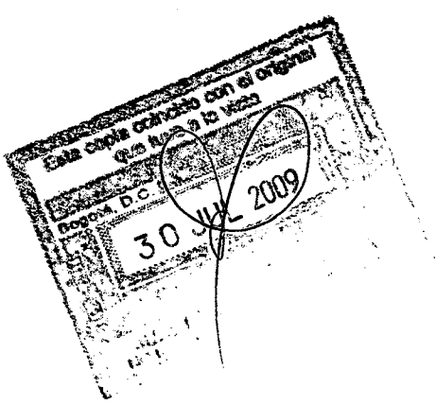

193

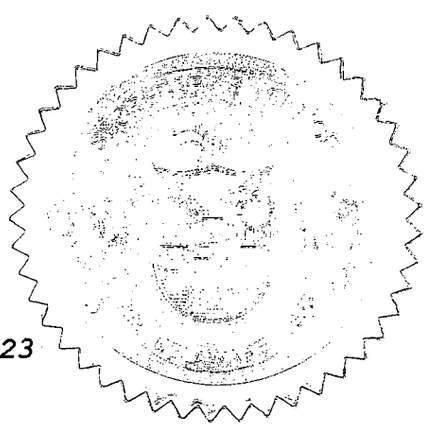
# Delaware



*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.



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212780

DATE: 10-07-05

AMENDED AND RESTATED

CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "**Corporation**"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

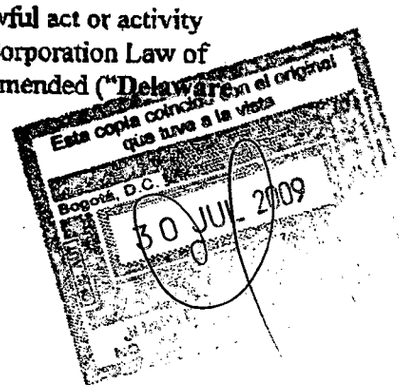
The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("**Delaware Law**").




*STATE OF DELAWARE*
*SECRETARY OF STATE*
*DIVISION OF CORPORATIONS*
*FILED 09:00 AM 07/22/1999*
*991302331 - 2112549*

ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("**Preferred Stock**"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("**Common Stock**") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

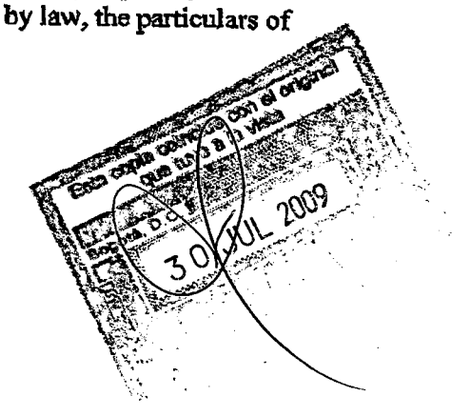
SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of





the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

(i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;

(ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;

(iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;

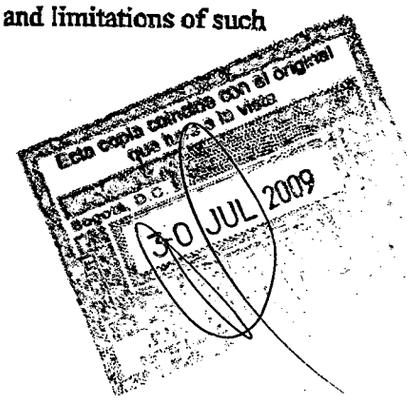
(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;

(vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;

(vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and

(viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.



## ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

## ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUL 2009
JUANITA LA
NOTARIA

divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

SECTION 6.02. *Ballots*. Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

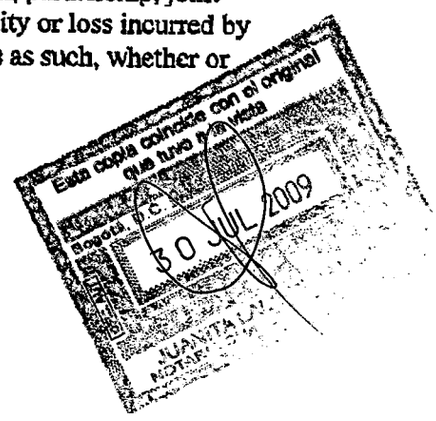
SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors*. (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or





not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

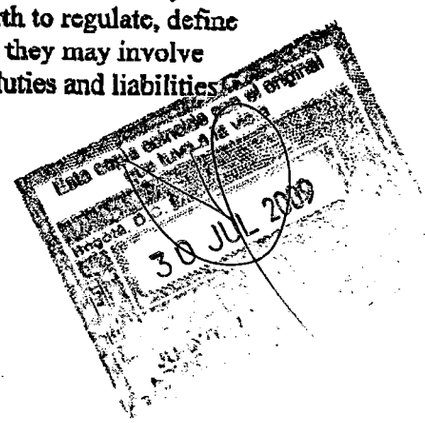
(f) Neither the alteration, amendment, repeal or recission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, recission, adoption or modification.

## ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

## ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities



of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

SECTION 8.02. *Similar Business Activities*. Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities*. In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.

Esta copia corresponde con el original que tuvo a la vista
Bogotá, D.C.
30 JUL 2009
JUANITA LA
NOTARIA CU

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

Esta copia coincide con el original que tuvo a la vista
Bogotá D.C.
30 JUL 2009
JUANITA
NOTARIA



51

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.

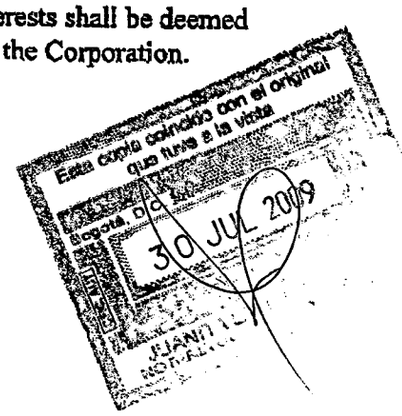
SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, 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 of 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.

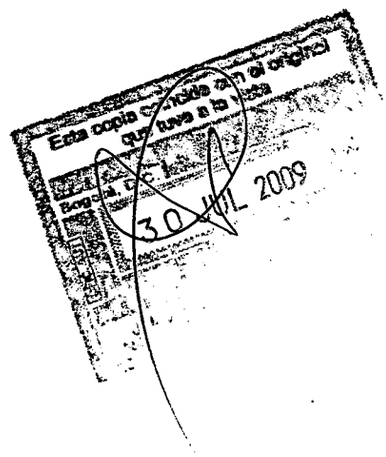
SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or 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.





SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.



IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary






54

(4)

# 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

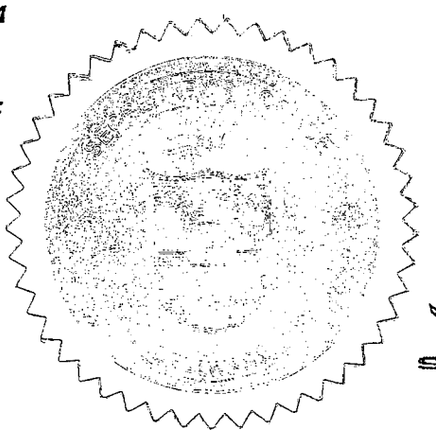
5. *at Dover, Delaware*

6. *the seventh day of October, A.D. 2005*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0265284*

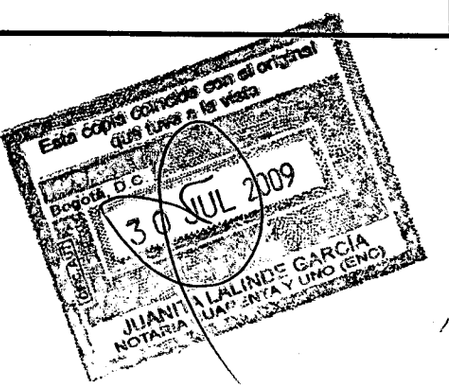
9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature:*

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



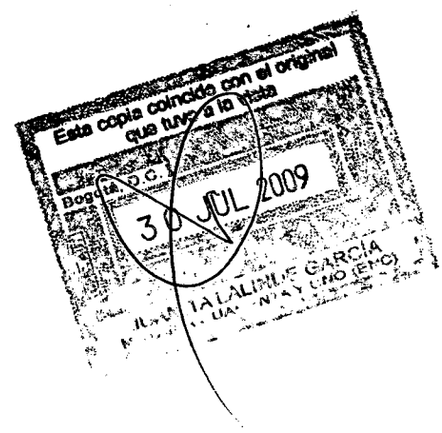

194

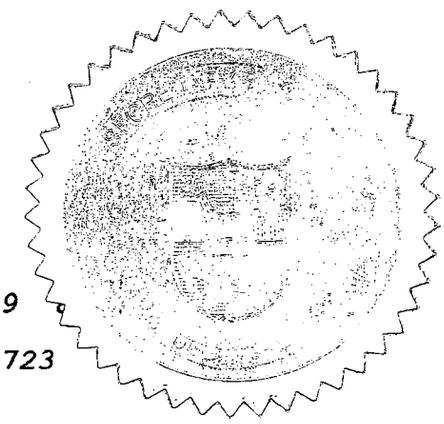
# Delaware



*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.



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212781

DATE: 10-07-05

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 05:00 PM 05/15/2000
001245251 - 2112549

# CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

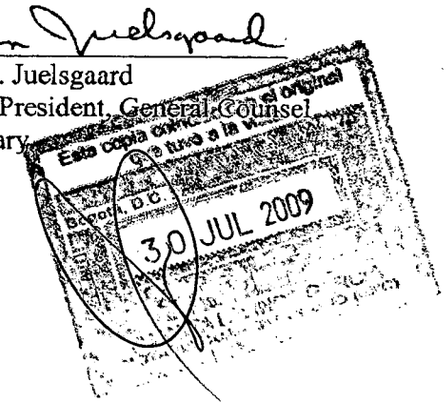
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary




75841

57

(5)

# 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

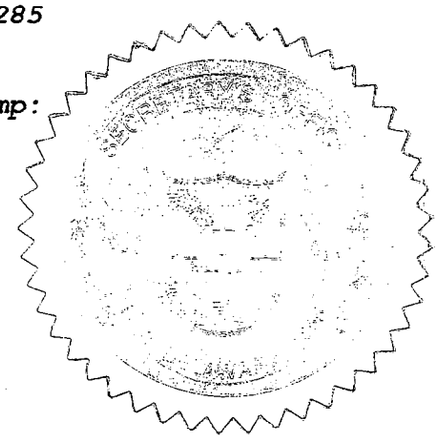
5. *at Dover, Delaware*

6. *the seventh day of October, A.D. 2005*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0265285*

9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature:*

Harriet Smith Windsor

Secretary of State




195

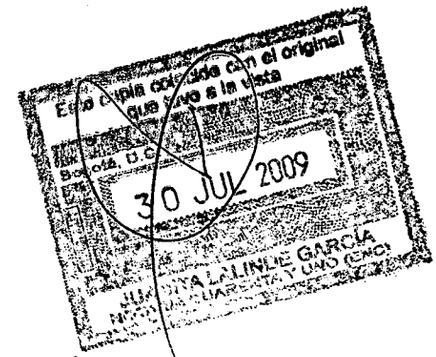
SB

# Delaware



*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.






Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212782

DATE: 10-07-05

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 02:05 PM 05/10/2001
010226224 – 2112549

S ////STATE/OF/DELAWARE///// V
T ///SECRETARY/OF/STATE///// O
A DIVISION/OF/CORPORATIONS// I
M FILED/02/00/PM/05/10/2001/ D
P ///010226224/+/2112549////
BY Sandy Miller

# 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.

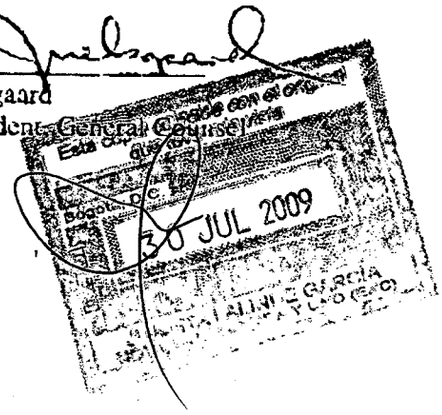
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

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

(6)

# 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

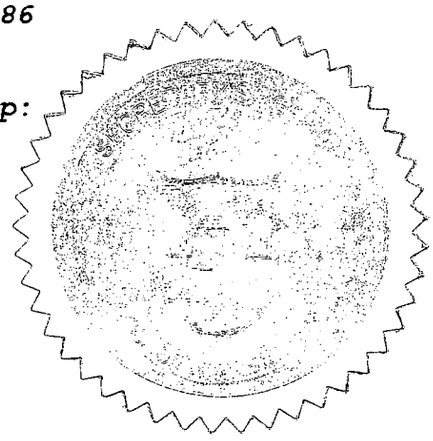
5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265286

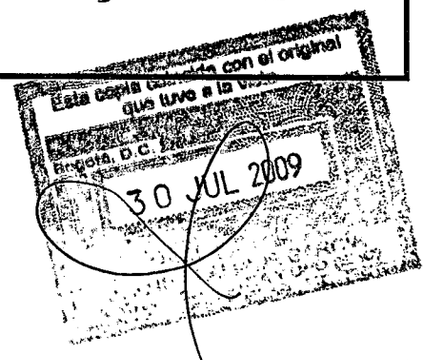
9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



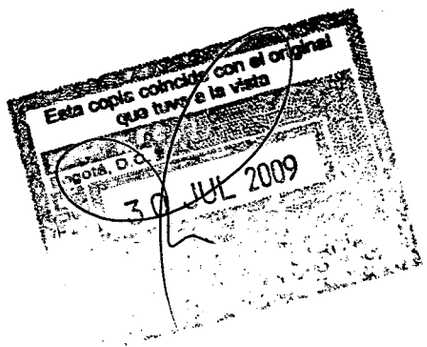

196

# Delaware



*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.






Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212783

DATE: 10-07-05

State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 07:44 PM 04/16/2004
FILED 07:39 PM 04/16/2004
SRV 040281669 - 2112549 FILE

# CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: _____

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel and Secretary

#153087

Esta copia coincide con el original que se le ha exhibido
Washington, D.C.
30 JUL 2009

TRADUCCION OFICIAL No.

de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

---

Traducción de la apostilla en inglés que se encuentra a continuación de la legalización de las firmas de los señores Klausner y Strebel, representantes legales de F. Hoffmann-La Roche, que aparecen en un documento de Poder, escrito en español e inglés, conferido a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el notario Peter Kuster, bajo el No. 2004/20, el 17-08-2004, en Basilea, Suiza.

---

AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza
   Este documento público
2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster
3. Actuando en calidad de notario público
4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5. en Basel (Basilea) 6. el 18 de agosto 2004
7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt
8. bajo el No 8835/13376
9. Sello 10. Firma
   Cancillería de Estado Fdo.: firma ilegible
   de la ciudad de Basel (Basilea) Ruedi Eggs

---

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 2 de septiembre 2004

Esta copia coincide con el que tuve a la vista
1 JUN 2005
ALIRIO VIRVIESCAS CALIXTO
NOTARIO CUARENTA Y UNO (41) DE BOGOTA

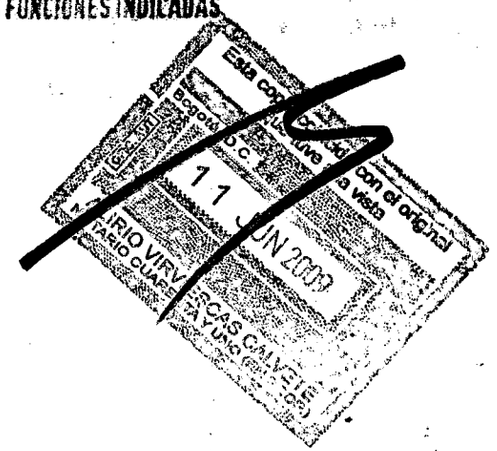
María Mercedes Uricoechea T.
Traductora Juramentada
Resolución 10607/81 Minjusticia

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

258651
María Uricoechea
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET -3 P 12:12
MCS
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



Los abajo firmados, **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza.

con domicilio en **4070 Basilea, Suiza**

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

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

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

Dado y firmado

The undersigned, **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG**, a corporation organized and existing under the laws of Switzerland.

domiciled at **4070 Basel, Switzerland**

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

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

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

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista
Bogotá, D.C.
11 JUN 2009
NOTARIA VIRVIESCAS CALLE
ALICIA VIRVIESCAS CUARENTA Y UNO

Given and signed this 17th day of August 2006.

F. Hoffmann-La Roche AG

Fridolin Klausner
Holder of procuration

Denise Strebel
Mandatory

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

**Suiza**
**Basilea** {ss

Hoy 17 de Agosto de 2004, compareció Fridolin Klausner y Denise Strebel ambos ciudadanos y residentes suizos a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es titular del poder/mandatario de **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG**, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de **Suiza**, domiciliada en la ciudad de **Basilea**, **Suiza**, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de **Suiza**; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en **Suiza**, ciudad de **Basilea**, con fecha 19 Junio 1997. y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

**Switzerland**
**Basel** {ss

On this 17th day of August , 2004 , personally came Fridolin Klausner and Denise Strebel both Swiss citizens and Swiss residents, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of Procuration/Mandatory of **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG**, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the **Switzerland**, domiciled at the City of **Basel**, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of **Switzerland**; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at **Suiza**, ciudad de **Basel**, under date of 19th day of June 1997 , and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Basel, this 17-08-2004 (seventeenth day of ... two thousand and four)

17.08.2004
2 Fr.
DR. PETER KUSTER

Allg. Prot. — No. 20

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel

Esta copia concuerda con la que tuve a la D.C. 11 JUN 2010 ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE NOTARIO CUARENTA Y UNO (E.N. PROP.)

OFFICIAL AUTHENTICATION

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by ..... Dr. iur. P. Knuchel .....

3. in his/her function as ..... alt-Notar .....

4. and certified by the seal of the ..... Gerichte .....

Certified

5. in Basel (Bâle) 6. on 18. Aug. 2004

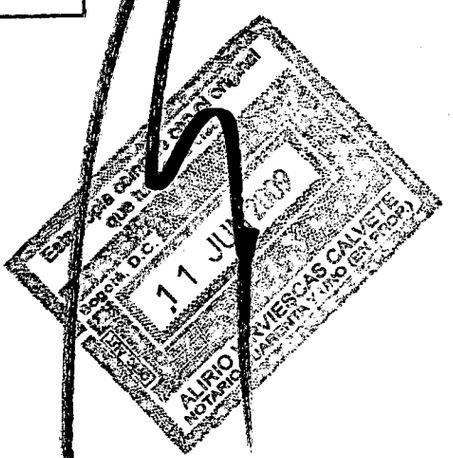
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt .....

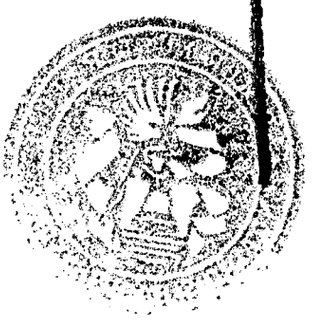
8. No. 3835 / 10 376

9. Seal/stamp: STATE CHANCERY BASLE-CITY

10. Signature: .....

Rudolf Egge



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

# SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
## DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
### EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
### SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 30-07-09

(30) Prioridad

| (31) *No. Prioridad* | (32) *Fecha* | (33) *País* |
|---|---|---|
| 60/892,640 | 02-03-07 | US |
| 60/912,053 | 16-04-07 | US |
| 61/029,748 | 19-02-08 | US |

(51) Int Cl: G01N 33/574

(71) Solicitante(s) **GENENTECH, INC. y F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**

(72) Inventor(es) AMLER, Lukas, C.; BIRKNER, Merrill; LIN, Chin-Yu; MOECKS, Joachim; STRAUSS, Andreas.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 02-10-09

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: **29/02/08**
No. de solicitud ***PCT/US2008/055502***

(87) Publicación internacional
Fecha: **12/09/08**
N° publicación: ***WO 2008/109440 A3***

(54) Titulo: **"PREDICCIÓN DE RESPUESTA A UN INHIBIDOR DE DIMERIZACIÓN HER BASADO EN EXPRESIÓN DE HER3 BAJO"**

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1:

Un método para tratar un paciente con un tipo de cáncer, caracterizado porque es capaz de responder a un inhibidor de dimerización HER, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de dimerización HER al paciente, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor que el nivel mediano para expresión HER3 en el tipo de cáncer.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**
**DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**
**TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS**

PATENTE DE INVENCION ____ PCT _X_ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL __

(21) N° de solicitud:
(22) Fecha de solicitud: 30-07-09
(51) Clasificación Internacional : G01N 33/574

(71) Solicitante(s) **GENENTECH, INC. y F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**

(72) Inventor(es) AMLER, Lukas, C.; BIRKNER, Merrill; LIN, Chin-Yu; MOECKS, Joachim; STRAUSS, Andreas.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

| (30) Prioridad | (31) *No. Prioridad* | 32) *Fecha* | (33) *País* |
|---|---|---|---|
| | **60/892,640** | **02-03-07** | **US** |
| | **60/912,053** | **16-04-07** | **US** |
| | **61/029,748** | **19-02-08** | **US** |

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 02-10-09
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: **29-02-08**
No. De solicitud ***PCT/US2008/055502***

(87) Publicación internacional
Fecha: **12-09-08**
N° publicación: ***WO 2008/109440 A3***

(54) Titulo: : **"PREDICCIÓN DE RESPUESTA A UN INHIBIDOR DE DIMERIZACIÓN HER BASADO EN EXPRESIÓN DE HER3 BAJO"**

68

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**
**DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**
**TARJETA ARCHIVO TEMATICO**

PATENTE DE INVENCION ____ PCT _X__ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 30-07-09
(51) Clasificación Internacional : G01N 33/574

(71) Solicitante(s) **GENENTECH, INC. y F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**

(72) Inventor(es) AMLER, Lukas, C.; BIRKNER, Merrill; LIN, Chin-Yu; MOECKS, Joachim; STRAUSS, Andreas.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad

| (31) *No. Prioridad* | (32) *Fecha* | (33) *País* |
|---|---|---|
| **60/892,640** | **02-03-07** | **US** |
| **60/912,053** | **16-04-07** | **US** |
| **61/029,748** | **19-02-08** | **US** |

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 02-10-09
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 29-02-08
No. de solicitud ***PCT/US2008/055502***

(87) Publicación internacional:
Fecha: 12-09-08
No. Publicación : **WO 2008/109440 A3**

**FIGURA CARACTERISTICA**
**6 x 6 cm**

(54) Titulo: **"PREDICCIÓN DE RESPUESTA A UN INHIBIDOR DE DIMERIZACIÓN HER BASADO EN EXPRESIÓN DE HER3 BAJO"**

(57) Resumen:
Reivindicación número 1:
Un método para tratar un paciente con un tipo de cáncer, caracterizado porque es capaz de responder a un inhibidor de dimerización HER, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de dimerización HER al paciente, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor que el nivel mediano para expresión HER3 en el tipo de cáncer.

# PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
GOODWIN PROCTER LLP
Attn. Dreger, Ginger, R.
135 Commonwealth Drive
Menlo Park CA 94025
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

# PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

| | |
|---|---|
| Applicant's or agent's file reference<br>GNE-0300.PC | Date of mailing *(day/month/year)*<br>24/02/2009<br>**FOR FURTHER ACTION** See paragraphs 1 and 4 below |
| International application No.<br>PCT/US2008/055502 | International filing date *(day/month/year)*<br>29/02/2008 |
| Applicant<br>GENENTECH, INC. | |

1. [x] 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 46):

   **When?** The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

   **Where?** Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Fascimile No.: (41-22) 338.82.70

   **For more detailed instructions,** see the notes on the accompanying sheet.

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 90*bis*.1 and 90*bis*.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 | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL-2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Julia Severin |

Form PCT/ISA/220 (October 2005) *(See notes on accompanying sheet)*

## 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 296).

**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.**

## NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped),whether

(i) the claim is unchanged;

(ii) the claim is cancelled;

(iii) the claim is new;

(iv) the claim replaces one or more claims as filed;

(v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

**The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:**

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."

2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."

3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."

4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1–10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

**"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)**

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

**It must be in the language in which the international application is to be published.**

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

**Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed**

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement ) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion 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 (Rule 43*bis*.1(c)).

**Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase**

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

# PATENT COOPERATION TREATY

# PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

| Applicant's or agent's file reference | **FOR FURTHER ACTION** | see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below. |
|---|---|---|
| GNE-0300.PC | | |
| International application No. | International filing date *(day/month/year)* | (Earliest) Priority Date *(day/month/year)* |
| PCT/US2008/055502 | 29/02/2008 | 02/03/2007 |
| 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 7 sheets.

[X] 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:

[X] 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. [ ] This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [X] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [X] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**

[ ] the text is approved as submitted by the applicant

[X] the text has been established by this Authority to read as follows:

PREDICTING RESPONSE TO A HER DIMERISATION INHIBITOR BASED ON LOW HER3 EXPRESSION

5. With regard to the **abstract,**

[X] 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. 6

[ ] as suggested by the applicant

[X] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

[ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/055502

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   [X] contained in the international application as filed

   [X] filed together with the international application in electronic form

   [ ] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/055502

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/574 C12Q1/68 A61K39/395

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)
G01N C12Q A61K

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, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A<br><br>X | US 2004/106161 A1 (BOSSENMAIER BIRGIT [DE] ET AL) 3 June 2004 (2004-06-03)<br>the whole document<br>paragraph [0015] - paragraph [0016] | 1-52,<br>54-59<br><br>60-109,<br>111-113 |
| A | TANNER BERNO ET AL: "ErbB-3 predicts survival in ovarian cancer."<br>JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY : OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY 10 SEP 2006,<br>vol. 24, no. 26,<br>10 September 2006 (2006-09-10), pages 4317-4323, XP002492089<br>ISSN: 1527-7755<br>figure 2 | |

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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.

"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 17 February 2009 | 24/02/2009 |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Chakravarty, Ashok |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/055502

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | GORDON MICHAEL S ET AL: "Clinical activity of pertuzumab (rhuMAb 2C4), a HER dimerization inhibitor, in advanced ovarian cancer: potential predictive relationship with tumor HER2 activation status." JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY : OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY 10 SEP 2006, vol. 24, no. 26, 10 September 2006 (2006-09-10), pages 4324-4332, XP002492090 ISSN: 1527-7755 the whole document | |
| A | WO 2007/019899 A (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; MOECKS JOACHIM [DE]; STRAUSS ANDREAS [DE]; ZUG) 22 February 2007 (2007-02-22) | |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/055502

**Box No. 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. [X] Claims Nos.: 53, 110
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Rule 39.1(iii) PCT - Scheme, rules and method for doing business

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 No. 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. [X] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers 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 and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[X] No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-59

Methods in which low HER3 expression is prognostic of increased efficacy of treatment. Methods in which low HER3 expression is prognostic of increased efficacy of treatment.

---

2. claims: 60-113

Methods where high HER2:HER3 expression is prognostic of increased efficacy of treatment.

---

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/055502

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| US 2004106161 A1 | 03-06-2004 | NONE | |
| WO 2007019899 A | 22-02-2007 | AR 057323 A1 | 28-11-2007 |
| | | AU 2006281746 A1 | 22-02-2007 |
| | | CA 2616913 A1 | 22-02-2007 |
| | | KR 20080034922 A | 22-04-2008 |
| | | NO 20080371 B | 09-05-2008 |
| | | US 2007037228 A1 | 15-02-2007 |

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
12 September 2008 (12.09.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/109440 A3

(51) International Patent Classification:
*G01N 33/574* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
*C12Q 1/68* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/055502

(22) International Filing Date:
29 February 2008 (29.02.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

| | | |
|---|---|---|
| 60/892,640 | 2 March 2007 (02.03.2007) | US |
| 60/912,053 | 16 April 2007 (16.04.2007) | US |
| 61/029,748 | 19 February 2008 (19.02.2008) | US |


(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **GENENTECH, INC.** [US/US]; 1 Dna Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **F.HOFFMAN-LA ROCHE, AG** [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4002 Basel (CH). **AMLER, Lukas, C.** [DE/US]; 845 Grenada Lane, Foster City, CA 94404 (US). **BIRKNER, Merrill** [US/US]; 160 Brannan Street, Apt. 404, San Francisco, CA 94107 (US). **LIN, Chin-Yu** [—/US]; 300 Baltic Circle, Unit 322, Redwood City, CA 94065 (US). **MOECKS, Joachim** [DE/DE]; Max-Joseph-Strasse 9, 68167 Mannheim (DE). **STRAUSS, Andreas** [DE/DE]; Ruhe Am Bach 5B, 82377 Penzberg (DE).

(74) Agents: **DREGER, Ginger, R.** et al.; Goodwin Procter LLP, 135 Commonwealth Drive, Menlo Park, CA 94025 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*[Continued on next page]*

(54) Title: PREDICTING RESPONSE TO A HER DIMERISATION INHIBITOR BASED ON LOW HER3 EXPRESSION

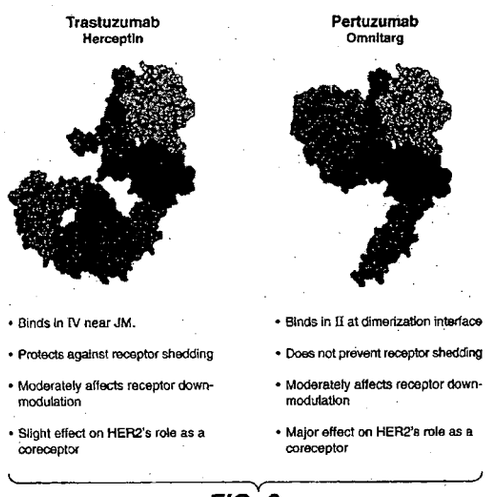



FIG. 6

(57) Abstract: The present application describes the use of low HER3 as a selection criterion for treating patients with a HER inhibitor, such as pertuzumab. It also describes the use of high HER2:HER3 ratio as a selection criterion for treating cancer patients, such as ovarian cancer patients, with a HER inhibitor, such as pertuzumab. In addition, the application describes the use of high HER3 as a selection criterion for treating cancer patients with a chemotherapeutic agent, for instance gemcitabine.

WO 2008/109440 A3

**Published:**

— *with international search report*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

**(88) Date of publication of the international search report:**
23 April 2009

# CORRECTED VERSION

From the INTERNATIONAL BUREAU

# PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

DREGER, Ginger, R.
Goodwin Procter LLP
135 Commonwealth Drive
Menlo Park, CA 94025
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
29 June 2009 (29.06.2009)

Applicant's or agent's file reference
GNE-0300.PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2008/055502

International filing date *(day/month/year)*
29 February 2008 (29.02.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

| Name and Address | State of Nationality | State of Residence |
|---|---|---|
| | | |
| | Telephone No. | |
| | Facsimile No. | |
| | E-mail address | |

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

| Name and Address | State of Nationality | State of Residence |
|---|---|---|
| F.HOFFMAN-LA ROCHE, AG<br>Grenzacherstrasse 124<br>CH-4002 Basel<br>Switzerland | CH | CH |
| | Telephone No. | |
| | Facsimile No. | |
| | E-mail address<br>☐ Notifications by e-mail authorized | |

3. Further observations, if necessary:
Corrected version of Form PCT/IB/306 dated 09 June 2009.
Please note that the status of the person indicated in box 2 has been changed from applicant/inventor for the United States of America only to applicant only for all designated States except the United States of America.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 87 40

Authorized officer
Carrié Christine
e-mail pt01.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 01



82

From the INTERNATIONAL BUREAU

# PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

DREGER, Ginger, R.
Goodwin Procter LLP
135 Commonwealth Drive
Menlo Park, CA 94025
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

| | |
|---|---|
| Date of mailing *(day/month/year)*<br>15 June 2009 (15.06.2009) | |
| Applicant's or agent's file reference<br>GNE-0300.PC | IMPORTANT NOTIFICATION |
| International application No.<br>PCT/US2008/055502 | International filing date *(day/month/year)*<br>29 February 2008 (29.02.2008) |

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

| Name and Address | State of Nationality | State of Residence |
|---|---|---|
| F.HOFFMAN-LA ROCHE, AG<br>Grenzacherstrasse 124<br>CH-4002 Basel<br>Switzerland | CH | CH |
| | Telephone No. | |
| | Facsimile No. | |
| | E-mail address | |

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

| Name and Address | State of Nationality | State of Residence |
|---|---|---|
| F.HOFFMAN-LA ROCHE, AG<br>Grenzacherstrasse 124<br>CH-4070 Basel<br>Switzerland | CH | CH |
| | Telephone No. | |
| | Facsimile No. | |
| | E-mail address<br>☐ Notifications by e-mail authorized | |

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

| | |
|---|---|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland<br><br>Facsimile No. +41 22 338 87 40 | Authorized officer<br>Sanvincenti Guido<br>e-mail pt01.pct@wipo.int<br>Telephone No. +41 22 338 74 01 |

From the INTERNATIONAL BUREAU

# PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

DREGER, Ginger, R.
Goodwin Procter LLP
135 Commonwealth Drive
Menlo Park, CA 94025
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

| | |
|---|---|
| Date of mailing *(day/month/year)*<br>15 June 2009 (15.06.2009) | |
| Applicant's or agent's file reference<br>GNE-0300.PC | IMPORTANT NOTIFICATION |
| International application No.<br>PCT/US2008/055502 | International filing date *(day/month/year)*<br>29 February 2008 (29.02.2008) |

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
STRAUSS, Andreas
Ruhe Am Bach 5B
82377 Penzberg
Germany

State of Nationality: DE
State of Residence: DE
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
STRAUSS, Andreas
Falkenstrasse 9
82377 Penzberg
Germany

State of Nationality: DE
State of Residence: DE
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 87 40

Authorized officer
Sanvincenti Guido
e-mail pt01.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 01

# PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

# PCT

## WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43*bis*.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. | International filing date *(day/month/year)* | Priority date *(day/month/year)* |
|---|---|---|
| PCT/US2008/055502 | 29.02.2008 | 02.03.2007 |

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. G01N33/574 C12Q1/68 A61K39/395

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 43*bis*.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 notifed the International Bureau under Rule 66.1*bis*(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: | Date of completion of this opinion | Authorized Officer |
|---|---|---|
| European Patent Office<br>D-80298 Munich<br>Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d<br>Fax: +49 89 2399 - 4465 | see form PCT/ISA/210 | Chakravarty, Ashok<br>Telephone No. +49 89 2399-8536 |



BS

**WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2008/055502

**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. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))

3. 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.

4. ☐ 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.

5. Additional comments:

**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 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

| | | | |
|---|---|---|---|
| Novelty (N) | Yes: | Claims | 1-50,54-59, 60-107,111-113 |
| | No: | Claims | 51,52,108,109 |
| Inventive step (IS) | Yes: | Claims | 1-50,54-59 |
| | No: | Claims | 51,52,60-109,111-113 |
| Industrial applicability (IA) | Yes: | Claims | 1-52,54-59,60-109,111-113 |
| | No: | Claims | |

2. Citations and explanations

**see separate sheet**

**Box No. VIII Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet



BB

Re Item III

**Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

Claims 53 and 110 are directed to methods of doing business and are therefore excluded from examination according to the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT.

Re Item IV

**Lack of unity of invention**

Claims 1-59: Methods in which low HER3 expression is prognostic of increased efficacy of treatment.

Claims 60-113: Methods where high HER2:HER3 expression is prognostic of increased efficacy of treatment.

The above two groups lack unity *a priori* because they provide separate and unrelated solutions to the problem of identifying patient groups with an increased likelihood of responding to pertuzumab.

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

The present application is based on the findings reported in the examples:

Example 1 reports the results of a phase III clinical trial of pertuzumab in combination with gemcitabine in ovarian cancer, primary peritoneal carcinoma and fallopian tube carcinoma.

It is concluded that pertuzumab activity is greatest in patients with HER3 low expressing cancer and tends to increase as HER3 gene expression level decreases. Pertuzumab activity is also greatest in patients with high HER2:HER3 expressing cancer and tends to increase as HER2:HER3 gene expression level increases.

HER3 expression may be prognostic on the background of chemotherapy with high expressing tumours doing better.

Example 2 reports the results of a phase II clinical trial of ovarian cancer patients. It is found that patients with low HER3 expression treated with pertuzumab displayed better outcomes in terms of PFS and OS.

Example 3 reports results from Phase II clinical study in which efficacy and safety of pertuzumab treatment in combination with carboplatin-based standard chemotherapy

was investigated in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. The results of this trial further confirm that pertuzumab activity is greatest in patients with HER3 low expressing cancer and tends to increase as HER3 gene expression level decreases. Pertuzumab activity is also greatest in patients with high HER2:HER3 expressing cancer and tends to increase as HER2:HER3 gene expression level increases.

Example 4 concludes that low tumour HER3 gene expression levels can be used prognostic indicators in patients with CDDP-R EOC. Pertuzumab treatment may add to gemeitabine's clinical activity in patients whose tumours have low HER3 gene expression and that HER3 mRNA expression levels may be used as a prognostic and predictive diagnostic biomarker.

**The prior art**

Tanner et al (D1) disclose that low HER3 expression is correlated with increased median survival time (Fig. 2).

Gordon et al (D2) report clinical activity of pertuzumab in advanced ovarian cancer and a potential predictive relationship with tumour HER2 activation status.

US2004/0106161 (D3) discloses method of identifying tumours responsive to anti-HER2 Ab therapy (e.g. pertuzumab) by identifying HER2/HER3 complexes in a tumour sample.

**For Group 1**

None of the above prior art identifies low HER3 expression as indicative of better outcomes of pertuzumab treatment. Thus, the subject-matter of present claims 1-50, 54-59 is both novel and inventive.

Claims 51 attempts to confer novelty on known products (e.g. pertuzumab) by inclusion of a particular label (instructions) . Such a label (instructions) is not regarded as a technical feature of the product and is therefore disregarded in assessment of novelty. The claim relates to known subject-matter incl. pertuzumab. This reasoning applies mutatis mutandis to the subject-matter of claim 52.

**For Group 2**

US2004/0106161 (D3) paragraph [0015] discloses a method of identifying a tumour that is responsive to treatment with an anti-HER2 antibody, (preferably 2C4; pertuzumab). This method comprises assaying for the presence of a HER2/HER3 amongst others in the [patient] sample. A tumour is identified as responsive to treatment with the anti-HER2 antibody when a complex is detected.
D3 does not disclose determining in which percentile the patient's HER2:HER3 ratio is in comparison with the overall patient population in the cancer type.
Thus, claims 60-107, 111-113 are novel over the closest prior art.
However, since D3 already disclosed a link between HER2/HER3 and responsiveness to anti-HER2 antibody treatment, in particular treatment with pertuzumab, the skilled person would inevitably be led to determine the HER2:HER3 ratio in comparison with the overall patient population in the cancer type and would therefore come to the claimed subject-matter in an obvious manner.
The subject-matter of claims 60-107, 111-113 lacks inventive step.

Claims 108 and 109 lack novelty. The claims attempt to confer novelty on known products (e.g. pertuzumab) by inclusion of a particular label (instructions) . Such a label (instructions) is not regarded as a technical feature of the product and is therefore disregarded in assessment of novelty. The claims relate to known subject-matter incl. pertuzumab.

**Re Item VIII**

**Certain observations on the international application**

**Sufficiency of disclosure and support in the description - Arts 5 and 6 PCT.**

It can be seen from the description that the claims are intended to reflect the data presented in the examples
The PCT Guidelines, C-5, 5.43, state that "the scope of the claims must not be broader than is justified by the extent of the description" and Section 5.52 states that "an appropriate claim is one which is not so broad that it goes beyond the invention nor yet so narrow as to deprive the applicant of a just reward for the disclosure of the invention."

In the present case the examples are concerned with particular named cancers, and particular defined drugs and combinations thereof. In these special circumstances the prognostic and/or predictive value has been demonstrated for low HER3 expression,

and for high HER2/HER3 ratios.

The claims are not similarly limited and thus do not meet the requirements of Arts. 5 and 6 PCT. In the field of biomarkers and cancer it is well established that major differences exist between cancer types, and also between different particular drugs.

**Clarity - Art. 6 PCT**

Claim 1 is drafted to a method of treating patient, but it is clear from the application as a whole that the essence of the invention lies not in providing a new treatment but in identifying a group of patients who have a better chance of responding to pertuzumab therapy. Thus, the choice of "method of treating" as the purpose of the claim is not correct. This objection applies equally to claim 60.
A more correct formulation can be found in claims 50, 54, 107 and 111.

Claim 1 defines the biologically active compounds to be used solely in functional terms, i.e. as a "dimerisation inhibitor". In this instance, such a formulation is not clear because it is possible to define the subject-matter in more concrete terms, viz. in structural terms, at minimum including specific classes of active agents.
Claim 1 also makes reference to levels of HER3 expression "less" than the median. This is unclear in the absence of a quantitative indication of how much "less" is intended, e.g. as in claim 2.
The above objections apply equally to any occurrence of the above mentioned expressions.

**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. 53

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 53 relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

**see separate sheet**

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

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

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ 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 13*ter*.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

# PREDICCIÓN DE RESPUESTA A UN INHIBIDOR DE DIMERIZACIÓN HER BASADO EN EXPRESIÓN DE HER3 BAJO

## RESUMEN - OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al uso de HER3 bajo como un criterio de selección para tratar pacientes con un inhibidor de HER, tal como pertuzumab.

También se describe el uso de la relación HER2:HER3 alta como un criterio de selección para tratar pacientes con cáncer, tal como pacientes con cáncer de ovario, con un inhibidor de HER, tal como pertuzumab.

Además, la solicitud describe el uso de HER3 alto como un criterio de selección para tratar pacientes con cáncer con un agente quimioterapéutico, por ejemplo, gemcitabina.

# PREDICCIÓN DE RESPUESTA A UN INHIBIDOR DE DIMERIZACIÓN HER BASADO EN EXPRESIÓN DE HER3 BAJO

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al uso de HER3 bajo como un criterio de selección para tratar pacientes con cáncer, tal como pacientes con cáncer de ovario, con un inhibidor HER, tal como pertuzumab.

También, la invención se refiere al uso de una relación alta HER2:HER3 como un criterio de selección para tratar pacientes con cáncer, tal como pacientes con cáncer de ovario, con un inhibidor HER, tal como pertuzumab.

Además, la invención se refiere al uso de HER3 alto como un criterio de selección para tratar pacientes con cáncer con un agente quimioterapéutico, por ejemplo, gemcitabina.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

### Receptores Her y Anticuerpos en contra

La familia HER del receptor de tirosinas cinasas son mediadores importantes del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. La familia del receptor incluye cuatro miembros distintos que incluyen, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1, o HER1), HER2 (ErbB2 o $p185^{neu}$), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2).

El EGFR, codificado por el gen *erb*B1, ha sido causalmente implicado en malignidades humanas. En particular, la expresión incrementada de EGFR ha sido observada en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y estómago, así como también glioblastomas. La expresión incrementada del receptor EGFR es a menudo asociada con la producción incrementada del ligando EGFR, factor alfa de crecimiento de transformación (TGF-α), por las mismas células tumorales que resultan en la activación del receptor por una trayectoria estimulatoria autócrina. Baselga and Mendelsohn *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFR o sus ligandos, TGF-α y EGF, han sido evaluados como agentes terapéuticos en el tratamiento de tales malignidades. Véase por ejemplo, Baselga and Mendelsohn., *supra*; Masui *et al.* *Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); y Wu *et al.* *J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995).

El segundo miembro de la familia HER, $p185^{neu}$, fue originalmente identificado como el producto del gen de transformación de neuroblastomas de ratas químicamente tratadas. La forma activada del proto-oncogen *neu*, resulta de una mutación de punto (valina a ácido glutámico) en la región de la transmembrana de la proteína codificada. La amplificación del homólogo humano de *neu* se observa en cánceres de ovario y mama y se correlaciona con una escasa prognosis (Slamon *et al.*, *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon

*et al.*, *Science*, 244:707-712 (1989); y Patente Estadounidense No. 4,968,603). A la fecha, ninguna mutación de punto análoga a aquella en el proto-oncogen *neu* ha sido reportada para tumores humanos. La sobreexpresión de HER2 (frecuentemente pero no uniformemente debido a la amplificación de gen), también ha sido observada en otros carcinomas que incluyen carcinomas del estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas y vejiga. Véase entre otros, King *et al.*, *Science*, 229:974 (1985); Yokota *et al.*, *Lancet*: 1:765-767 (1986); Fukushige *et al.*, *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Guerin *et al.*, *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen *et al.*, *Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura *et al.*, *Cancer Res.*, 51:1034 (1991); Borst *et al.*, *Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990); Weiner *et al.*, *Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern *et al.*, *Cancer Res.*, 50:5184 (1990); Park *et al.*, *Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau *et al.*, *Mol. Carcinog.*, 3:254-257 (1990); Aasland *et al. Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988); Williams *et al. Pathobiology* 59:46-52 (1991); y McCann *et al.*, *Cancer*, 65:88-92 (1990). El HER2 puede ser sobreexpresado en cáncer de próstata (Gu *et al. Cancer Lett.* 99:185-9 (1996); Ross *et al. Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997); Ross *et al. Cancer* 79:2162-70 (1997); y Sadasivan *et al. J. Urol.* 150:126-31 (1993)).

Los anticuerpos dirigidos contra el $p185^{neu}$ de rata y productos de proteína HER2 humana, han sido descritos.

Véase por ejemplo, Drebin *et al.*, *Cell* 41:695-706 (1985); Myers *et al.*, *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991); y el documento WO94/22478. Drebin *et al. Oncogene* 2:273-277 (1988), reporta que las mezclas de anticuerpos reactivos con dos regiones distintas de $p185^{neu}$, resultan en los efectos anti-tumorales sinergísticos en células NIH-3T3 *neu*-transformadas implantadas en ratones puros. Véase también, Patente Estadounidense 5,824,311 publicada el 20 de Octubre de 1998.

Hudziak *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989), describe la generación de un panel de anticuerpos HER2 los cuales son caracterizados usando la línea de células tumorales de mama humana SK-BR-3. La proliferación de células relativas de las células SK-BR-3 después de la exposición a anticuerpos, se determinó por teñido de violeta cristal de las monocapas después de 72 horas. Usando este ensayo, se obtuvo inhibición máxima con el anticuerpo llamado 4D5, el cual inhibe la proliferación celular por 56%. Otros anticuerpos en el panel reducen la proliferación celular a una magnitud menor en este ensayo. El anticuerpo 4D5 fue además, encontrado por sensibilizar las líneas de células tumorales de mama que sobre expresan HER2 a los efectos citotóxicos de TNF-α. Véase también Patente Estadounidense No. 5,677,171 publicada el 14 de Octubre de 1997. Los anticuerpos HER2 discutidos en Hudziak *et al.*, son además caracterizados en Fendly *et al. Cancer Research* 50:1550-1558

(1990); Kotts *et al. In Vitro* 26(3):59A (1990); Sarup *et al. Growth Regulation* 1:72-82 (1991); Shepard *et al. J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127 (1991); Kumar *et al. Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986 (1991); Lewis *et al. Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras *et al. Oncogene* 9:1829-1838 (1994); Vitetta *et al. Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski *et al. J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994); Scott *et al. J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991); D'souza *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994); Lewis *et al. Cancer Research* 56:1457-1465 (1996); y Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394 (1997).

Una versión humanizada recombinante del anticuerpo HER2 de murina 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, trastuzumab o HERCEPTINA[7]; Patente Estadounidense No. 5,821,337), es clínicamente activa en pacientes con cánceres de mama metastásicos que sobreexpresan HER2 que han recibido terapia anti-cancerígena anterior extensiva (Baselga *et al., J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996)). El trastuzumab recibió aprobación comercial a partir de la Administración de Alimentos y Fármacos el 25 de Septiembre de 1998, para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores que sobreexpresan la proteína HER2.

Otros anticuerpos HER2 con varias propiedades han sido descritos en Tagliabue *et al. Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991); McKenzie *et al. Oncogene* 4:543-548 (1989); Maier *et*

*al. Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991); Bacus *et al. Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990); Stancovski *et al. PNAS (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); Patente Estadounidense 5,783,186; y Klapper *et al. Oncogene* 14:2099-2109 (1997).

La selección de homología ha resultado en la identificación de dos de otros miembros de la familia del receptor HER; HER3 (Patentes Estadounidenses Nos. 5,183,884 y 5,480,968 así como también Kraus *et al. PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)) y HER4 (Sol. De patente EP No. 599,274; Plowman *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); y Plowman *et al., Nature*, 366:473-475 (1993)). Ambos de estos receptores exhiben expresión incrementada en al menos, algunas de las líneas de células de cáncer de mama.

Los receptores HER son en general, encontrados en varias combinaciones en células y la heterodimerización se piensa, incrementa la diversidad de la respuesta celular a una variedad de ligandos HER (Earp *et al. Breast Cancer Research and Treatment* 35: 115-132 (1995)). El EGFR está unido por seis diferentes ligandos; factor de crecimiento

epidermal (EGF), factor alfa de crecimiento de transformación (TGF-α), amfiregulina, factor de crecimiento epidérmico de enlace a heparina (HB-EGF), betacelulina y epiregulina (Groenen *et al. Growth Factors* 11:235-257 (1994)). Una familia de proteínas heregulina que resulta de empalme alternativo de un gen único son ligandos para HER3 y HER4. La familia heregulina incluye heregulinas alfa, beta y gamma (Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205-1210 (1992); Patente Estadounidense No. 5,641,869; y Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394 (1997)); factores de diferenciación neu (NDF), factores de crecimiento glial (GGF); receptor de acetilcolina que induce actividad (ARIA); y factor derivado de neurona motor y sensorial (SMDF). Para una revisión, véase Groenen *et al. Growth Factors* 11:235-257 (1994); Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247-262 (1996) y Lee *et al. Pharm. Rev.* 47:51-85 (1995). Recientemente, se identificaron tres ligandos HER adicionales; neuregulina-2 (NRG-2), el cual se reportó por enlazarse a ya sea HER3 o HER4 (Chang *et al. Nature* 387 509-512 (1997); y Carraway *et al Nature* 387:512-516 (1997)); y neuregulina-4 la cual se enlaza a HER4 (Harari *et al. Oncogene* 18:2681-89 (1999)) HB-EGF, betacelulina y epiregulina también se enlaza a HER4.

Mientras el EGF y TGFα no se enlazan a HER2, el EGF estimula a EGFR y HER2 para formar un heterodímero, el cual activa a EGFR y resulta en transfosforilación de HER2 en el

heterodímero. La dimerización y/o transfosforilación parece activar la tirosina cinasa HER2. Véase, Earp *et al.*, *supra*. Del mismo modo, cuando el HER3 es co-expresado con HER2, un complejo de señalización activa se forma y los anticuerpos dirigidos contra HER2 son capaces de romper este complejo (Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994)). Adicionalmente, la afinidad de HER3 para heregulina (HRG), se incrementa a una afinidad superior declarada cuando se co-expresa con HER2. Véase también, Levi *et al.*, *Journal of Neuroscience* 15: 1329-1340 (1995); Morrissey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1431-1435 (1995); y Lewis *et al.*, *Cancer Res.*, 56:1457-1465 (1996) con respecto al complejo de proteína HER2-HER3. El HER4, como el HER3, forma un complejo de señalización activa con HER2 (Carraway and Cantley, *Cell* 78:5-8 (1994)).

Las publicaciones de patentes relacionadas con anticuerpos de HER incluyen los documentos: US 5,677,171, US 5,720,937, US 5,720,954, US 5,725,856, US 5,770,195, US 5,772,997, US 6,165,464, US 6,387,371, US 6,399,063, US2002/0192211A1, US 6,015,567, US 6,333,169, US 4,968,603, US 5,821,337, US 6,054,297, US 6,407,213, US 6,719,971, US 6,800,738, US2004/0236078A1, US 5,648,237, US 6,267,958, US 6,685,940, US 6,821,515, WO98/17797, US 6,127,526, US 6,333,398, US 6,797,814, US 6,339,142, US 6,417,335, US 6,489,447, WO99/31140, US2003/0147884A1, US2003/0170234A1,

US2005/0002928A1, US 6,573,043, US2003/0152987A1, WO99/48527, US2002/0141993A1, WO01/00245, US2003/0086924, US2004/0013667A1, WO00/69460, WO01/00238, WO01/15730, US 6,627,196B1, US6,632,979B1, WO01/00244, US2002/0090662A1, WO01/89566, US2002/0064785, US2003/0134344, WO 04/24866, US2004/0082047, US2003/0175845A1, WO03/087131, US2003/0228663, WO2004/008099A2, US2004/0106161, WO2004/048525, US2004/0258685A1, US 5,985,553, US 5,747,261, US 4,935,341, US 5,401,638, US 5,604,107, WO 87/07646, WO 89/10412, WO 91/05264, EP 412,116 B1, EP 494,135 B1, US 5,824,311, EP 444,181 B1, EP 1,006,194 A2, US 2002/0155527A1, WO 91/02062, US 5,571,894, US 5,939,531, EP 502,812 B1, WO 93/03741, EP 554,441 B1, EP 656,367 A1, US 5,288,477, US 5,514,554, US 5,587,458, WO 93/12220, WO 93/16185, US 5,877,305, WO 93/21319, WO 93/21232, US 5,856,089, WO 94/22478, US 5,910,486, US 6,028,059, WO 96/07321, US 5,804,396, US 5,846,749, EP 711,565, WO 96/16673, US 5,783,404, US 5,977,322, US 6,512,097, WO 97/00271, US 6,270,765, US 6,395,272, US 5,837,243, WO 96/40789, US 5,783,186, US 6,458,356, WO 97/20858, WO 97/38731, US 6,214,388, US 5,925,519, WO 98/02463, US 5,922,845, WO 98/18489, WO 98/33914, US 5,994,071, WO 98/45479, US 6,358,682 B1, US 2003/0059790, WO 99/55367, WO 01/20033, US 2002/0076695 A1, WO 00/78347, WO 01/09187, WO 01/21192, WO 01/32155, WO 01/53354, WO 01/56604, WO 01/76630, WO02/05791,

WO 02/11677, US 6,582,919, US2002/0192652A1, US 2003/0211530A1, WO 02/44413, US 2002/0142328, US 6,602,670 B2, WO 02/45653, WO 02/055106, US 2003/0152572, US 2003/0165840, WO 02/087619, WO 03/006509, WO03/012072, WO 03/028638, US 2003/0068318, WO 03/041736, EP 1,357,132, US 2003/0202973, US 2004/0138160, US 5,705,157, US 6,123,939, EP 616,812 B1, US 2003/0103973, US 2003/0108545, US 6,403,630 B1, WO 00/61145, WO 00/61185, US 6,333,348 B1, WO 01/05425, WO 01/64246, US 2003/0022918, US 2002/0051785 A1, US 6,767,541, WO 01/76586, US 2003/0144252, WO 01/87336, US 2002/0031515 A1, WO 01/87334, WO 02/05791, WO 02/09754, US 2003/0157097, US 2002/0076408, WO 02/055106, WO 02/070008, WO 02/089842 y WO 03/86467.

**Diagnósticos**

Pacientes tratados con el anticuerpo HER2, el trastuzumab se seleccionó para terapia basado en la sobreexpresión/amplificación de HER2. Véase por ejemplo, los documentos WO99/31140 (Paton *et al.*), US2003/0170234A1 (Hellmann, S.), y US2003/0147884 (Paton *et al.*); así también como los documentos WO01/89566, US2002/0064785, y US2003/0134344 (Mass *et al.*). Véase también el documento US2003/0152987, Cohen *et al.*, que se refiere a la inmunohistoquímica (IHC) e hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) para detectar sobre expresión y

amplificación de HER2.

Los documentos WO2004/053497 y US2004/024815A1 (Bacus *et al.*), así como también el documento US 2003/0190689 (Crosby and Smith), se refieren a la determinación o predicción de respuesta a terapia de trastuzumab. El documento US2004/013297A1 (Bacus *et al.*), se refiere a la determinación o predicción de una respuesta a terapia de anticuerpo ABX0303 EGFR. El documento WO2004/000094 (Bacus *et al.*) se dirige a la determinación de respuestas a GW572016, una molécula pequeña, inhibidor de tirosina cinasa EGFR-HER2. El documento WO2004/063709, Amler *et al.*, se refiere a biomarcadores y métodos para determinar la sensibilidad al inhibidor EGFR, HCl de erlotinib. El documento US2004/0209290, Cobleigh *et al.*, se refiere a los marcadores de expresión para la predicción de cáncer de mama.

Pacientes tratados con pertuzumab pueden ser seleccionados para terapia basados en la activación de HER o dimerización. Las solicitudes de patente que se refieren a pertuzumab y selección de pacientes para terapia con esta incluyen: los documentos WO01/00245 (Adams *et al.*); US2003/0086924 (Sliwkowski, M.); US2004/0013667A1 (Sliwkowski, M.); así como también WO2004/008099A2, y US2004/0106161 (Bossenmaier *et al.*).

Cronin *et al. Am. J. Path.* 164(1): 35-42 (2004), describe medición de la expresión del gen en tejidos

archivados embebidos en parafina. Ma *et al. Cancer Cell* 5:607-616 (2004), describe el perfil del gen por microarreglos de oligonucleótidos de gen usando ARN aislado a partir de secciones de tejido de tumor tomadas de biopsias primarias archivadas.

El pertuzumab (también conocido como anticuerpo monoclonal humano recombinante 2C4; OMNITARG™, Genentech, In., San Francisco del Sur), representa la primera en una nueva clase de agentes conocidos como inhibidores de dimerización HER (HDI) y funciona para inhibir la capacidad de HER2 para formar heterodímeros activos con otros receptores HER (tal como EGFR/HER1, HER2 y HER4) y es activo irrespectivo de los niveles de expresión HER2. Véase por ejemplo, Harari and Yarden *Oncogene* 19:6102-14 (2000); Yarden and Sliwkowski. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-37 (2001); Sliwkowski *Nat Struct Biol* 10:158-9 (2003); Cho *et al. Nature* 421:756-60 (2003); y Malik *et al. Pro Am Soc Cancer Res* 44:176-7 (2003).

El bloqueo de pertuzumab de la formación de heterodímeros HER2-HER3 en células tumorales, ha sido demostrado por inhibir la señalización celular crítica, la cual resulta en proliferación tumoral reducida y supervivencia (Agus *et al. Cancer Cell* 2:127-37 (2002)).

El pertuzumab se ha sometido a pruebas como un agente único en la clínica con un ensayo fase Ia en pacientes

con cánceres avanzados y ensayos fase II en pacientes con cáncer de ovario y cáncer de mama, así como también cáncer de pulmón y próstata. En un estudio Fase I, pacientes con tumores sólidos recurrentes o metastásicos, localmente avanzados, incurables, que han progresado durante o después de terapia estándar, fueron tratados con pertuzumab dado intravenosamente cada 3 semanas. El pertuzumab fue en general, bien tolerado. La regresión del tumor se logró en 3 de 20 pacientes que fueron evaluados por respuesta. Dos pacientes han confirmado respuestas parciales. La enfermedad estable prolongada por más de 2.5 meses, se observó en 6 de 21 pacientes (Allison *et al. Pro Am Soc Clin Oncol* 22:192 (2003)). A dosis de 2.0-15 mg/kg, la farmacocinética de pertuzumab fue lineal, y la separación media varió desde 2.69 hasta 3.74 ml/día/kg y la vida media de eliminación terminal media varió desde 15.3 hasta 27.6 días. Los anticuerpos a pertuzumab no fueron detectados (Allison *et al. Pro Am Soc Clin Oncol* 22:197 (2003)).

Sergina *et al.*, reporta que el marcador biológico con el cual se valora la eficacia de inhibidores de tirosina cinasa de HER (TKIs), debe ser la transfosforilación de HER3 en lugar de la autofosforilación. Sergina *et al. Nature* 445(7126): 437-441 (2007).

Jazaeri *et al.*, evaluó perfiles de expresión de gen asociados con la respuesta a quimioterapia en cáncer de

ovario epitelial. Jazaeri *et al. Clin. Cancer Res.* 11(17): 6300-6310 (2005).

Tanner *et al.*, reporta que el HER3 predice la supervivencia en cáncer de ovario. Tanner *et al. J. Clin. Oncol.* 24(26):4317-4323 (2006).

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Esta solicitud se refiere al menos en parte, a la observación sorprendente de que pacientes con cáncer (por ejemplo, pacientes con cáncer de ovario), cuyo cáncer expresa HER3 a un nivel bajo, responden mejor en ensayos clínicos humanos a un inhibidor de dimerización HER que aquellos pacientes cuyo cáncer expresa HER3 a un nivel alto. En general, tales pacientes tienen una relación HER2:HER3 alta (debido al nivel bajo de HER3), así que la evaluación de los niveles relativos de tanto HER2 como HER3, proporciona un medio adicional o alternativo para seleccionar pacientes para terapia con un inhibidor de dimerización HER.

De este modo, la invención de este documento se refiere, en un primer aspecto, a un método para tratar un paciente con un tipo de cáncer el cual es capaz de responder a un inhibidor HER, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor HER al paciente, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel de menos que el nivel medio para expresión de HER3 en el tipo de

cáncer. Ejemplos de inhibidores HER contemplados incluyen, anticuerpos HER o inhibidores de molécula pequeña; anticuerpos HER2 o inhibidores de molécula pequeña; inhibidores de tirosina cinasa que incluyen pero no se limitan a lapatinib, Tykerb; etc. Más preferiblemente, el inhibidor HER es un inhibidor de dimerización HER. Por consiguiente, la invención proporciona un método para tratar un paciente con un tipo de cáncer, el cual es capaz de responder a un inhibidor de dimerización HER, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de dimerización HER al paciente, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor que el nivel medio para expresión HER3 en el tipo de cáncer.

De conformidad con esta realización, preferiblemente, el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel el cual es menor que el 25 por ciento para la expresión HER3 en el tipo de cáncer. Opcionalmente, tal cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel mayor del 25 por ciento, preferiblemente mayor que el nivel medio, y más preferiblemente, mayor que el 75 por ciento para la expresión HER2:HER3 en el tipo de cáncer. El ensayo preferido para medir la expresión HER3 (y HER2) comprende, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), más preferiblemente, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR).

Preferiblemente, el inhibidor de dimerización HER es un anticuerpo, más preferiblemente un inhibidor HER2 tal como pertuzumab.

Preferiblemente, el tipo de cáncer a ser tratado o pronosticado aquí, se selecciona del grupo que consiste de cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de trompas de falopio, cáncer de mama metastásico (MBC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de próstata y cáncer colorectal. Más preferiblemente, el tipo de cáncer tratado o diagnosticado en este documento, es cáncer de ovario, cáncer peritoneal, o cáncer de trompas de falopio. El tipo de cáncer puede ser resistente a quimioterapia, resistente a platino, avanzado, refractario, y/o recurrente. El método puede extender la supervivencia, incluyendo la supervivencia libre de progreso (PFS) y supervivencia total (OS) en el paciente.

El inhibidor HER puede ser administrado como un agente anti-tumoral único, o puede ser combinado con una o más de otras terapias. En una realización, el inhibidor HER es administrado con uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como gemcitabina, carboplatina, paclitaxel, docetaxel, topotecano y doxorubicina liposomal y preferiblemente, un antimetabolito, tal como gemcitabina. El inhibidor HER puede también ser combinado con trastuzumab, erlotinib o bevacizumab.

En un aspecto adicional, la invención pertenece a

un método para tratar un paciente con cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio que comprende, administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de pertuzumab al paciente, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor que el nivel medio para la expresión HER3 en cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio.

La invención de este documento, además se refiere a un método para seleccionar una terapia para un paciente con un tipo de cáncer el cual es capaz de responder a un inhibidor HER (por ejemplo, un inhibidor de dimerización HER), que comprende determinar la expresión HER3 en una muestra de cáncer del paciente y seleccionar un inhibidor HER (por ejemplo, un inhibidor de dimerización HER), como la terapia si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel menor que el nivel medio para la expresión HER3 en el tipo de cáncer.

Además, la invención proporciona un artículo de manufactura que comprende, empaquetado en conjunto, una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de dimerización HER en un portador farmacéuticamente aceptable y una etiqueta que dice que el inhibidor o composición farmacéutica está indicado para tratar un paciente con un tipo de cáncer el cual es capaz de responder a un inhibidor de dimerización HER, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor que el nivel mediano para la expresión

HER3 en el tipo de cáncer.

En un aspecto adicional, la invención pertenece a un método para manufacturar un inhibidor de dimerización HER o una composición farmacéutica del mismo que comprende, combinar en un paquete, el inhibidor o composición farmacéutica y una etiqueta que dice que el inhibidor o composición farmacéutica está indicada para tratar un paciente con un tipo de cáncer el cual es capaz de responder a un inhibidor de dimerización HER, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

En aún otra realización, la invención proporciona un método para publicitar un inhibidor de dimerización HER o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende, promover a una audiencia objetivo, el uso del inhibidor de dimerización HER o una composición farmacéutica del mismo, para tratar una población de paciente con un tipo de cáncer, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor que el nivel medio para la expresión HER3 en el tipo de cáncer.

Aparte de las invenciones anteriores, los datos clínicos humanos proporcionados aquí, demuestran que pacientes con cáncer (por ejemplo, pacientes con cáncer de ovario), cuyo cáncer expresa HER3 a un nivel alto, tienen una respuesta clínica mejor a un agente quimioterapéutico, tal

como gemcitabina, que aquellos pacientes cuyo cáncer expresa HER3 a un nivel bajo.

Respecto a este aspecto de la invención, la invención proporciona un método para seleccionar una terapia para un paciente con un tipo de cáncer, el cual probablemente responda a un agente quimioterapéutico que comprende determinar la expresión HER3 en una muestra de cáncer a partir del paciente, y seleccionar un agente quimioterapéutico como la terapia, si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel mayor que el nivel medio para la expresión HER3 en el tipo de cáncer. Preferiblemente, el tipo de cáncer es cáncer de ovario, peritoneal, o de trompas de falopio, que incluye, cáncer de ovario resistente a platino, peritoneal o de trompas de falopio, así como también cáncer de ovario, avanzado, refractario o recurrente. Preferiblemente, el agente quimioterapéutico seleccionado es un antimetabolito, tal como gemcitabina.

La invención también se refiere a un método para tratar un paciente con un tipo de cáncer, el cual es capaz de responder a un agente quimioterapéutico, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente quimioterapéutico al paciente, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel mayor que el nivel medio para la expresión HER3 en el tipo de cáncer. Preferiblemente, el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel el cual es

mayor que el 25 por ciento para la expresión HER3 en el tipo de cáncer. El ensayo preferido para medir la expresión de HER3 comprende la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), más preferiblemente, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR).

Preferiblemente, el agente quimioterapéutico es un antimetabolito, más preferiblemente, gemcitabina.

Preferiblemente, el tipo de cáncer a ser tratado o diagnosticado de conformidad con este aspecto adicional de la invención es cáncer de ovario, cáncer peritoneal, o cáncer de tipo de falopio. El tipo de cáncer puede ser resistente a quimioterapia, resistente a platino, avanzado, refractario y/o recurrente. El método puede extender la supervivencia, que incluye, supervivencia libre de progreso (PFS) y supervivencia total (OS) en el paciente.

En un aspecto adicional, la invención pertenece a un método para tratar un paciente con cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de gemcitabina al paciente, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel mayor que el nivel medio para la expresión HER3 en cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio.

La invención también proporciona un artículo para manufactura que comprende, empaquetado en conjunto, una composición farmacéutica que comprende un agente

quimioterapéutico (tal como gemcitabina) en un portador farmacéuticamente aceptable y una etiqueta que dice que el agente quimioterapéutico o composición farmacéutica, está indicado para tratar un paciente con un tipo de cáncer, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel mayor que el nivel medio para la expresión HER3 en el tipo de cáncer.

En aún un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para manufacturar un agente quimioterapéutico (tal como gemcitabina) o una composición farmacéutica del mismo, que comprende combinar en un paquete, el agente quimioterapéutico o composición farmacéutica y una etiqueta que dice que el agente quimioterapéutico o composición farmacéutica, está indicado para tratar un paciente con un tipo de cáncer, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel mayor que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

En aún otra realización, la invención proporciona un método para publicitar un agente quimioterapéutico o composición farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende promover a una audiencia objetivo, el uso del agente quimioterapéutico o composición farmacéutica del mismo para tratar una población del paciente con un tipo de cáncer, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel mayor que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de

cáncer.

La presente solicitud proporciona datos clínicos humanos que demuestran que paciente con expresión alta de HER2:HER3, responden más favorablemente a un inhibidor HER, tal como pertuzumab. De este modo, la invención proporciona en otro aspecto, un medio para seleccionar pacientes para evaluar niveles de expresión de HER2 y HER3, y excluir de la terapia, aquellos pacientes cuyo cáncer expresa HER2:HER3 a un nivel bajo.

De este modo, la invención también se refiere a un método para tratar un paciente con un tipo de cáncer el cual es capaz de responder a un inhibidor HER, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor HER al paciente, en donde el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 25 por ciento para la expresión de HER2:HER3 en el tipo de cáncer. Preferiblemente, el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el medio, y más preferiblemente, mayor que el 75 por ciento para expresión de HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

Además, se proporciona un método para tratar un paciente con cáncer de ovario, peritoneal o de tubo de falopio, en el cual, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de pertuzumab al paciente, en donde el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel

el cual es mayor que el 25 por ciento para la expresión HER2:HER3 en cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para seleccionar una terapia para un paciente con un tipo de cáncer el cual es capaz de responder a un inhibidor HER que comprende, determinar la expresión HER2 y HER3 en una muestra de cáncer a partir del paciente, y seleccionar un inhibidor HER como la terapia si la muestra de cáncer expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 25 por ciento para la expresión HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

También, la invención pertenece a un artículo de manufactura que comprende, empaquetar en conjunto, una composición farmacéutica que comprende, un inhibidor HER en un portador farmacéuticamente aceptable y una etiqueta que dice que el inhibidor o composición farmacéutica está indicado para tratar un paciente con un tipo de cáncer, el cual es capaz de responder a un inhibidor HER, en donde el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 25 por ciento para la expresión HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

Sin embargo, la invención proporciona un método para manufacturar un inhibidor HER o una composición farmacéutica del mismo, que comprende combinar en un paquete, el inhibidor o composición farmacéutica y una etiqueta que

dice que el inhibidor o composición farmacéutica está indicado para tratar un paciente con un tipo de cáncer, el cual es capaz de responder a un inhibidor HER, en donde el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 25 por ciento para expresión de HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

Además, la invención se refiere a un método para publicitar un inhibidor HER o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende promover a una audiencia objetivo, el uso del inhibidor HER o una composición farmacéutica del mismo para tratar una población del paciente con un tipo de cáncer, en donde el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 25 por ciento para la expresión de HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 proporciona un esquemático de la estructura de proteína HER2, y secuencias de aminoácido para los Dominios I-IV (SEC ID Nos. 19-22, respectivamente) del dominio extracelular del mismo.

Las Figuras 2A y 2B representan alineaciones de las secuencias de aminoácido de los dominios ligero variable ($V_L$) (Figura 2A) y pesado variable ($V_H$) (Figura 2B) del anticuerpo monoclonal murino 2C4 (SEC ID Nos. 1 y 2, respectivamente);

los dominios $V_L$ y $V_H$ de la variante 574/pertuzumab (SEC ID Nos. 3 y 4, respectivamente), y las estructuras consenso $V_L$ y $V_H$ (subgrupo I kappa ligero, κ1 humano; subgrupo pesado III, humIII) (SEC ID Nos. 5 y 6, respectivamente). Los asteriscos identifican diferencias entre los dominios variables de pertuzumab y anticuerpo monoclonal murina 2C4 o entre dominios variables de pertuzumab y la estructura humana. Las regiones que determinan la complementariedad (CDR), están en corchetes.

Las Figuras 3A y 3B muestran las secuencias de aminoácido de pertuzumab de cadena ligera (Fig. 3A; SEC ID NO. 13) y cadena pesada (Fig. 3B; SEC ID NO.14). Las CDR se muestran en negritas. La masa molecular calculada de la cadena ligera y cadena pesada son 23,526.22 Da y 49,216.56 Da (cisteínas en forma reducida). La porción de carbohidrato está unida a Asn 299 de la cadena pesada.

La Figura 4 representa, esquemáticamente, el enlace de 2C4 al sitio de enlace heterodimérico de HER2, con ello, previniendo la heterodimerización con EGFR o HER3 activado.

La Figura 5 representa el acoplamiento de HER2/HER3 a las trayectorias MAPK y Akt.

La Figura 6 compara varias actividades de trastuzumab y pertuzumab.

Las Figuras 7A y 7B muestran las secuencias de aminoácido de cadena ligera de trastuzumab (Fig. 7A; SEC ID

No. 15) y cadena pesada (Fig. 7B; SEC ID No. 16), respectivamente.

Las Figuras 8A y 8B representan una secuencia variante de cadena ligera de pertuzumab (Fig. 8A; SEC ID No. 17) y una secuencia variante de cadena pesada de pertuzumab (Fig. 8B; SEC ID No. 18), respectivamente.

La Figura 9 representa el diseño de estudio/esquemas para el ensayo clínico en el Ejemplo 1, que involucra pacientes con ovario resistente a platino, peritoneal primario o carcinoma de trompas de falopio, tratados con ya sea gemcitabina y placebo o gemcitabina y pertuzumab.

La Figura 10A representa la supervivencia libre de progreso (PFS) para todos los pacientes del estudio en el Ejemplo 1.

La Figura 10B es una versión actualizada de la Figura 10A. El PFS ha sido estimado usando el modelo Cox estratificado y pruebas mk grande estratificada por factores de estratificación por aleatorización (ECOG PS, número de regímenes previos para enfermedad resistente a platino y capacidad de medición de la enfermedad).

La Figura 11A representa PFS por estado pHER2 pronosticado.

La Figura 11B es una versión actualizada de la Figura 11A.

La Figura 12A representa PFS por valor de corte EGFR (HER1) en qRT-PCR.

La Figura 12B es otra representación por PFS por valor de corte EGFR (GER1) en wRT-PCR, también indicando el número de sujetos en los grupos HER1 (alto) y HER1 (bajo) a varios valores de corte EGFR.

La Figura 13A representa PFS por valores de corte HER2 en qRT-PCR.

La Figura 13B es otra representación de PFS por valores de corte HER2 en qRT-PCR, también indicando el número de sujetos en los grupos HER1 (alto) y HER1 (bajo) a varios valores de corte HER2.

La Figura 14A representa PFS por valores de corte HER3 en qRT-PCR.

La Figura 14B es otra representación de PFS por valores de corte HER3 en qRT-PCR, también indicando el número de sujetos en los grupos HER3 (alto) y HER3 (bajo) a varios valores de corte HER3.

La Figura 15A muestra PFS por subgrupos HER3. La actividad de pertuzumab es más grande en pacientes con tumores que expresan HER3 bajo y tiende a incrementar conforme se reduce el nivel de expresión del gen HER3.

La Figura 15B es otra representación de PFS por niveles de HER3 en qRT-PCR.

La Figura 16A demuestra el PFS por subgrupos HER3.

Los datos mostrados aquí, pueden ser una interacción negativa entre el pertuzumab y gemcitabina en pacientes con tumores que expresan HER3 alto.

La Figura 16B es otra representación de PFS por niveles de HER3 en qRT-PCR. Los datos además confirman que puede haber una interacción negativa entre pertuzumab y gemcitabina en pacientes con tumores que expresan HER3 alto.

La Figura 17A resume el PFS por subgrupos HER3; subgrupo de expresión HER3 alta, y subgrupo de expresión HER3 bajo.

La Figura 17B es una versión actualizada de PFS por niveles de HER3 en qRT-PCR mostrados en la Figura 17B.

La Figura 18A además demuestra el PFS por subgrupos HER3.

La Figura 18B es una versión actualizada de análisis de PFS por cuadrados de expresión de HER3, mostrado en la Figura 18A.

La Figura 19A muestra PFS por HER3 en qRT-PCR con una división 50/50; con expresión HER3 baja en menos de 50 por ciento y expresión HER3 alta mayor que o igual a 50 por ciento.

La Figura 19B es una versión actualizada de PFS por HER3 en qRT-PCR con una división 50/50, mostrada en la Figura 19A.

La Figura 20A muestra PFS por HER3 en qRT-PCR con

una división 25/75; con expresión HER3 baja en menos del 25 por ciento, y expresión HER3 alta mayor que o igual a 25 por ciento.

La Figura 20B es una versión actualizada de PFS por HER3 en qRT-PCR con una división 25'75, mostrada en la Figura 20A.

La Figura 21A muestra los datos preliminares para la supervivencia total (OS) en todos los pacientes. Los datos basados en 46/130 eventos.

La Figura 21B es un diagrama actualizado de datos OS, de pruebas aleatorias log estratificadas y modelo Cox estratificado estimadas por factores de estratificación por aleatorización (ECOG PS, número de regímenes previos para enfermedad resistente a platino, y capacidad de medición de la enfermedad).

La Figura 22A ilustra datos preliminares para OS por HER3 en qRT-PCR. Los datos se basan en 43/119 eventos.

La Figura 22B es un diagrama actualizado de datos OS por HER3 en qRT-PCR con una división 50/50, con expresión baja HER3 en menos de 50 por ciento, y expresión HER3 alta mayor de o igual a 25 por ciento.

La Figura 23A demuestra PFS por HER3 en qRT-PCR comparando relaciones peligrosas altas contra bajas (HR).

La Figura 23B es una gráfica de actualización de PFS por HER en qRT-PCR comparando relaciones peligrosas altas

contra bajas (HR).

La Figura 24A muestra la serie completa de datos para cáncer de ovario resistente a platino de pertuzumab en el Ejemplo 1 con PFS por HER3 en qRT-PCR. Nota: Los valores p de log-rango y HR, no son ajustados para comparación múltiple.

La Figura 24B es otra serie de datos para cáncer de ovario resistente a platino de pertuzumab con pFS por HER3 en q-RT-PCR. Solo como en la Figura 24A, los valores p de Log-rango y HER, no fueron ajustados por comparación múltiple.

La Figura 25 muestra PFS y OS por HER3 en qRT-PCR para pacientes tratados como en el Ejemplo 2 con pertuzumab de agente único. HER3 altos, fueron pacientes mayores que o iguales a 75 por ciento; pacientes en HER3 bajos fueron aquellos menores del 75 por ciento. La supervivencia media para pacientes que expresan bajo fue de 3.31 años (95% de CI, 1.93-4.69); la supervivencia media fue de 1.80 años para pacientes que expresan HER3 alto (95% CI, 0.83 a 2.78).

La Figura 26A muestra la relación normalizada calibrada de HER3; el intervalo de expresión es de aproximadamente 20-80 veces. Los CP están entre aproximadamente 23 y 30 para la mayoría de las muestras.

La Figura 26B es otra figura que muestra la relación normalizada calibrada de HER3; el intervalo de expresión es de aproximadamente 20-80 veces. Los CP están

entre aproximadamente 23 y 30 para la mayoría de las muestras.

La Figura 27 muestra el flujo de trabajo del ensayo de diagnóstico *in vitro* (IVD) de pertuzumab en qRT-PCR LIGHTCYCLER® 2.0.

La Figura 28 muestra el flujo de trabajo del ensayo IVD de pertuzumab y análisis con un mercador y referencia.

La Figura 29A proporciona PSF por porcentajes de HER2:HER3 para pacientes tratados en el Ejemplo 1.

La Figura 29B es otra figura que muestra PFS por porcentajes HER2:HER3 para pacientes tratados en el Ejemplo 1. Nota: Los valores p de log-intervalo y HR, no fueron ajustados por comparación múltiple.

La Figura 30A evalúa PFS por relación HER2:HER3 para el Ejemplo 1 usando manchados Kaplan Meyer específicamente para pacientes con relaciones HER2 a HER3 superiores que las media, o superiores que el 75 por ciento.

La Figura 30B es una actualización que muestra PFS por relación HER2:HER3 para el Ejemplo 1, usando manchados Kaplan Meyer, específicamente para pacientes con relaciones HER2 a HER3 superiores que la media, o superiores que el 75 por ciento.

La Figura 31A valora PFS por subgrupo de cuartos de relación HER2:HER3, nuevamente del Ejemplo 1.

La Figura 31B es otro sumario del análisis PFS por

cáncer de ovario recurrente de cuartos HER2/HER3.

La Figura 32 muestra trazos Kaplan-Meier para PFS por sujetos con cáncer de ovario que tienen niveles JER3 menores que la media e igual a o más de la media, respectivamente, tratados como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 33 muestra un trazo Kaplan-Meier de PFS para sujetos con cáncer de ovario, tratados con quimioterapia o pertuzumab en un grupo de paciente con niveles HER3 menores que la media e iguales a o más que la media, respectivamente.

La Figura 34 muestra trazos Kaplan-Meier de PFS para sujetos con cáncer de ovario, tratados con pertuzumab y quimioterapia o con pertuzumab solo, para relaciones HER2/HER3 por debajo de la media e iguales a o más que la media, respectivamente.

La Figura 35 muestra un trazo Kaplan-Meier de PFS para sujetos con cáncer de ovario, tratados con quimioterapia o pertuzumab, para relaciones HER2/HER3 por debajo de la media e iguales a o más que la media, respectivamente.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

### I. Definiciones

Un receptor HER es un receptor de la proteína tirosina cinasa, el cual pertenece a la familia del receptor HER e incluye receptores EGFR, HER2, HER3 y HER4. El receptor HER en general, comprenderá un dominio extracelular, el cual

puede enlazar un ligando HER y/o dimerizar con otra molécula receptora HER; un dominio de la transmembrana lipofílica; un dominio intracelular conservado de tirosina cinasa; y un dominio de señalización carboxil-terminal que alberga varios residuos de tirosina los cuales pueden ser fosforilados. El receptor HER puede ser un receptor HER de secuencia nativa o una variante de secuencia de aminoácido del mismo. Preferiblemente, el receptor HER es un receptor HER humano de secuencia nativa.

Los términos "ErbB1", "HER1", receptor del factor de crecimiento epidérmico y EGFR, son usados intercambiablemente en este documento y se refieren a EGFR como se describe, por ejemplo, en Carpenter *et al. Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987), que incluye formas mutantes que se originan naturalmente de los mismos (por ejemplo, un EGFR de mutante de supresión EGFR como en Humphrey *et al. PNAS (USA)* 87:4207-4211 (1990)). *erb*B1 se refiere al gen que codifica al producto de proteína de EGFR.

Las expresiones "ErbB2" y "HER2", son usados intercambiablemente en este documento y se refieren a la proteína HER2 humana descrita por ejemplo, en Semba *et al.*, *PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985) y Yamamoto *et al. Nature* 319:230-234 (1986) (Número de acceso a Genbank X03363). El término "*erb*B2" se refiere al gen que codifica el ErbB2 humano y "*neu*" se refiere al gen que codifica el $p185^{neu}$ de

rata. El HER2 preferido es la secuencia humana nativa de HER2.

En este documento, el "dominio extracelular de HER2" o "ECD de HER2", se refiere a un dominio de HER2 que está hacia afuera de una célula, ya sea anclado a una membrana celular, o en circulación, que incluyen fragmentos de los mismos. En una realización, el dominio extracelular de HER2 puede comprender cuatro dominios: "Dominio 1" (residuos de aminoácido desde aproximadamente 1-195; SEC ID NO:19), "Dominio II" (residuos de aminoácido desde aproximadamente 196-319; SEC ID NO:20), "Dominio III" (residuos de aminoácido desde aproximadamente 320-488: SEC ID NO:21), y "Dominio IV" (residuos de aminoácido desde aproximadamente 489-630; SEC ID NO:22) (numeración de residuo sin péptido señal). Véase, Garrett *et al. Mol. Cell.*. 11: 495-505 (2003), Cho *et al. Nature* 421: 756-760 (2003), Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004), y Plowman *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1746-1750 (1993), así como también la Figura 1 en este documento.

"ErbB3" y "HER3", se refieren al receptor de polipéptido como se describe por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,183,884 y 5,480,968 así como también Kraus *et al. PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989).

Los términos "ErbB4" y "HER3" de este documento, se refieren al receptor de polipéptido como se describe por

ejemplo, en el documento de Patente EP No. 599,274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); y Plowman *et al.*, *Nature*, 366:473-475 (1993), que incluye isoformas de los mismos, por ejemplo, como se describe en el documento WO99/19488, publicado el 22 de Abril de 1999.

Por "ligando HER", significa un polipéptido el cual se enlaza a y/o activa a un receptor HER. El ligando HER de interés particular en este documento, es un ligando HER humano de secuencia nativa tal como el factor de crecimiento epidermal (RGF) (Savage *et al.*, *J. Biol. Chem.* 247:7612-7621 (1972)); factor alfa de crecimiento de transformación (TGF-α) (Marquardt *et al.*, *Science* 223:1079-1082 (1984)); amfiregulina también conocida como schwanoma o factor de crecimiento autócrino del queratinocito (Shoyab *et al.* *Science* 243:1074-1076 (1989); Kimura *et al.* *Nature* 348:257-260 (1990); y Cook *et al.* *Mol. Cell. Biol.* 11:2547-2557 (1991)); betacelulina (Shing *et al.*, *Science* 259:1604-1607 (1993); y Sasada *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:1173 (1993)); factor de crecimiento epidermal de enlace a heparina (HB-EGF) (Higashiyama *et al.*, *Science* 251:936-939 (1991)); epiregulina (Toyoda *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:7495-7500 (1995); y Komurasaki *et al.* *Oncogene* 15:2841-2848 (1997)); una heregulina (véase abajo); neuregulina-2 (NRG-2) (Carraway *et al.*, *Nature* 387:512-516 (1997)); neuregulina-3 (NRG-3) (Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9562-9567

(1997)); neuregulina-4 (NRG-4) (Harari *et al. Oncogene* 18:2681-89 (1999)); y cripto (CR-1) (Kannan *et al. J. Biol. Chem.* 272(6):3330-3335 (1997)). Los ligandos HER los cuales se enlazan a EGFR incluyen EGF, TGF-α, amfiregulina, betacelulina, HB-EGF y epiregulina. Los ligandos HER los cuales se enlazan a HER3 incluyen heregulinas. Los ligandos HER capaces de enlazarse a HER4 incluyen betacelulina, epiregulina, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 y heregulinas.

"Heregulina" (HRG) cuando se usa en este documento, se refiere a un polipéptido codificado por el producto del gen de regulina como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,641,869, o Marchionni *et al.*, *Nature*, 362:312-318 (1993). Ejemplos de heregulinas incluyen, heregulina-α, heregulina-β1, heregulina-β2 y heregulina-β3 (Holmes *et al.*, *Science*, 256:1205-1210 (1992); y Patente Estadounidense No. 5,641,869); factor de diferenciación *neu* (NDF) (Peles *et al. Cell* 69: 205-216 (1992)); receptor de acetilcolina que induce actividad (ARIA) (Falls *et al. Cell* 72:801-815 (1993)); factores de crecimiento gliales (GGFs) (Marchionni *et al.*, *Nature*, 362:312-318 (1993)); factor derivado de neurona motor y sensorial (SMDF) (Ho *et al. J. Biol. Chem.* 270:14523-14532 (1995)); γ-heregulina (Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394 (1997)).

Un "dímero HER" de este documento, es un dímero no covalentemente asociado que comprende al menos, dos

receptores HER. Tales complejos pueden formarse cuando una célula que expresa dos o más receptores HER es expuesta a un ligando HER y puede ser aislada por inmunoprecipitación y analizada por SDS-PAGE, como se describe en por ejemplo, Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994). Otras proteínas, tales como una subunidad del receptor de citocina (por ejemplo, gp130), puede ser asociada con el dímero. Preferiblemente, el dímero HER comprende HER2.

Un "heterodímero HER" de este documento, es un heterodímero no asociado covalentemente que comprende al menos, dos receptores HER diferentes, tales como heterodímeros EGFR-HER2, HER2-HER3 o HER2-HER4.

Un "inhibidor HER", es un agente el cual interfiere con la activación o función HER. Ejemplos de inhibidores HER incluyen anticuerpos HER (por ejemplo, anticuerpos EGFR, HER2, HER3 o HER4; fármacos EGFR dirigidos; antagonistas HER de molécula pequeña; inhibidores de tirosina cinasa de HER; inhibidores duales de tirosina cinasa HER2 y EGFR tales como, lapatinib/GW572016; moléculas antisentido (véase por ejemplo, documento WO2004/87207); y/o agentes que se enlazan a, o interfieren con la función de, moléculas de señalización corriente abajo tales como MAPK o Akt (véase Figura 5). Preferiblemente, el inhibidor HER es un anticuerpo o molécula pequeña la cual se enlaza a un receptor HER.

Un "inhibidor de dimerización HER", es un agente el

cual inhibe la formación de un dímero HER o heterodímero HER. Preferiblemente, el inhibidor de dimerización HER es un inhibidor de dimerización HER2 y/o inhibe la heterodimerización HER. Preferiblemente, el inhibidor de dimerización HER es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo el cual se enlaza a HER2 en el sitio de enlace heterodimérico del mismo. El principal inhibidor de dimerización HER preferido en este documento es pertuzumab o MAb 2C4. El enlace de 2C4 al sitio de enlace heterodimérico de HER2 se ilustra en la Figura 4. Otros ejemplos de inhibidores de dimerización HER incluyen anticuerpos los cuales se enlazan a EGFR e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de otros receptores HER (por ejemplo, anticuerpo monoclonal EGFR 806, MAb 806, el cual se enlaza a EGFR "no atado"; véase Johns *et al., J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)); anticuerpos los cuales se enlazan a HER3 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de otros receptores HER; anticuerpos los cuales se enlazan a HER4 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de otros receptores HER; inhibidores de dimerización de péptido (Patente Estadounidense No. 6,417,168); inhibidores de dimerización antisentido; etc.

Un "inhibidor de dimerización HER2", es un agente que inhibe la formación de un dímero o heterodímero que comprende HER2.

Un "anticuerpo HER" es un anticuerpo que se enlaza a un receptor HER. Opcionalmente, el anticuerpo HER además interfiere con la activación o función HER. Preferiblemente, el anticuerpo HER se enlaza al receptor HER2. Un anticuerpo HER2 de interés particular de este documento es pertuzumab. Otro ejemplo de un anticuerpo HER2 es trastuzumab. Ejemplos de anticuerpos EGFR incluyen cetuximab y ABX0303.

"Activación HER" se refiere a la activación o fosforilación de cualquiera o más receptores HER. En general, la activación HER resulta en la transducción de señal (por ejemplo, causada por un dominio de cinasa intracelular de un receptor HER de fosforilación de residuos de tirosina en el receptor HER o un sustrato polipéptido). La activación HER puede ser mediada por enlace al ligando HER a un dímero HER que comprende el receptor HER de interés. El ligando HER que se enlaza a un dímero HER, puede activar un dominio cinasa de uno o más de los receptores HER en el dímero y con ello, resulta en fosforilación de residuos de tirosina en uno o más de los receptores HER y/o fosforilación de residuos de tirosina en polipéptidos de sustrato adicional, tales como cinasas intracelulares Akt o MAPK, véase, Figura 5 por ejemplo.

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

Un anticuerpo el cual "inhibe la dimerización HER", es un anticuerpo el cual inhibe o interfiere con la formación de un dímero HER. Preferiblemente, tal anticuerpo se enlaza a HER2 en el sitio de enlace heterodimérico del mismo. El anticuerpo que inhibe la dimerización más preferido aquí es pertuzumab o MAb 2C4. El enlace de 2C4 al sitio de enlace heterodimérico de HER2 se ilustra en la Figura 4. Otros ejemplos de anticuerpos los cuales inhiben la dimerización HER incluyen anticuerpos los cuales se enlazan a EGFR e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de otros receptores HER (por ejemplo, anticuerpo monoclonal EGFR 806, MAb 806, el cual se enlaza a EGFR "no atado" o activado; véase, Johns *et al., J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)); anticuerpos los cuales se enlazan a HER3 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de otros receptores HER; y anticuerpos los cuales se enlazan a HER4 e inhiben la dimerización del mismo con uno o más de otros receptores HER.

Un anticuerpo el cual "bloquea la activación del ligando de un receptor HER más efectivamente que trastuzumab", es uno el cual reduce o elimina la activación del ligando HER de receptores (HER) o dímeros HER más efectivamente (por ejemplo, al menos aproximadamente 2 veces más efectivamente que trastuzumab. Preferiblemente, tal anticuerpo bloquea la activación del ligando HER de un receptor HER al menos, aproximadamente tan efectivamente como

el anticuerpo monoclonal murina 2C4 o un fragmento del mismo Fab, o como pertuzumab o un fragmento Fab del mismo. Se puede evaluar la capacidad de un anticuerpo para bloquear la activación del ligando de un receptor HER estudiando dímeros HER directamente, o evaluando la activación HER, o señalización corriente abajo, la cual resulta de la dimerización HER, y/o evaluando el sitio de enlace anticuerpo-HER2, etc. Los ensayos para seleccionar anticuerpos con la capacidad para inhibir la activación del ligando de un receptor HER más efectivamente que trastuzumab se describen en Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002) y el documento WO01/00245 (Adams *et al.*). Por medio del ejemplo solamente, se puede ensayar para: inhibición de formación de dímero HER (véase por ejemplo, Fig. 1A-B de Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002); y documento WO01/00245); reducción en activación de ligando HER de células las cuales expresan dímeros HER (documento WO01/00245 y Fig. 2A-B de Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo); bloqueo de enlace de ligando HER a células las cuales expresan dímeros HER (WO01/00245, y Fig. 2E de Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo); inhibición de crecimiento celular de células de cáncer (por ejemplo, (células MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D), el cual expresa dímeros HER en la presencia (o ausencia) de ligando HER (WO01/00245 y Figs. 3A-D de Agus *et*

*al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo); inhibición de señalización corriente abajo (por ejemplo, inhibición de fosforilación AKT dependiente de HRG o inhibición de HRG o fosforilación MAPK dependiente de TGFα) (véase, documento WO01/00245, y Fig. 2C-D de Agus et al. *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002), por ejemplo). También se puede valorar si el anticuerpo inhibe la dimerización HER estudiando el sitio de enlace al anticuerpo-HER2 por ejemplo, evaluando una estructura o modelo, tal como una estructura cristal del anticuerpo unido a HER2 (Véase por ejemplo, Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004)).

Un "sitio de enlace heterodimérico" en HER2, se refiere a una región en el dominio extracelular de HER2 que contacta, o interfaces con, una región en el dominio extracelular de EGFR, HER3 o HER4 después de la formación de un dímero junto con éste. La región se encuentra en el Dominio II de HER2. Agus *et al. Cancer Cell* 2: 127-137 (2002) y documento WO01/00245, por medio de ejemplo).

El anticuerpo HER2 puede ser uno el cual, como pertuzumab, "no inhibe el desdoblamiento de ectodominio HER" (Molina *et al. Cancer Res.* 61:4744-4749(2001)). El trastuzumab por otro lado, puede inhibir el desdoblamiento del ectodominio HER2.

Un anticuerpo HER2 que se "enlaza a un sitio de enlace heterodimérico" de HER2, se enlaza a residuos en el

dominio II (y opcionalmente también se enlaza a residuos en otro de los dominios del dominio extracelular de HER2, tales como dominio I y III), y pueden obstaculizar estéricamente, al menos en alguna magnitud, la formación de un heterodímero HER2-EGFR, HER2-HER3 o HER2-HER4. Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004), caracteriza la estructura cristal de HER2-pertuzumab, depositada con el Banco de Datos de Proteína RCSB (ID Código IS78), que ilustra un anticuerpo ejemplar que se enlaza al sitio de enlace heterodimérico de HER2.

Un anticuerpo que "se enlaza al dominio II" de HER2, se enlaza a residuos en el dominio II y opcionalmente a residuos en otros dominios de HER2, tales como los dominios I y III. Preferiblemente, el anticuerpo que se enlaza al dominio II, se enlaza a la unión entre los dominio I, II y III de HER2.

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

Aquí, una muestra o célula que "expresa" una proteína de interés (tal como una HER3 y/o HER2), es una en la cual el ARNm que codifica la proteína, o la proteína que incluye fragmentos de la misma, se determina por estar presente en la muestra o célula.

Una muestra, célula, tumor o cáncer, el cual "expresa HER3 a un nivel menor que el nivel medio para la

expresión de HER3" en un tipo de cáncer, es uno en el cual, el nivel de expresión de HER3 se considera un "nivel HER3 bajo" para una persona experta que para el tipo de cáncer. En general, tal nivel estará en el intervalo desde aproximadamente 0 hasta menos de aproximadamente 50%, con relación a los niveles de HER3 en una población de muestras, células, tumores o cánceres del mismo tipo de cáncer. Por ejemplo, la población la cual es usada para llegar al nivel de expresión medio, puede ser muestras de cáncer de ovario en general, o subagrupamientos de los mismos, tales como cáncer de ovario resistente a quimioterapia, cáncer de ovario resistente a platino, así como también cáncer de ovario avanzado, refractario o recurrente. Los ejemplos de este documento, demuestran como el nivel de expresión medio puede ser determinado. Esto puede constituir un valor de expresión absoluto. De este modo, con referencia a la Figura 17 aquí, el corte para pacientes de ovario resistente a platino considerado por expresar HER3 a un bajo nivel, puede ser aproximadamente 2.8 o menos (menos del 60 por ciento); aproximadamente 2.41 o menos (menos de 55 por ciento); aproximadamente 2.28 o menos (menos de 50 por ciento); aproximadamente 1.88 o menos (menos de 45 por ciento); aproximadamente 1.71 o menos (menos de 40 por ciento); aproximadamente 1.57 o menos (menos de 35 por ciento); aproximadamente 1.4 o menos (menos de 30 por ciento);

aproximadamente 1.19 o menos (menos de 25 por ciento); aproximadamente 0.99 o menos (menos de 20 por ciento), etc. Tales valores absolutos serán cuantificados en un ensayo bajo condiciones de ensayo especificadas, tales como qRT-PCR descritas en este documento, y más preferiblemente el ensayo en qRT-PCR como en el Ejemplo 1. Preferiblemente, el nivel de expresión de HER3 es menor que el 50 por ciento, y más preferiblemente, menos de 30 o 25 por ciento.

Las expresiones: "HER2:HER3" o "HER2 a HER3" en este documento, se refieren al nivel de expresión de HER2 con relación al nivel de expresión de HER3 en una muestra, célula, tumor o cáncer. Tales niveles de expresión pueden ser cuantificados usando una variedad de diferentes técnicas tales como aquellas descritas en este documento. Mientras esto puede ser calculado como una relación de la expresión HER2 a expresión HER3, la presente invención contempla varias otras formas para evaluar los niveles de HER2 y HER3 para seleccionar un paciente para terapia en este documento, que incluye pero no se limita a, usar un árbol de decisión en donde pacientes son seleccionados si su expresión de HER2 y/l HER3 está sobre o bajo ciertos valores de corte. Tales varios otros medios para comparar HER2 a HER3 están abarcados por las frases de este documento "HER2:HER3" o "HER2 a HER3".

Una muestra, célula, tumor o cáncer, el cual "expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 25 por

ciento de la expresión HER2:HER3" en un tipo de cáncer, es uno en el cual, la relación de expresión HER2 con relación a la expresión HER3, no es un "nivel HER2:HER3 bajo" para tal tipo de cáncer. Preferiblemente, tal nivel estará en el intervalo desde más de aproximadamente 25% hasta aproximadamente 100%, con relación a los niveles HER2:HER3 en una población de muestras, células, tumores o cánceres del mismo tipo de cáncer. Por ejemplo, la población la cual es usada para llegar a tales niveles de expresión, puede ser muestras de cáncer de ovario en general, o subagrupamientos de los mismos, tales como cáncer de ovario resistente a quimioterapia, cáncer de ovario resistente a platino, así como también cáncer de ovario avanzado, refractario o recurrente. Los ejemplos de este documento, demuestran como los niveles de expresión en porcentaje pueden ser determinados. En una realización, el nivel HER2:HER3 constituye un valor absoluto de expresión. De este modo, con referencia a la Figura 29 en este documento, el valor de corte para pacientes de ovario resistente a platino que expresan HER2:HER3 a este nivel, puede ser aproximadamente 8.03 o más (mayor del 25 por ciento); aproximadamente 0.90 o más (mayor del 30 por ciento); aproximadamente 1.06 o más (mayor del 35 por ciento); aproximadamente 1.13 o más (mayor del 40 por ciento); aproximadamente 1.26 o más (mayor del 45 por ciento); aproximadamente 1.53 o más (mayor del 50 por

ciento); aproximadamente 1.70 o más (mayor del 55 por ciento); aproximadamente 1.86 o más (mayor del 60 por ciento); aproximadamente 2.15 o más (mayor del 65 por ciento); aproximadamente 2.49 o más (mayor del 70 por ciento); aproximadamente 2.62 o más (mayor del 75 por ciento); aproximadamente 2.92 o más (mayor del 80 por ciento), etc. Tales valores absolutos serán cuantificados en un ensayo bajo condiciones de ensayo especificadas, tales como en qRT-PCR descrito en este documento, y más preferiblemente el ensayo qRT-PCR como en el Ejemplo 1. En una realización, el nivel de expresión HER2:HER3 es mayor que el 50 por ciento, preferiblemente mayor que el 70 por ciento y más preferiblemente, mayor del 75 por ciento. Pacientes cuyo cáncer expresa HER2:HER3 a niveles como se describe en este documento, pueden o no pueden, sobreexpresar HER2.

La técnica de "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" como se usa en este documento, en general se refiere a un procedimiento en donde cantidades minutas de una pieza especificada de ácido nucleico, ARN y/o ADN, son ejemplificadas como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,683,195, publicada el 28 de Julio de 1987. En general, la información de secuencia a partir de los extremos de la región de interés o más allá, necesitan estar disponibles, de manera tal que los cebadores de oligonucleótidos pueden ser designados; estos cebadores serán idénticos o similares en

secuencia a hebras opuestas de la plantilla a ser amplificada. Los nucleótidos 5'terminales de los dos cebadores, pueden coincidir con los extremos del material amplificado. Se puede usar PCR para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas de ADN genómico total, y ADNc transcrito de ARN celular total, bacteriófagos o secuencias de plásmidos, etc. Véase en general, Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989). Como se usa en este documento, la PCR es considerada por ser uno, pero no el único, ejemplo de un método de reacción de polimerasa de ácido nucleico para amplificar una muestra de prueba de ácido nucleico, que comprende el uso de un ácido nucleico conocido (ARN o ADN) como un cebador y utiliza una polimerasa de ácido nucleico para amplificar o generar una pieza específica de ácido nucleico o para amplificar o generar una pieza específica de ácido nucleico el cual es complementario a un ácido nucleico particular.

"Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo" o "qRT-PCR", se refiere a una forma de PCR en donde la cantidad del producto de PCR es medida en cada etapa en una reacción de PCR. Esta técnica ha sido descrita en varias publicaciones que incluyen, Cronin *et al.*, *Am. J. Pathol.* 164(1):35-42 (2004); and Ma *et al.*, *Cancer Cell*

5:607-616 (2004).

El término "microarreglo", se refiere a un arreglo ordenado de elementos de arreglo hibridizables, preferiblemente sondas de polinucleótido, en un sustrato.

El término "polinucleótido" como se usa en singular o plural, se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, el cual puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. De este modo por ejemplo, polinucleótidos como se definen en este documento incluyen sin limitación, ADN de hebra única o doble, ADN que incluye regiones de hebra única y dobles, ARN de hebra única y doble, y ARN que incluye regiones de hebra única y doble, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser de hebra única o, más preferiblemente de doble hebra, como se usa en este documento, se refiere a regiones de triple hebra que comprenden ARN o ADN o tanto ADN o ARN. Las hebras en tales regiones pueden ser de las mismas moléculas o diferentes moléculas. Las regiones pueden incluir todas o más de las moléculas, pero más típicamente involucran solamente una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región de triple hélice a menudo, es un oligonucleótido. El término "polinucleótido", específicamente incluye ADNc. El término incluye ADNs (que incluyen ADNc) y ARNs que contienen una o más bases modificadas. De este modo, el ADNs o ARNs con esqueletos modificados por estabilidad o

por otras razones, son "polinucleótidos" como tal término está propuesto en este documento. Sin embargo, ADNs o ARNs que comprenden bases inusuales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiadas, están incluidas dentro del término "polinucleótidos", como se define en este documento. En general, el término "polinucleótido", abarca todas las formas químicamente, enzimáticamente y/o metabólicamente modificadas de polinucleótidos no modificados, así como también las formas químicas de ADN y ARN característicos de virus y células, que incluyen células simples y complejas.

El término "oligonucleótido", se refiere a un polinucleótido relativamente corto que incluye, sin limitación, desoxirribonucleótidos de hebra única, ribonucleótidos de hebra única o doble, ARN:ADN híbridos y ADNs de doble hebra. Oligonucleótidos tales como oligonucleótidos de sonda de ADN de hebra única, son a menudo sintetizados por métodos químicos, por ejemplo, usando sintetizadores de oligonucleótidos automatizados que son comercialmente disponibles. Sin embargo, oligonucleótidos pueden ser elaborados por una variedad de otros métodos, que incluye, técnicas mediadas por ADN recombinante y por expresión de ADN en células y organismos.

La frase "amplificación de gen", se refiere a un proceso por el cual múltiples copias de un gen o fragmento de

gen se forman en una célula o línea celular particular. La región duplicada (un estiramiento de ADN amplificado), es a menudo referida como "amplicón". Usualmente, la cantidad de ARN mensajero (ARNm) producido también incrementa en la proporción del número de copias hechas del gen particular expresado.

"Rigurosidad" de reacciones de hibridización es fácilmente determinable por uno de habilidad ordinaria en la técnica, y en general, es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración de sal. En general, las sondas más grandes requieren temperaturas superiores para templado apropiado, mientras las sondas más cortas necesitan temperaturas inferiores. La hibridización en general, depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para retemplarse cuando las hebras de complementariedad están presentes en un ambiente por debajo de su temperatura de fusión. A superior el grado de homología deseada entre la sonda u secuencia hibridizable, superior la temperatura relativa la cual puede ser usada. Como un resultado, después las temperaturas relativas superiores podrían tender a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras las temperaturas inferiores las hacen así menos rigurosas. Para detalles adicionales y explicación de rigurosidad de reacciones de hibridización, véase Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley

Interscience Publishers, (1995).

"Condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se definen en este documento, típicamente: (1) emplean baja intensidad iónica y alta temperatura para lavado, por ejemplo, 0.015M de cloruro de sodio(0.0015 M de citrato de sodio/0.1% de dodecil sulfato de sodio a 50°C; (2) emplean durante hibridización, un agente de desnaturalización, tal como formamida por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con 0.1% de albúmina de suero bovino/Ficoll al 0.1%/polivinilpirrolidona al 0.1%/amortiguador de fosfato de sodio 50 mM a pH 6.5 con 750mM de cloruro de sodio, citrato de sodio 75 mM a 42°C; o (3) emplean formamida al 50%, 5xSSC (0.75M de NaCl, 0.075 M de citrato de sodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH 6.8), pirofosfato de sodio al 0.1%, solución Denhart 5x, ADN de esperma de salmón sonicado (50 gr:g/ml), SDS al 0.1%, y sulfato de dextran al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0.2xSSC (cloruro de sodio/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido por un lavado de alta rigurosidad que consiste de 0.1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

"Condiciones de rigurosidad moderada", pueden ser identificadas como se describe en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluye el uso de solución de lavado y condiciones de hibridización (por ejemplo, temperatura,

intensidad iónica y % de SDS), menos rigurosidad que aquellas descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas son incubación durante la noche a 37°C, en solución que comprende: 20% de formamida, 5 x SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato trisódico), 50 mM de fosfato de sodio (pH 7.6), solución 5xDenhardt, sulfato de dextran al 10%, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado, seguido por lavado de filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la técnica reconocerá como ajustar la temperatura, intensidad iónica, etc., como sean necesarias para acomodar factores tales como longitud de sonda y similares.

Un polipéptido de "secuencia nativa", es uno el cual tiene la misma secuencia de aminoácido como un polipéptido (por ejemplo, receptor HER o ligando HER), derivado de la naturaleza que incluyen las que se originan naturalmente o variantes alélicas. Tales polipéptidos de secuencia nativa pueden ser aislados de la naturaleza o pueden ser producidos por medios sintéticos o recombinantes. De este modo, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácido de polipéptido humano que se origina naturalmente, polipéptido murino o polipéptido de cualquier otra especie de mamífero.

El término "anticuerpo" como se usa en este documento, es usado en el sentido más amplio y

específicamente cubre anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), formados de al menos, dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos tan pronto como exhiban una actividad biológica deseada.

Un anticuerpo "aislado", es uno el cual ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Componentes naturales de su ambiente natural son materiales los cuales podrían interferir con la investigación, diagnóstico o usos terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En algunas realizaciones, un anticuerpo es purificado (1) a más de 95% en peso del anticuerpo, como se determina mediante por ejemplo, el método Lowry, y en algunas realizaciones, a más de 99% en peso; (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácido interna o N-terminal por el uso de por ejemplo, un secuenciador de taza centrifugadora, o (3) por homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones de reducción o no reducción usando, por ejemplo, azul Coomasie o teñido de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes puesto que al menos, un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente sin embargo, el anticuerpo aislado será preparado por al menos, una etapa de

purificación.

"Anticuerpos nativos", son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150,000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes de disulfuro de intracadena regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene un extremo variable y un dominio variable ($V_H$) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo y ($V_L$) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio variable de la cadena pesada. Los residuos de aminoácido particular se cree, forman una interfaz entre los dominios de cadena ligera y los dominios de cadena pesada.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo, se refiere a los dominios amino-terminal de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada puede ser referido como "VH". El dominio variable de la cadena ligera puede ser referido como "VL". Estas proteínas son en general, las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de enlace al antígeno.

El término "variable", se refiere el hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensivamente en la secuencia entre anticuerpos y son usados en el enlace y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variablidad no es uniformemente distribuida a través de los dominios variables de anticuerpos. Se concentran en tres segmentos llamados regiones hipervariables (HVRs), ambas en los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. Las porciones más altamente concentradas de dominios variables son llamadas las regiones de estructura (FR). Los dominios variables de cadenas nativas ligera y pesada cada una que comprende cuatro regiones FR, ampliamente adoptando una configuración de lámina beta, conectada por tres HVR, las cuales formas bucles de conexión, y en algunos casos formando parte de, la estructura de lámina beta. Las HVR en cada cadena son mantenidas en conjunto en proximidad cercana por las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de enlace al antígeno de anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes están involucrados directamente en el enlace de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en toxicidad celular

dependiente del anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquiera de las especies de vertebrados, pueden ser asignadas a uno de dos tipos claramente distintos llamados kappa (κ) y lambda (λ), basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de las secuencias de aminoácido de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden ser asignadas a diferentes clases). Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, y varios de estos pueden ser además divididos en subclases (isotipos), por ejemplo, $IgG_1$, $IgG_2$, $IgG_3$, $IgG_4$, $IgA_1$, y $IgA_2$. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas son llamadas $\alpha$, $\delta$, $\varepsilon$, $\gamma$ y $\mu$, respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tri-dimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas, son bien conocidas y se describen en general en, por ejemplo, Abbas et al. *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo", son usados en

este documento intercambiablemente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, sin fragmentos de anticuerpo como se define abajo. Los términos particularmente se refieren a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Un "anticuerpo puro", para propósitos de este documento, es un anticuerpo que no está conjugado a una porción citotóxica o radioetiqueta.

"Fragmentos de anticuerpo", comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente que comprende la región de enlace al antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión de papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de enlace al antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de enlace al antígeno único, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios que combinan antígeno y todavía son capaces de reticular al antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo el cual contiene un sitio de enlace al antígeno completo. En otra

realización, una especie Fv de dos cadenas, consiste de un dímero de un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada en asociación no covalente, hermética. En una especie Fv de cadena única (scFv), un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada, puede ser covalentemente ligado por un enlazador peptídico flexible, de manera que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a aquella en una especie Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres HVR de cada dominio variable, interactúan para definir un sitio de enlace al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis HVR confieren especificidad de enlace al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aún un dominio variable único (o mitad de un Fv que comprende solamente tres HVR específicas para un antígeno), tiene la capacidad para reconocer y enlazar al antígeno, aunque a una afinidad inferior que el sitio de enlace completo.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera, y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) y la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el término carboxi del dominio CH1 de cadena pesada que incluye una o más cisteínas a partir de la región de articulación del anticuerpo. El Fab'-SH es la designación en este documento

para Fab' en el cual, los residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')2, originalmente fueron producidos como pares de fragmentos Fab', los cuales tienen cisteínas articuladas entre ellos. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo también se conocen.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv", comprenden los dominios VH y Vl del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido único. En general, el polipéptido scFV además comprende un enlazador de polipéptido entre los dominios VH y VL los cuales permiten al scFv formar la estructura deseada para enlace al antígeno. Para una revisión de scFv, véase por ejemplo, Pluckthün, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315. Los fragmentos scFv en este documento, específicamente incluyen "inmunofarmacéuticos modulares pequeños" (SMIPs), tal como se describen en los documentos US2005/0180970A1 y US2005/0186216 A1 asignados a Trubion.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de enlace al antígeno, en los cuales los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH-VL). Usando

un enlazado que también es corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a aparearse con los dominios de complementariedad de otra cadena y crean dos sitios de enlace al antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente en por ejemplo, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los diacuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto para mutaciones posibles, por ejemplo, mutaciones que se originan naturalmente, que pueden estar presentes en cantidades menores. De este modo, el "monoclonal" modificador, indica el carácter del anticuerpo por no ser una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, tal anticuerpo monoclonal típicamente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido que se enlaza a un objetivo, en donde la secuencia de polipéptido que se enlaza al objetivo, se obtiene por un proceso que incluye la selección de una

secuencia de polipéptido de enlace al objetivo única de una pluralidad de secuencias de polipéptido. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único a partir de una pluralidad de clones, tal como una combinación de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Se debe entender que una secuencia de enlace al objetivo seleccionada, puede ser además, alterada por ejemplo, para mejorar la afinidad para el objetivo, para humanizar la secuencia de enlace al objetivo, para mejorar su producción en el cultivo celular, reducir su inmunogenicidad *in vivo*, crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de enlace al anticuerpo alterado, también es un anticuerpo monoclonal de esta invención. Contrario a preparaciones de anticuerpo policlonal, las cuales típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal, se dirige contra una determinación única en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpo monoclonal son ventajosas en que son típicamente no contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El "monoclonal" modificador, indica el carácter del anticuerpo por ser obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se construye por requerir producción del anticuerpo por cualquier método

particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser usados de conformidad con la presente invención, pueden ser elaborados por una variedad de técnicas, que incluyen por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,816,567), tecnología de exhibición de fago (véase por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004) y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen partes o todo el locus de inmunoglobulina humana o secuencias de inmunoglobulina humana que codifican genes (véase por ejemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); Patentes Estadounidenses Nos. 5,545,807; 5,545,806;

5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales de este documento, específicamente incluyen anticuerpos "quiméricos", en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras el resto de las cadenas es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como también los fragmentos de tales anticuerpos, en cuanto exhiban la actividad biológica deseada (véase por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,816,567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATIZED®, en donde la región que se enlaza al antígeno del anticuerpo, se deriva de un anticuerpo producido mediante por ejemplo, inmunización de monos macacos con el antígeno de interés.

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por

ejemplo, murina), sin anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo recipiente), en la cual, los residuos de HVR del recipiente son reemplazados por residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad deseada, afinidad y/o capacidad. En algunos casos, los residuos FR de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo recipiente o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones pueden ser elaboradas para además, refinar el desempeño del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo o al menos, uno y típicamente, dos dominios variables en los cuales todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos, una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann

*et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); and Patentes Estadounidenses Nos. 6,982,321 y 7,087,409.

Los anticuerpos HER2 humanizados incluyen, huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 o trastuzumab (HERCEPTIN7), como se describe en la Tabla 3 de la Patente Estadounidense 5,821,337, expresamente incorporada en este documento por referencia; anticuerpos 520C9 humanizados (WO93/21319); y 2C4 humanizados, tales como pertuzumab, como se describe en este documento.

Para propósitos de este documento, "trastuzumab", "HERCEPTIN7" y "huMAb4D5-8", se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminonácido de cadena ligera y pesada en las SEC ID NOS:15 y 16, respectivamente.

En este documento, "pertuzumab", y "OMNITARGJ", se refieren a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácido de cadena ligera y pesada en las SEC ID NOS:13 y 14, respectivamente.

Las diferencias entre funcionamientos de trastuzumab y pertuzumab se ilustran en la Figura 5.

Un "anticuerpo humano", es uno el cual posee una

secuencia de aminoácido la cual corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano y/o ha sido elaborado usando cualquiera de las técnicas para elaborar anticuerpos humanos como se describe en este documento. Esta definición de un anticuerpo humano específicamente excluye un anticuerpo humanizado que comprende residuos de enlace al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden ser producidos usando varias técnicas conocidas en el arte, que incluyen bibliotecas de exhibición de fago. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También están disponibles métodos para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos como se describe en Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Pueden ser preparados anticuerpos humanos administrando el antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir tales anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyo locus endógeno ha sido deshabilitado, por ejemplo, xenoratones inmunizados (véase por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 6,075,181 y 6,150,584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006), con respecto a anticuerpos humanos generados vía

PATENTE DE INVENCION

: 09-79621

π 2/5

tecnología de hibridoma de células B humanas.

"Estructura" o residuos de "FR" son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos HVR como se define en este documento.

El término "numeración de residuo de dominio variable como en Kabat", o "numeración de posición de aminoácido como en Kabat", y variaciones del mismo, se refiere al sistema de numeración usado para dominios de variable de cadena pesada o dominios variable de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., *supra*. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácido lineal actual, puede contener algunos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, un FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de aminoácido único (residuo 52a de conformidad con Kabat), después que el residuo 52 del H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b, y 82c, etc., de conformidad con Kabat), después del residuo 82 de FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de residuos, puede ser determinada por un anticuerpo dado por alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar".

A través de la presente especificación y reivindicaciones, el sistema de numeración Kabat es en

general, usado cuando se refiere a un residuo en el dominio variable (aproximadamente, residuos 1-107 de la cadena ligera y residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest.* 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

El "sistema de numeración EU" o "índice EU" es en general, usado cuando se refiere a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU reportado en in Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), expresamente incorporado en este documento por referencia). A menos que se declare de otro modo en este documento, las referencias a números de residuos en el dominio variable de los anticuerpos, significan numeración de residuo por el sistema de numeración de Kabat. A menos que se declare de otro modo en este documento, las referencias a números de residuos en el dominio constante de anticuerpos significan numeración de residuos por el sistema de numeración EU (por ejemplo, véase Solicitud Provisional Estadounidense No. 60/640,323, Figuras por numeración EU).

Un anticuerpo "maduro de afinidad", es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo, el cual resulta en un mejoramiento en la afinidad del anticuerpo para

el antígeno, comparado con un anticuerpo original, el cual no posee estas alteraciones. En una realización, un anticuerpo maduro de afinidad, tiene afinidades nanomolares o aún picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos maduros de afinidad, pueden ser producidos usando ciertos procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks *et al.* *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe maduración de afinidad por intercambio de dominio VH y VL. La mutagénesis aleatoria de HVR y/o residuos de estructuras, se describe mediante, por ejemplo, Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins *et al*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

"Funciones efectoras" de anticuerpo, se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc de variante de secuencia de aminoácido) de un anticuerpo, y varía con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: citotoxicidad dependiente del complemento y enlace a C1q (CDC); enlace al receptor Fc; citotoxicidad mediada por la célula dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación descendente de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y activación de células B.

El término "región Fc" de este documento, se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, la región Fc de cadena pesada IgG humana es usualmente definida por estirarse de un residuo de aminoácido a la posición Cys226, o desde Pro230, al término carboxilo del mismo. La lisina C-terminal (residuo 447 de conformidad con el sistema de numeración EU) de la región Fc, puede ser removido, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o diseñando por ingeniería recombinantemente el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpo con todos los residuos K447 removidos, poblaciones de anticuerpo sin residuos K447 removidos, y población de anticuerpo que tiene una mezcla de anticuerpos con o sin el residuo K447.

A menos que se indique de otro modo aquí, la numeración de los residuos en cadenas pesadas de inmunoglobulina es aquella del índice EU como en Kabat et al., *supra*. El "índice EU como en Kabat", se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo EU IgG humano.

Una "región Fc funcional", posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. "Funciones

efectoras" ejemplares incluyen, enlace C1q: CDC; enlace al receptor Fc; ADCC; fagocitosis; regulación descendente de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. Tales funciones efectoras en general, requieren que la región Fc sea combinada con un dominio de enlace (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y pueden ser valoradas usando varios ensayos como se describe, por ejemplo, en las definiciones de este documento.

Una "región Fc de secuencia nativa", comprende una secuencia de aminoácido idéntica a la secuencia de aminoácido de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen, una región Fc de secuencia nativa humana IgG1 (alotipos A y no A); región Fc de secuencia nativa humana IgG2; región Fc de secuencia nativa humana IgG3; y región Fc de secuencia nativa humana IgG4, así como también variantes de las mismas que se originan naturalmente.

Una "región Fc variante", comprende una secuencia de aminoácido la cual difiere de aquella de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos, una modificación de aminoácido, preferiblemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, la región Fc variante tiene al menos, una sustitución de aminoácido comparada con la región Fc de secuencia nativa o la región Fc de un polipéptido precursor, por ejemplo, desde aproximadamente una hasta

aproximadamente diez sustituciones de aminoácido, y preferiblemente, desde aproximadamente una hasta cinco sustituciones de aminoácido en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido precursor. La región Fc variante en este documento, preferiblemente poseerá al menos, aproximadamente 80% de homología con la región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido precursor, y más preferiblemente, al menos aproximadamente 90% de homología junto con ésta, más preferiblemente, al menos aproximadamente 95% de homología junto con esta.

"Receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se enlaza a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es uno el cual se enlaza a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA ("un receptor de activación") y FcγRIIB ("un receptor de inhibición"), los cuales tienen secuencias de aminoácido similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos del mismo. El receptor de activación FcγRIIA contiene una porción de activación a base del inmunoreceptor de tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El FcγRIIB del receptor de inhibición, contiene una porción de inhibición a

base del inmunoreceptor de tirosina (ITIM) en este dominio citoplásmico (véase por ejemplo, Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcRs son revisados por ejemplo, en Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FCR que incluyen aquellos a ser identificados en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en este documento.

El término "receptor Fc" o "FcR", también incluye el receptor neonatal, FcRn, el cual es responsable de la transferencia de IgG maternal al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) y regulación de homeostasis de inmunoglobulinas. Los métodos para medir el enlace a FcRn se conocen, (véase por ejemplo, Ghetie and Ward., *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton *et al*).

El enlace a FcRn humano *in vivo* y vida media del suero de polipéptidos que se enlazan a FcRN humano de alta afinidad, puede ser ensayado por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas de células humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los cuales los polipéptidos con una región Fc variante son administrados. El documento WO 2000/42072 (Presta), describe variantes de

anticuerpo con enlace disminuido o mejorado a FcRs. Véase por ejemplo, Shields *et al. J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

"Células efectoras humanas" son leucocitos los cuales expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En ciertas realizaciones, las células expresan al menos FcγRIII y realizan funciones efectoras ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos los cuales median ADCC incluyen, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células eliminadoras naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos. Las células efectoras pueden ser aisladas de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

"Citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo" o "ADCC", se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual, el Ig secretado unido a los receptores Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células NK, neutrófilos y macrófagos), permiten a estas células efectoras, enlazarse específicamente a una célula objetivo que porta el antígeno y subsecuentemente eliminar la célula objetivo con citotoxinas. Las células primarias para mediar las células ADCC, NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII, y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas es resumida en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para valorar la actividad ADCC de

una molécula de interés, un ensayo ADCC *in vitro*, tal como aquel descrito en la Patente Estadounidense No. 5,500,362 o 5,821,337 o Patente Estadounidense No. 6,737,056 (Presta), puede ser realizado. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen, células PBMC y NK. Alternativamente o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede ser valorada *in vitro*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como aquel descrito en Clynes *et al. PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC", se refiere a la lisis de una célula objetivo en la presencia del complemento. La activación de la trayectoria de complemento clásica es iniciada por el enlace del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada), los cuales se unen a su antígeno cognato. Para valorar la activación de complemento, un ensayo CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), puede ser realizado. Las variantes de polipéptido con secuencias de aminoácido de región Fc alterada (polipéptidos con una región Fc variante) y capacidad de enlace a C1q reducida o aumentada, se describen por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 6,194,551 B1 y WO 1999/51642. Véase también por ejemplo, Idusogie *et al. J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

El término "anticuerpo que comprende la región Fc",

se refiere a un anticuerpo que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (residuo 447 de conformidad con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede ser removido, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o por ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Por consiguiente, una composición que comprende un anticuerpo que tiene una región Fc de conformidad con esta invención, puede comprender un anticuerpo con K447 con todo el K447 removido, o una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

El término "anticuerpo de especie principal", de este documento, se refiere a la estructura del anticuerpo en una composición la cual es la molécula de anticuerpo cuantitativamente predominante en la composición. En una realización, el anticuerpo de especies principales es un anticuerpo HER2, tal como un anticuerpo que se enlaza al Dominio II de HER2, anticuerpo que inhibe la dimerización HER más efectivamente que transtuzumab, y/o un anticuerpo el cual se enlaza a un sitio de enlace heterodimérico de HER2. La realización preferida de este documento de anticuerpos de especies principales, es uno que comprende las secuencias de aminoácido pesado y ligero variable en las SEC ID NOs: 3 y 4, y más preferiblemente que comprende4n las secuencias de aminoácido de cadena ligera y pesada en las SEC ID NOS: 13 y 14 (pertuzumab).

Un anticuerpo "variante de secuencia de aminoácido" de este documento, es un anticuerpo con una secuencia de aminoácido la cual difiere de un anticuerpo de especie principal. Ordinariamente, variantes de secuencia de aminoácido poseerán al menos, aproximadamente 70% de homología con el anticuerpo de especie principal, y preferiblemente, serán al menos, aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos 90% homólogos con el anticuerpo de especie principal. Las variantes de secuencia de aminoácido poseen sustituciones, supresiones y/o adiciones a ciertas posiciones dentro o adyacentes a la secuencia de aminoácido del anticuerpo de especie principal. Ejemplos de variantes de secuencia de aminoácido de este documento, incluyen variantes acídicas (por ejemplo, variantes de anticuerpos desaminados), una variante básica, un anticuerpo con una extensión líder amino-terminal (por ejemplo, VHS), en una o dos cadenas ligeras de los mismos, un anticuerpo con un residuo de lisina C-terminal en una o dos cadenas pesadas de los mismos, etc., e incluye combinaciones de variaciones a las secuencias de aminoácido de cadenas pesada y/o ligera. La variante de anticuerpo de interés particular de este documento, es el anticuerpo que comprende la extensión líder amino terminal en una o dos cadenas ligeras del mismo, opcionalmente además comprende otra secuencia de aminoácido y/o diferencias de glicosilación con relación al anticuerpo de especie

principal.

Un anticuerpo "variante de glicosilación" de este documento, es un anticuerpo con una o más porciones de carbohidratos unidas a estos, las cuales difieren de una o más porciones de carbohidratos unidas a un anticuerpo específico principal. Ejemplos de variantes de glicosilación de este documento incluyen anticuerpo con estructura de oligosacárido G1 a G2, en lugar de una estructura de oligosacárido G0, unida a una región Fc del mismo, un anticuerpo con una o dos porciones de carbohidrato unidas a una o dos cadenas ligeras del mismo, anticuerpo sin carbohidrato unido a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, etc., y combinaciones de las alteraciones de glicosilación.

En donde el anticuerpo tiene una región Fc, una estructura de oligosacárido puede ser unida a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, por ejemplo, en el residuo 299 (298, numeración Eu de residuos). Para pertuzumab, el G0 es la estructura de oligosacárido predominante, con otras estructuras de oligosacáridos tales como G0-F, G-1, Man5, Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) y G2, siendo encontrados en cantidades menores en la composición de pertuzumab.

A menos que se indique de otro modo, una "estructura de oligosacárido G1", en este documento incluye estructuras G-1, G1-1, G1(1-6) y G1(1-3).

Una "extensión líder amino-terminal" de este documento, se refiere a uno o más residuos de aminoácido de la secuencia líder amino-terminal que están presentes en el término amino de cualquiera o más cadenas ligera y pesada de un anticuerpo. Una extensión líder amino-terminal ejemplar comprende o consiste de tres residuos de aminoácido, VHS, presentes en una o ambas cadenas ligeras de una variante de anticuerpo.

Un "anticuerpo desaminado" es uno en el cual, uno o más residuos de asparagina del mismo, han sido derivatizados, por ejemplo, a un ácido aspártico, una succinimida, o un ácido iso-aspártico.

Los términos "cáncer" y "cancerosos", se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que son típicamente caracterizados por el crecimiento celular no regulado. Un "tipo de cáncer" de este documento se refiere a una categoría particular o indicación de cáncer. Ejemplos de tales tipos incluyen pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma (que incluye meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (que incluye liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendócrinos (que incluyen tumores carcinoides, gastrinoma, y cáncer de células de isleta), mesotelioma, schwannoma (que incluye neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma, y leucemia o malignidades linfoides. Ejemplos más particulares de tales

cánceres incluyen cáncer de célula escamosa (por ejemplo, cáncer de célula escamosa epitelial), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal que incluye, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (que incluye cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer tiroidal, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, cáncer testicular, cáncer esofageal, tumores del tracto biliar, así como también cáncer de cabeza y cuello, así como también subtipos de cualquiera de tales cánceres, que incluyen pero no se limitan a tipos del mismo, resistente a quimioterapia, resistente a platino, avanzado, refractario y/o recurrentes.

Un "tipo de cáncer", el cual es capaz de responder a un inhibidor HER", es uno el cual cuando se tratado con un inhibidor HER, tal como un anticuerpo HER2 o inhibidor de molécula pequeña, muestra un beneficio terapéuticamente efectivo en el paciente junto con este, de conformidad con cualquiera de los criterios para efectividad terapéutica

conocida para el oncologista especializado, que incluye aquellos elaborados aquí, pero particularmente en términos de supervivencia que incluyen, supervivencia libre de progreso (PFS) y/o supervivencia total (OS). Preferiblemente, tal cáncer se selecciona de cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de trompas de falopio, cáncer de mama metastásico (MBC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de próstata y colorectal. Más preferiblemente, el cáncer es cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio, que incluyen formas resistentes a platino de tales cánceres, así como también cáncer de ovario avanzado, refractario o recurrente.

Un "tipo de cáncer", el cual es capaz de responder a un inhibidor de dimerización HER", es uno el cual cuando se trata con un inhibidor de dimerización HER, tal como pertuzumab, muestra un beneficio terapéuticamente efectivo en el paciente junto con este, de conformidad con cualquiera de los criterios para la efectividad terapéutica conocida por el oncologista especializado, que incluye aquellos elaborados en este documento, pero particularmente en términos de supervivencia que incluyen, supervivencia libre de progreso (PFS) y/o supervivencia total (OS). Preferiblemente, tal cáncer se selecciona de cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de trompas de falopio, cáncer de mama metastásico (MBC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC),

cáncer de próstata y colorectal. Más preferiblemente, el cáncer es cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio, que incluyen formas resistentes a platino de tales cánceres, así como también cáncer de ovario avanzado, refractario o recurrente.

Una "respuesta efectiva" y redacción similar, se refiere a una respuesta al inhibidor de dimerización HER, inhibidor HER o agente quimioterapéutico que es significantemente superior que una respuesta de un paciente que no expresa HER3 en el nivel designado.

Un cáncer "avanzado" es uno el cual se ha distribuido fuera del sitio u órgano de origen, ya sea por invasión local o metástasis.

Un cáncer "refractario" es uno el cual el progreso aún a través de un agente anti-tumoral, tal como un agente quimioterapéutico, es administrado al paciente con cáncer. Un ejemplo de un cáncer refractario es uno el cual es refractario a platino.

Un cáncer "recurrente" es uno el cual ha crecido nuevamente, ya sea en el sitio inicial o en un sitio distante, después de una respuesta a terapia inicial.

En este documento, un "paciente", es un paciente humano. El paciente puede ser un "paciente con cáncer", es decir, uno quién está sufriendo o en riesgo de sufrir de uno o más síntomas de cáncer.

Una "muestra de tumor" de este documento, es una muestra derivada de, o que comprende células tumorales a partir de un tumor del paciente. Ejemplos de muestras tumorales aquí incluyen pero no se limitan a, biopsias tumorales, células de tumor de circulación, proteínas de plasma de circulación, fluido ascítico, cultivos de células primarias o líneas de células derivadas de tumores o que exhiben propiedades similares al tumor, así como también muestras de tumor preservadas, tales como muestras de tumor fijo en formalina, incrustado en parafina o muestras de tumor congelado.

Una muestra de tumor "fija" es una la cual ha sido histológicamente preservada usando un fijativo.

Una muestra de tumor "fijada con formalina" es una la cual se ha preservado usando formaldehído como el fijador.

Una muestra de tumor "incrustada" es una circundada por una película y generalmente medio duro tal como parafina, cera, celoidina o una resina. La incrustación hace posible el corte de secciones delgadas para examen en microscopio o para generación de microarreglos de tejido (TMAs).

Una muestra de tumor "incrustada en parafina" es una circundada por una mezcla purificada de hidrocarburo sólidos derivados de petróleo.

En este documento, una muestra de tumor "congelada" se refiere a una muestra de tumor la cual es, o ha sido

congelada.

Una muestra de cancerígena o biológica la cual "exhibe expresión, amplificación o activación HER" es una la cual, en una prueba de diagnóstico, expresa (que incluye sobreexpresión) un receptor HER, tiene el gen HER amplificado, y/o de otra forma demuestra activación o fosforilación de un receptor HER.

Una célula cancerígena con "sobreexpresión o amplificación del receptor HER" es una la cual tiene niveles significativamente altos de una proteína del receptor HER o gen comparado a una célula no cancerígena del mismo tipo de tejido. Tal sobre expresión puede ser causada por amplificación del gen o incrementando la transcripción o traducción. La sobreexpresión o amplificación del receptor HER se puede determinada en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando niveles incrementados de la proteína HER presente en la superficie de una célula (por ejemplo, vía un ensayo de inmunoquímica; IHC). Alternativamente, o adicionalmente, uno puede medir los niveles de ácido nucleico que codifica HER en la célula, por ejemplo, vía hibridación fluorescente *in situ* (FISH, véase WO98/45479 publicada en Octubre de 1998), manchado southern, o técnicas de reacción en cadena de polimerasa (RCP), tal como RCP de tiempo real cuantitativo (qRT-RCP). Uno puede también estudiar la sobreexpresión o amplificación del receptor HER midiendo en

antígeno evacuado (por ejemplo, dominio extracelular HER) en un fluido biológico tal como cuero (véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,933,294 emitida el 12 de Junio de 1990; WO91/05264 publicada el 18 de Abril de 1991; Patente Estadounidense 5,401,638 emitida el 28 de Marzo de 1995; y Sias et al. J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)). A parte de los ensayos anteriores, están disponibles varios ensayos *in vivo* por el experto profesional. Por ejemplo, uno puede exponer células dentro de cuerpo del paciente a un anticuerpo el cual es opcionalmente etiquetado con una etiqueta detectable, por ejemplo, un isotopo radioactivo, y se puede evaluar el enlace del anticuerpo a las células, por ejemplo, por exploración externa por radioactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesta al anticuerpo.

De forma inversa, un cáncer el cuan "no sobreexpresa o amplifica el receptor HER" es uno el cual no tienen mayores que los niveles normales de proteína del receptor HER o gen comparado a una célula no cancerígena del mismo tipo de tejido. Los anticuerpos que inhiben la dimerización HER, tal como pertuzumab, se puede usar para tratar cáncer, los cuales no sobreexpresan o amplifican el receptor HER2.

En este documento, un "agente anti-tumor" se refiere a un fármaco usado para tratar cáncer. Ejemplos no

limitantes de agentes anti-tumor en este documento, incluyen agentes quimioterapéuticos, inhibidores HER, inhibidores de dimerización HER, anticuerpos HER, anticuerpos dirigidos contra antígenos asociados al tumor, compuestos anti-hormonales, citocinas, fármacos EGFR objetivos, agentes anti-angiogénicos, inhibidores de tirosina cinasa, agentes y anticuerpos inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, anticuerpos que induce apoptosis, inhibidores COX, inhibidores de farnesil transferasa, anticuerpos que enlazan proteínas Ca 125 oncofetales, vacunas HER2, inhibidores Raf o ras, doxorubicina liposomal, topotecan, taxano, inhibidores de tirosina cinasa dual, TLK286, EDM-7200, pertuzumab, trastuzumab, erlotinib y bevacizumab.

Un "agente anti-tumor aprobado" es un fármaco usado para tratar cáncer, el cual ha sido otorgado la aprobación de mercadotecnia por una autoridad regulatoria tal como la Administración de Alimento y Fármaco (FDA) o equivalente extranjero del mismo.

En donde un inhibidor HER o inhibidor de dimerización HER se administra como un "agente anti-tumor único" es el agente anti-tumor único administrado para tratar el cáncer, es decir, no se administra en combinación con otro agente anti-tumor, tal como quimioterapia.

Por "estándar de cuidado" en este documento se planea que el agente o agentes anti-tumor que son

rutinariamente usados para tratar una forma particular de cáncer. Por ejemplo, para cáncer de ovario resistente a platino, el estándar de cuidado es topotecan o doxorubicina liposomal.

Un "agente inhibitorio de crecimiento", cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composiciones las cuales inhiben el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerígena que expresa HER tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, el agente inhibitorio del crecimiento puede ser uno, el cual significativamente reduce el porcentaje de células que expresan HER en la fase S. Ejemplos de agentes inhibitorios de crecimiento incluyen agentes que bloquean el progreso del ciclo celular (en un lugar diferente de la fase S), tal como agentes que inducen la detención de G1 y detención de la fase M. Bloqueadores de fase M clásica incluyen las vicas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores topo II tal como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Estos agentes que detienen G1 también se desbordan en la detención de la fase S, por ejemplo, agentes de alquilación de ADN tal como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Se puede encontrar información adicional en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Capitulo 1, titulada "Cell cycle regulation,

oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami et al., (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente p. 13.

Ejemplos de "anticuerpos inhibitorios del crecimiento" son aquellos los cales se enlaza a HER2 e inhiben el crecimiento de HER2 que sobreexpresan células cancerígenas. Anticuerpos preferidos HER2 inhibitorios del crecimiento, inhiben el crecimiento de células de tumor de mama SK-BR-3 en cultivo celular por más del 20%, y preferiblemente más del 50% (por ejemplo, de aproximadamente 50% hasta aproximadamente 100%) a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0.5 hasta 30 $\mu$g/ml, en donde la inhibición de crecimiento se determina seis días después de la exposición de las células SK-BR-3 al anticuerpo (véase, Patente Estadounidense No. 5,677,171 emitida el 14 de octubre de 1997). El ensayo de inhibición de crecimiento de célula SK-BR-3 se describe en más detalle en la patente y a continuación. El anticuerpo preferido inhibitorio preferido es una variante humanizada del anticuerpo monoclonal de murina 4D5, por ejemplo trastuzumab.

Un anticuerpo el cual "induce apoptosis" es uno el cual induce muerte celular programada como se determina por el enlace de anexina V, fragmentación de ADN, reducción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (llamados cuerpos apoptóticos). La célula c es usualmente una la cual

sobreexpresa el receptor HER2. Preferiblemente la célula es una célula de tumor, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estómago, endometrial, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreática o vejiga. *In vitro*, la célula puede ser una célula SK-BR-3, BT474, célula Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 o SKOV3. Varios métodos están disponibles para evaluación de los eventos celulares asociados con apoptosis. Por ejemplo, translocación de fosfatidil serina (PS) se puede medir por enlace de anexina; la fragmentación de ADN se puede evaluar a través de escalamiento de ADN; y condensación nuclear/cromatina a lo largo con fragmentación de ADN se puede evaluar por cualquier incremento en las células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo el cual induce apoptosis es uno el cual resulta en aproximadamente 2 hasta 50 veces, preferiblemente aproximadamente 5 hasta 50 veces, y más preferiblemente aproximadamente 10 a 50 veces, inducción de anexina enlazada en relación a células no tratadas en un ensayo de enlace de anexina usando células BT474 (véase abajo). Ejemplos de anticuerpos HER2 que inducen apoptosis son 7C2 y 7F3.

El "epítope 2C4" es la región en el dominio extracelular de HER2 al cual el anticuerpo 2C4 se enlaza. Para seleccionar anticuerpos los cuales se enlazan al epítope 2C4, un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el que se describe en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring

Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), se puede llevar a cabo. Preferiblemente el anticuerpo bloquea en enlace de 2C4 para HER2 por aproximadamente 50% o más. Alternativamente, el mapeo del epítope se puede realizar para valorar sí el anticuerpo se enlaza al epítope 2C4 de HER2. El epítope 2C4 comprende residuos del Dominio II en el dominio extracelular de HER2. 2C4 y pertuzumab se enlazan al dominio extracelular de HER2 en la unión de dominios I, II y III. Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004).

El "epítope 4D5" es la región en el dominio extracelular de HER2 al cual el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y transtuzumab se enlazan. Este epítope se cierra al dominio de transmembrana de HER2, y dentro del Dominio IV de HER2. Para seleccionar los anticuerpos los cuales se enlaza al epítope 4D5, un ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como el que se describe en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988) se puede lleva a cabo. Alternativamente, el mapeo del epítope se puede realizar valorando sí el anticuerpo se enlaza al epítope 4D5 de HER2 (por ejemplo, cualquiera de uno o más residuos en la región de aproximadamente 529 residuos hasta aproximadamente 625, inclusive del ECD de HER2, la numeración de residuo incluye el péptido de señal).

El "epítope 7C2/7F3" es la región en el N término, dentro del Dominio I, del dominio extracelular de HER2 al

cual los anticuerpos 7C2 y/o 7F3 (cada uno depositado con la ATCC, véase abajo) se enlazan. Para seleccionar anticuerpos los cuales se enlazan al epítope 7C2/7F3, un ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and DAvid Lane (1988) se puede realizar. Alternativamente, el mapeo del epítope se puede realizar para establecer sí el anticuerpo se enlaza al epítope 7C2/7F3 en HER2 (por ejemplo, por cualquiera de uno o más de los residuos en la región de aproximadamente 22 residuos hasta aproximadamente 53 residuos del ECD de HER2, la numeración del residuo incluye péptido de señal).

"Tratamiento" se refiere a tanto tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas. Aquellos en necesidad del tratamiento incluyen aquellos ya con cáncer, así como aquellos en los cuales el cáncer se previene. Puesto que el paciente a ser tratado en este documento puede ser diagnosticado por tener cáncer o puede estar predispuesto o ser susceptible a cáncer.

Los términos "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" se refieren a una cantidad de un fármaco efectivo para tratar cáncer en el paciente. La cantidad efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerígenas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, disminuir la velocidad hasta cierto punto la propagación y

preferiblemente detener) la infiltración de célula cancerígena en órganos periféricos; inhibir (es decir, detener la velocidad hasta cierto punto la propagación y preferiblemente detener) la metástasis del tumor; inhibir, hasta cierto punto la propagación, crecimiento del tumor; y/o aliviar algo la propagación o más de los síntomas asociados con el cáncer. Para la propagación, el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o eliminar las células cancerígenas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La cantidad efectiva puede propagar el progreso libre de supervivencia (por ejemplo, como se mide por el Criterio de Evaluación de Respuesta parta Tumores Sólidos, RECIST, o cambios CA-125), que resulta en una respuesta objetiva (que incluye una respuesta parcial, PR, o respuesta completa, CR) supervivencia mejorada (que incluye supervivencia completa y supervivencia libre de progreso) y/o mejora uno o más síntomas de cáncer (por ejemplo, como se valora por FOSI). Más preferiblemente, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco es efectiva para mejorar la supervivencia libre de progreso (PFS) y/o supervivencia completa (OS).

"Supervivencia" se refiere al paciente permanece aliviado, e incluye la supervivencia completa, así como supervivencia libre de progreso.

"Supervivencia completa" se refiere al paciente que permanece aliviado por un periodo definido de tiempo, tal

como 1 año, 5 años, etc, a partir del tiempo de diagnóstico o tratamiento.

"Supervivencia libre de progreso" se refiere al paciente que permanece aliviado, sin el progreso de cáncer o ponerse más enfermo.

Por "supervivencia prolongada" significa supervivencia libre de progreso o completa incrementada en un paciente tratado en relación a un paciente no tratado (es decir, en relación a un paciente no tratado con un inhibidor HER, inhibidor de dimerización HER, tal como pertuzumab) o en relación a un paciente el cual no expresa HER3 o HER2:HER3 en un nivel designado, y/o en relación a un paciente tratado con un agente anti-tumor aprobado (tal como topotecan o doxorubicina liposomal, en donde el cáncer se cáncer de ovario).

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

Por "respuesta completa" o "CR" se pretende la desaparición de todos los signos de cáncer en respuesta o tratamiento. Esto no siempre significa que el cáncer se ha curado.

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

NBB

tratamiento.

El término "agente citotóxico" como se usa en este documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o causa destrucción de las células. El término se planea para incluir isotopos radioactivos (por ejemplo, $At^{211}$, $I^{131}$, $I^{125}$, $Y^{90}$, $Re^{196}$, $Re^{188}$, $Sm^{153}$, $Bi^{212}$, $P^{32}$ e isotopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeñas toxinas enzimáticamente activas de origen bacterial, fúngica, de planta o animales, que incluyen fragmentos y/o variantes de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes de alquilación tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®); alquil sulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietiilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colquicinas; ácido betulínico; una camptotecina (que incluye el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina,

y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (que incluye sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bicelesina); podofilotoxina; ácido podoflínico; teniposida; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictiina; espongistatina; mostaza de nitrógeno tal como clorambucil, cloronafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitroureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimnustina; antibióticos tales como antibióticos de enediina (por ejemplo,, caliqueamicina, especialmente caliqueeamicina gamma1I y caliqueamicinaomegaI1 (véasr, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor de alfa-4 integrina oral; dinemicina, que incluye dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina cromóforos de antibióticos cromoproteina enedina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinis, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (que

incluye ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de liposoma de HCl doxorubicina HCl (DOXIL®), liposomal doxorubicina TLC-D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposomal pegilada (CAELYX®), y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), an epotiilona, y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de primidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; ácido fólico restablecedor tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptiniuo; etoglucido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan; lonidainina; maitansinoidos

tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxin; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazonico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartícula diseñado por ingeniería de albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™), y docetaxel (TAXOTERE®); cloranbucil; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatina, oxaliplatina, y carboplatina; vincas, los cuales previenen polimerización de tubulina a partir de la formación de microtúbulos, que incluyen vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovovina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibitor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometihilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinóico, que incluye bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido

zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en trayectorias de señalización implicadas en la proliferación de célula aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia del gene, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); perifosina, inhibidor COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor de proteosoma (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; inhibidor Bcl-2 tal como oblimerseno de sodio (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR (véase definición abajo); inhibidores de tirosina cinasa (véase definición abajo); y sales, ácidos o derivados de los anteriores farmacéuticamente aceptables, así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tal como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatina (ELOXATIN™) combinada con 5-FU y leucovovina.

En este documento, los agentes quimioterapéuticos incluyen "agentes anti-hormonales" o "terapéuticos endocrinos" los cuales actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento de cáncer. Pueden ser las mismas hormonas, pero no se limitan a: anti-estrógenos con perfil agonista/antagonista mezclado, que incluye, tamoxifen (NOLVADEX®) 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno, (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVISTA®), trioxifeno, queoxifeno, y moduladores del receptor de estrógeno selectivo (SERMs) tal como SERM3; anti-estrógenos puros sin propiedades agonistas, tal como fulvestrant (FASLODEX®), y EM800 (tales agentes pueden bloquear la dimerización del receptor de estrógeno (ER), inhiben en enlace de ADN, incrementa el movimiento ER, y/o suprime los niveles ER); inhibidores de aromatasa, que incluyen inhibidores de aromatasa esteroidal tales como formestano y exemestano (AROMASIN®), e inhibidores de aromatasa no esteroidales tales como anastrazol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de aromatasa incluyendo vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol, y 4(5)-imidazoles; agonistas de la hormona que libera hormona lutenizante, que incluye leuprolido (LUPRON® y ELIGARD®), goserelin, buserelin, y tripterelin; esteroides del sexo, que incluyen progestinas tales como acetato de megestrol y acetato de

medroxiprogesterona, estrógenos tales como dietilestilbestrol y premarina, y andrógenos/retinoides tales como fluoximesterona, todos los de ácido transretiónico y fenretinida; onapristona; anti-progesteronas; reguladores descendentes del receptor de estrógeno (ERDs); anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de dos o más de los anteriores.

Un "agente quimioterapéutico antimetabolito" es un agente el cual es estructuralmente similar a un metabolito, pero no se puede usar por el cuerpo en una manera productiva. Muchos agentes quimioterapéuticos antimetabolito interfieren con la producción de los ácidos nucleicos, ARN y ADN. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos antimetabolito incluyen gemcitabina (GEMZAR7), 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina (XELODAJ), 6-mercaptopurina, metotrexato, 6-tioguanina, pemetrexed, raltitrexed, arabinosilcitosina ARA-C citarabina (CYTOSAR-U7), dacarbazina (DTIC-DOME7), azocitosina, desoxicitosina, piridmideno, fludarabina (FLUDARA7), cladrabina, 2-desoxi-D-glucosa etc. El agente quimioterapéutico antimetabolito preferido es gemcitabina.

"Gemcitabina" o "monoclorhidrato de 2'-desoxi-2',2-difluorocitidina (isómero b)" es un análogo de nucleósido que exhibe actividad antitumor. La fórmula empírica para HCl

gemcitabina es C9H11F2N3O4 A HCl. HCl gemcitabina es vendida por Eli Lilly bajo la marca comercial GEMZAR7.

Un "agente quimioterapéutico en base a platino" comprende un compuesto orgánico el cual contiene platino como una parte integral de la molécula. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos en base a platino incluyen carboplatina, cisplatina y oxiplatino.

Por "quimioterapia en base a platino" es terapia planeada con uno o más agentes quimioterapéuticos en base a platino, opcionalmente en combinación con uno o más de otros agentes quimioterapéuticos.

Por cáncer "resistente a quimioterapia" significa que el cáncer del paciente ha progresado mientras recibe un régimen de quimioterapia (es decir, el paciente es "refractario de quimioterapia"), o el paciente ha progresado dentro de los 12 meses (por ejemplo, dentro de 6 meses) después de terminado un régimen de quimioterapia.

Por cáncer "resistente a platino" significa que el cáncer del paciente ha progresado mientras recibe quimioterapia a base de platino (es decir, el paciente es "refractario a platino"), o el paciente ha progresado dentro de los 12 meses (por ejemplo, dentro de 6 meses) después de terminado el régimen de quimioterapia en base a platino.

Un "agente anti-angiogénico" se refiere a un compuesto el cual bloquea, o interfiere con algún grado, el

desarrollo de vasos sanguíneos. El factor anti-angiogénico puede, por ejemplo, ser una molécula pequeña o anticuerpo que se enlaza a un factor de crecimiento o receptor del factor de crecimiento involucrado en promover angiogénesis. El factor anti-angiogénico preferido en este documento es un anticuerpo que se enlaza al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), tal como bevacizumab (AVASTIN7).

El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular la cual actúa en otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas de polipéptido tradicionales. Incluidas entre las citocinas están la hormona del crecimiento tal como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo y hormona del crecimiento bovino; hormona paratiroide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteína, tal como hormona que estimula el folículo (FSH), hormona que estimula la tiroides (TSH) y hormona lutenizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblasto; prolactina; lactogeno placental; factor-$\alpha$ y -$\beta$ de necrosis del tumor; sustancia que inhibe mulerian; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina, trombopoyetina (TPO); factores del crecimiento del nervio tales como NGF-$\beta$;

factor de crecimiento de plaqueta; factores del crecimiento de transformación (TGFs) tales como TGF-$\alpha$ y TGF-$\beta$; factor del crecimiento similar a insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferonas tales como interferona-$\alpha$, -$\beta$ y -$\gamma$; factores que estimula la colonia (CSFs) tales como macrófagos-CSF (M-CSF); granulocitos-macrófagos-CSF (GM-CSF); y granulocitos-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tales como IL-1, IL-1$\alpha$, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis de tumor tal como TNF-$\alpha$ o TNF-$\beta$; y otros factores de polipéptido que incluyen LIF y un kit de ligando (KL). Como se usa en este documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de citocinas se secuencia nativa.

Como se usa en este documento, el término "fármaco objetivo a EGFR" se refiere a un agente terapéutico que se enlaza a EGFR y, opcionalmente, inhibe activación EGFR. Ejemplos de tales agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se enlazan a EGFR. Ejemplos de anticuerpos que se enlazan a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, Patente Estadounidense No. 4,943,533, Mendelsohn *et al.*) y variantes de los mismos, tal como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX7) y 225 humano

reformado (H225) (véase, documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo objetivo a EGFR completamente humano (Imclone); anticuerpos que se enlaza a EGFR mutante tipo II (Patente Estadounidense No. 5,212,290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se enlazan a EGFR como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,891,996; y anticuerpos humanos que se enlazan a EGFR, tal como ABX-EGF (véase documento WO98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto *et al. Eur. J. Cancer* 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compite tanto con EGF como TGF-alfa para enlazarse a EGFR; y 806mAb o 806 mAb humanizado (Johns *et al., J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR se puede conjugar con un agente citotóxico, así generando un inmunoconjugado (véase, por ejemplo, EP659,439A2, Merck Patent GmbH). Ejemplos de moléculas pequeñas que se enlazan a EGFR influyen ZD1839 o Gefitinib (IRESSAJ; Astra Zeneca); CP-358774 o Erlotinib (TARCEVAJ; Genentech/OSI); y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen); EMD-7200.

Un "inhibidor de tirosina cinasa" es una molécula la cual inhibe actividad de tirosina cinasa de una tirosina cinasa tal como un receptor HER. Ejemplos de tales inhibidores incluyen los fármacos objetivos a EGFR notadas en el párrafo precedente; inhibidor de tirosina cinasa HER2 de molécula pequeña tal como TAK165 disponible de Takeda; CP-

724,714, un inhibidor selectivo oral de tirosina cinasa del receptor ErbB2 (Pfizer and OSI; inhibidores HER dobles tal como EKB-569 (disponible de Wyeth) los cuales preferiblemente se enlazan a EGFR pero inhiben células sobreexpresadas tanto HER2 como EGFR; GW572016 (disponible de Glaxo) e inhibidores de tirosina cinasa HER2 y EGFR orales; PKI-166 (disponible de Novartis); inhibidores pan-HER tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores Raf-1 tal como el agente antisentido ISIS-5132 disponible de ISIS Pharmaceuticals el cual inhibe la señalización Raf-1; inhibidores TK objetivo no de HER tal como Imatinib mesilato (GLEEVACJ) disponible de Glaxo; inhibidor CI-1040 de cinasa I regulada de forma extracelular por MAPK (disponible de Pharmacia); quinazolinas, tal como PD 153035,4-(3-cloroanilino)quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidinas; curcumin (diferuloil metan,4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen porciones de nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lamber); moléculas antisentido *(por ejemplo,* aquellas que se enlazan al ácido nucleico que codifica HER); quinoxalinas (Patente Estadounidense No. 5,804,396); trifostinas (Patente Estadounidense No. 5,804,396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores

pan-HER tal como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de Imatinib (Gleevac; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o como se describe en cualquiera de las publicaciones de patente: Patente Estadounidense No. 5,804,396; WO99/09016 (American Cyanimid); WO98/43960 (American Cyanamid); WO97/38983 (Warner Lambert); WO99/06378 (Warner Lambert); WO99/06396 (Warner Lambert); WO96/30347 (Pfizer, Inc); WO96/33978 (Zeneca); WO96/3397 (Zeneca); and WO96/33980 (Zeneca).

Una dosis "fija" o "uniforme" de un agente terapéutico, en este documento se refiere a una dosis que se administra a un paciente humano con respecto al peso (WT) o área de superficie corporal (BSA) del paciente. La dosis fija o uniforme es por lo tanto no proporcionada como una dosis mg/kg o una dosis $mg/m^2$, pero más bien como una cantidad absoluta del agente terapéutico.

Una dosis "cargada" en este documento, generalmente comprende una dosis inicial de un agente terapéutico administrado a un paciente, y es seguida por una o más dosis de mantenimiento del mismo. Generalmente, se administra una dosis de carga única, pero se contemplan en este documento dosis de carga múltiple. Usualmente, la cantidad de dosis de carga administradas excede la cantidad de las dosis de

mantenimiento administradas y/o las dosis de carga se administran más frecuentemente que las dosis de mantenimiento, para lograr la concentración del estado estable deseado del primer agente terapéutico que se puede lograr con las dosis de mantenimiento.

Una "dosis de mantenimiento" en este documento, se refiere a una o más dosis de un agente terapéutico administrado al paciente durante un periodo de tratamiento. Usualmente, las dosis de mantenimiento se administran a intervalos de tratamiento espaciado, tal como aproximadamente cada semana, aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente cada 3 semanas o aproximadamente cada 4 semanas.

Un "medicamento" es un fármaco activo para tratar cáncer, tal como un inhibidor HER, un inhibidor de dimerización HER (tal como pertuzumab) o un agente quimioterapéutico (tal como gemcitabina).

Una "audiencia objetivo" es un grupo de gente o una institución a quién o a la cual un medicamento particular es promovido o planeado a ser promovido, como por mercadotecnia o publicidad, especialmente para usos, tratamiento o indicaciones particulares, tal como pacientes individuales, poblaciones de pacientes, lectores de diarios, literatura médica y revistas, televisión o espectadores de internet, oyentes radio o internet, compañías de fármaco, etc.

Un "inserto empaquetado" se usa para referirse a

las instrucciones habituales incluidas en empaques comerciales de productos terapéuticos, que contienen información a cerca de las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, otros productos terapéuticos a ser combinados con el producto empaquetado y/o advertencias concernientes al uso de tales producto terapéuticos, etc.

**H. Producción de anticuerpos**

Ya que en la realización preferida, el inhibidor HER es un anticuerpo, sigue una descripción a técnicas ejemplares para la producción de anticuerpos HER de conformidad con la presente invención. En antígeno HER a ser usado para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de un receptor HER o una porción del mismo, que contiene el epítope deseado. Alternativamente, las células que expresan HER en la superficie celular (por ejemplo, células NIH-3T3 transformadas para sobreexpresar HER2; o una línea celular de carcinoma tal como células SK-BR-3, véase Stancovski et al. PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991) se puede usar para generar anticuerpos. Otras formas de receptor HER útil para generar anticuerpos serán aparentes a aquellos expertos en la técnica.

*(i) Anticuerpos policlonales*

Anticuerpos policlonales son preferiblemente incrementados en animales por inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneal (ip) múltiples del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante a una proteína que es inmunogénica en la especies a ser inmunizadas, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina de bovino o inhibidor de tripsina de frijol de soya usando un agente bifuncional o de derivatización, por ejemplo, éster de maleimidobencil sulfosuccinimida de (conjugado a través residuos de cisteína c), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, $SOCl_2$ o $R^1N=C=NR$, en donde R y $R^1$ son grupos alquilo diferentes.

Se inmunizan animales contra en antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados por combinación, por ejemplo 100 $\mu$g o 5 $\mu$g de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes del adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en el adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a catorce días más tarde, los animales se desangran y el suero se somete a ensayo por titulador de anticuerpo. Los animales se refuerzan hasta que el titulador se estabiliza.

Preferiblemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de enlace cruzado diferencial. Los conjugados también se pueden elaborar en cultivo celular recombinante como fusiones de proteína. También, agentes de agregación tales como alum son adecuadamente usados para mejorar la respuesta inmune.

*(ii) Anticuerpos monoclonales*

Están disponibles en la técnica varios métodos para elaborar anticuerpos monoclonales en este documento. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se puede elaborar usando el método de hibridoma, primero descrito por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), por métodos de ADN recombinantes (Patente Estadounidense No. 4,816,567).

En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedero apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se describe anteriormente para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que serán específicamente enlazados a la proteína usada para inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Los linfocitos después se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas, se siembran y hacen crecer en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parenteral no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parenteral carecen de la enzima hipoxantin guanina fosforil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para el hibridoma típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), las sustancias previenen el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan la producción de alto nivel estable del anticuerpo por las células que producen anticuerpo seleccionado, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma de murina, tal como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Las líneas celulares de mieloma humano y mieloma ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (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)).

El medio de cultivo en el cual las células de hibridoma se hacen crecer, se somete a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de enlace de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determinan por inmunoprecipitación o por un ensayo de enlace *in vitro*, tal como radioinmunoensayos (RIA) o ensayo inmunoabsorbente enlazado a la enzima (ELISA).

La afinidad de enlace del anticuerpos monoclonal puede, por ejemplo, ser determinada por el análisis Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después que las células de hibridoma se identifican por producir anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones se pueden subclonar por procedimientos de dilución limitantes y se hace crecer por métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). El medio de cultivo adecuado para este propósito incluye, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden hacer crecer *in vivo* como tumores de ascitos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones, son adecuadamente separados a partir del medio de cultivo, fluido de ascitos o suero por procedimientos de

purificación de anticuerpo convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía de hidroxiapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales es fácilmente aislado y secuenciado usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótido que son capaces de enlazarse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de murina). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida del ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colorar en vectores de expresión, los cuales después se transfieren en las células hospederas tal como células de *E. coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO) o células de mieloma que de otra forma no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospederas recombinantes. Revisiones de artículos en expresión recombinante en bacteria ADN que codifica en anticuerpo incluye Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

En una realización adicional, anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de bibliotecas de fago del anticuerpo generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554

(1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos de murina y humano, respectivamente, usando bibliotecas de fago. Publicaciones subsecuentes describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por intercambio de cadena (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fago muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Así, estas técnicas son alternativas viables para técnicas de hibridoma del anticuerpo monoclonal tradicional para aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación por dominios constantes de cadena pesada y cadena ligera en lugar de las secuencias de murino homologas (Patente Norteamericana No. 4,816,567; y Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación por un polipéptido que no es de inmunoglobulina.

Típicamente, tales polipéptidos que no son de inmunoglobulina son sustituidos por los dominios constantes de un anticuerpo, o ellos son sustituidos por los dominios

variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

*(iii) Anticuerpos Humanizados*

En el arte se han descrito métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos dentro de éste de una fuente la cual es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos son frecuentemente referidos como residuos de "importación" los cuales son típicamente tomados desde un dominio variable de "importación". La humanización puede ser esencialmente realizada siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo secuencias de región hipervariables por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De conformidad, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente Norteamericana No. 4,816,567) en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por

la secuencia correspondiente de especies no humanas. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos de regiones hipervariables y posiblemente algunos residuos FR son sustituidos por residuos desde sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de los dominios variables humanos, ambos ligeros y pesados, a utilizarse en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo al llamado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se selecciona contra la genoteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más cercana a aquella del roedor es aceptada entonces como la región de estructura (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método usa una región de estructura particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un sub-grupo particular de cadenas ligeras y pesadas. La misma estructura puede utilizarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Es además importante que los anticuerpos sean

humanizados con retención de alta afinidad al antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo a un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan por un proceso de análisis de las secuencias paternal y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias paternales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares a aquellos expertos en el arte. Programas de computadora están disponibles, los cuales ilustran y despliegan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estos despliegues permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influencia la capacidad de la inmuglobulina candidata para enlazar su antígeno. En esta forma, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias de recepción y de importación tal que la característica del anticuerpo deseada, tal como la afinidad incrementada para el antígeno(s) objetivo, se logre. En general, los residuos de regiones hipervariables están directamente y la mayoría sustancialmente involucrados en la influencia del enlace del antígeno.

La patente WO01/00245 describe la producción de

anticuerpos HER2 humanizados ejemplares los cuales enlazan el HER2 y bloquean la activación del ligando de un receptor HER. El anticuerpo humanizado de interés particular aquí bloquea la activación mediada por el EGF, el TGF- $\alpha$ y/o el HRG del MAPK esencialmente de manera tan efectiva como el anticuerpo 2C4 monoclonal de murino (o un fragmento Fab del mismo) y/o enlaza HER2 esencialmente de manera tan efectiva como el anticuerpo 2C4 monoclonal de murino (o un fragmento Fab del mismo). El anticuerpo humanizado aquí puede, por ejemplo, comprender residuos de la región hipervariable no humanos incorporados en un dominio pesado variable humano y puede además comprender una sustitución de la región de estructura (FR) en una posición seleccionada del grupo que consiste de 69H, 71H, y 73H utilizando el sistema de numeración de dominio variable establecido en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, el anticuerpo humanizado comprende sustituciones de FR en dos o todas las posiciones 69H, 71H y 73H.

Un anticuerpo humanizado ejemplar de interés aquí comprende residuos GFTFTDYTMX de determinación de complementariedad de dominio pesado variable, donde X es preferiblemente D o S (SEC ID No:7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEC ID NO:8); y/o NLGPSFYFDY (SEC ID NO:9), opcionalmente

comprende modificaciones del aminoácido de aquellos residuos CDR, por ejemplo, donde las modificaciones esencialmente mantienen o mejoran 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 CDR pesadas variables anteriores. Tales variantes del anticuerpo pueden prepararse por maduración de afinidad, por ejemplo, como se describe abajo. La mayoría de los anticuerpos humanizados preferidos comprende la secuencia de aminoácido de dominio pesado variable en SEC ID No:4.

El anticuerpo humanizado puede comprender residuos KASQDVSIGVA (SEC ID NO:10); $SASYX^1X^2X^3$, de determinación de complementariedad de dominio ligero variable, donde $X^1$ es preferiblemente R o L, $X^2$ es preferiblemente Y o E, y $X^3$ es preferiblemente T o S (SEC ID NO:11); y/o QQYYIYPYT (SEC ID NO:12), por ejemplo, además de aquellos residuos CDR de dominio pesado variable en el párrafo precedente. Tales anticuerpos humanizados opcionalmente comprenden modificaciones de aminoácidos de los residuos de CDR anteriores, por ejemplo, donde las modificaciones esencialmente mantienen o mejoran 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 CDR ligeras variables anteriores. Tales variantes del anticuerpo pueden prepararse por maduración de afinidad, por ejemplo, como se describe abajo. La mayoría de los anticuerpos humanizados preferidos comprende la secuencia de aminoácido de dominio ligera variable en SEC ID NO:3.

La presente solicitud también contempla anticuerpos de afinidad madura que enlazan el HER2 y bloquean la activación del ligando a un receptor HER. El anticuerpo paternal puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, por ejemplo, uno que comprende las secuencias ligeras variables y/o pesadas variables de las SEC ID Nos 3 y 4, respectivamente (es decir, que comprenden el VL y/o VH de pertuzumab). El anticuerpo de afinidad madura preferiblemente enlaza al receptor HER2 con una afinidad superior a aquella del murino 2C4 o del pertuzumab (por ejemplo, desde aproximadamente dos o aproximadamente cuatro veces, a aproximadamente 100 veces o aproximadamente 1000 veces afinidad mejorada, por ejemplo, como se evalúa usando un ELISA de dominio celular extra HER2 (ECD)). Residuos CDR pesados variables ejemplares para la sustitución incluyen H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, o combinaciones de dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de estos residuos). Ejemplos de residuos CDR ligeros variables para la alteración incluyen L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 o combinaciones de dos o más (por ejemplo

dos a tres, cuatro, cinco o hasta aproximadamente diez de estos residuos).

Se contemplan varias formas del anticuerpo humanizado o del anticuerpo de afinidad madura. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o un anticuerpo de afinidad madura puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, el cual es opcionalmente conjugado con uno o más agentes citotóxicos para generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado o anticuerpo de afinidad madura puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto. El anticuerpo IgG1 intacto preferido comprende la secuencia de cadena ligera en SEC ID NO:13 y la secuencia de cadena pesada en SEC ID NO:14.

*(iv) Anticuerpos Humanizados*

Como una alternativa a la humanización, los anticuerpos humanos pueden ser generados. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, el ratón) que son capaces, luego de la inmunización, de producir un repertorio total de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigota del gen de la región ($J_H$) de unión de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes de línea quimérica y germinal resulta en la inhibición completa de la producción del anticuerpo endógeno.

La transferencia del arreglo del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos luego del desafió del antígeno. Ver, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year en Immuno.*, 7:33 (1993); y las Patentes Norteamericanas Nos. 5,591,669, 5,589,369 y 5,545,807. Alternativamente, la tecnología de despliegue de fago (McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990)) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios del gen de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donadores inmunizados. De acuerdo a esta técnica, los genes de dominio del anticuerpo V se clonan en estructura en ya sea un gen de proteína revestido menor o mayor de un bacteriófago filamentoso, tal como el M13 o fd y se despliegan como fragmentos del anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de hebra única del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también resultan en la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta aquellas propiedades. Así, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. El despliegue del fago puede realizarse en una variedad de

formatos; para su revisión vea, por ejemplo, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Varias fuentes de segmentos del gen V pueden utilizarse para el despliegue del fago. Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) aisló un arreglo diverso de anticuerpos de anti-oxazolona de una genoteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivada de los bazos de los ratones inmunizados. Un repertorio de genes V de donadores inmunizados humanos puede construirse y pueden aislarse los anticuerpos a un arreglo diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), o Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Véase también, las Patentes Norteamericanas Nos. 5,565,332 y 5,573,905.

Como se discutió anteriormente, los anticuerpos humanos pueden también generarse mediante células B activadas *in vitro* (véase las Patentes Norteamericanas Nos. 5,567,610 y 5,229,275).

Los anticuerpos HER2 humanos se describen en la Patente Norteamericana No. 5,772,997 emitida el 30 de Junio de 1998 y la 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 comprenden una o

más regiones de enlace de antígenos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron vía digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ahora producirse directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse a partir de las genotecas de fago de anticuerpos discutidas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab´-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo a otro método, los fragmentos F(ab´)2 pueden aislarse directamente de cultivo de células huésped recombinante. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán aparentes para aquellos practicantes expertos. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento de una sola cadena Fv (scFv). Véase WO 93/16185; la Patente Norteamericana No. 5,571,894; y la Patente Norteamericana No. 5,587,458. El fragmento del anticuerpo puede también ser un anticuerpo lineal por ejemplo, como el que se describe en la Patente Norteamericana No. 5,641,870 por ejemplo. Tales fragmentos del anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

*(vi) Anticuerpos Biespecíficos*

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de enlace para al menos dos diferentes epítopes. Anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden enlazar a dos epítopes diferentes de la proteína HER2. Otros de tales anticuerpos pueden combinar un sitio de enlace del HER2 con un sitio (s) de enlace para el EGFR, HER3 y/o HER4. Alternativamente, un brazo HER2 puede ser combinado con un brazo que enlaza a una molécula activadora en un leucocito tal como una molécula del receptor de células T (por ejemplo, CD2 o CD3) o receptores Fc para el IgG (FcγR), tales como el FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y el FcγRIII (CD16) a fin de enfocar mecanismos de defensa celular a la célula que expresa el HER2. Los anticuerpos biespecíficos pueden también usarse para localizar agentes citotóxicos a células que expresan el HER2. Estos anticuerpos poseen un brazo de enlace del HER2 y un brazo que enlaza el agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferon-α, vinca alcaloide, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno de isótopo radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud total o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

La WO 96/16673 describe un anticuerpo HER2/FcγRIII biespecífico y la Patente Norteamericana No. 5,837,234

divulga un anticuerpo IDM1 (Osidem) HER2/FcγRI biespecífico. Un anticuerpo HER2/Fcα biespecífico se muestra en WO98/02463. La Patente Norteamericana No. 5,821,337 muestra un anticuerpo HER2/CD3 biespecífico. El MDX-210 es un Ab HER2-FcγRIII biespecífico.

Métodos para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidos en el arte. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud total se basan en la coexpresión de dos pares de cadena pesada- cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpos, de las cuales únicamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, la cual usualmente se hace por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante pesada y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares se divulgan en WO 93/08829, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo a un método, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de enlace deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de cadena de inmunoglobulina. La fusión

es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte del finge, regiones CH2 y CH3. Es preferido tener la primera región (CH1) constante de cadena pesada que contiene el sitio necesario para el enlace de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan en un organismo huésped conveniente. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones cuando proporciones desiguales de las tres cadenas de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo. Es sin embargo, posible insertar las secuencias de codificación para dos o todas las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en proporciones iguales resulta en rendimientos altos o cuando las proporciones no son de importancia particular.

En una realización particular de este procedimiento, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina hibrida con una primera especificidad de enlace en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina hibridas

(proporcionando una segunda especificidad de enlace) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, mientras que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en únicamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Este método se divulga en WO 94/04690. Para mayores detalles de la generación de los anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo a otro procedimiento descrito en la Patente Norteamericana No. 5,731,168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos puede ser diseñada por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que son recuperados a partir de cultivo celular recombinante. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la interfaz de la primera molécula del anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptofano). Se crean "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la cadena (s) lateral grande en la interfaz de la segunda molécula del anticuerpo remplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con unas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona

un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos han, por ejemplo, sido propuestos para designar células del sistema inmune a células no deseadas (Patente Norteamericana No. 4,676,980) y para el tratamiento de la infección del VIH (WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden hacerse usando cualquier método de reticulación conveniente. Agentes de reticulación convenientes son bien conocidos en el arte y están divulgados en la Patente Norteamericana No. 4,676,980, con un número de técnicas de reticulación.

Técnicas para la generación de anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también han sido descritos en la literatura. Por ejemplo, anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando unión química. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describe un procedimiento en donde anticuerpos intactos son proteolíticamente desdoblados para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en la presencia del agente de complejo de ditiol arsenito de sodio para estabilizar ditioles vecinales y prevenir la

formación de disulfuro intramolecular. Los fragmentos Fab´ generados son entonces convertidos a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab´-TNB se vuelve a convertir entonces al Fab´-tiol mediante la reducción con mercaptoetileamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab´-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de las enzimas.

Progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab´-SH a partir de *E. coli*, los cuales pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula del anticuerpo $F(ab')_2$ biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento Fab´ se secreto de manera separada a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo especifico así formado fue capaz de enlazar a células que sobreexpresan el receptor HER2 y a células T humanas normales, además de activar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra objetivos de tumor de seno humano.

También se han descrito varias técnicas para hacer y aislar anticuerpos biespecíficos directamente de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, anticuerpos biespecíficos

se han producido usando cierres de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cierre de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazan a porciones Fab´ de dos diferentes anticuerpos mediante fusión de gen. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron a la región de articulación para formar monómeros y entonces se re-oxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros del anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio ($V_H$) variable de cadena pesada conectado a un dominio ($V_L$) variable de cadena ligera por un reticulador que es demasiado corto para permitir apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. De conformidad, los dominios $V_H$ y $V_L$ de un fragmento son forzados a aparearse con los dominios $V_L$ y $V_H$ complementarios de otro fragmento, formado por medio de esto dos sitios de enlace de antígeno. Otra estrategia para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso dímeros Fv de una sola cadena (sFv) también han sido reportados. Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, anticuerpos triespecíficos pueden

prepararse. Tutt *et al. J. Immunol.* 147: 60 (1991).

*(vii) Otras modificaciones de la secuencia del aminoácido*

Aquí se contempla la modificación (es) de la secuencia del aminoácido. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de enlace y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Variantes de la secuencia del aminoácido se preparan introduciendo cambios de nucleótido apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo o por síntesis del péptido. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias del aminoácido del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se hace para llegar a la estructura final, con la condición que el producto final posea las características deseadas. Los cambios del aminoácido también pueden alterar procesos de post-traslación del anticuerpo, tales como el cambio del número o posición de sitios de glicosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis es llamado "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe por Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). Aquí, un residuo o grupo de residuos objetivo son identificados (por ejemplo, residuos cargados como arg, asp, his, lys, y glu) y remplazados por un

aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a la sustitución se refinan entonces introduciendo más u otras variantes en, o por, los sitios de sustitución. Así, mientras que el sitio para introducir una variación de la secuencia del aminoácido se predetermina, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita predeterminarse. Por ejemplo, para analizar el funcionamiento de una mutación en un sitio dado, se conduce a la mutagénesis aleatoria o de exploración en el codón objetivo o región y las variantes del anticuerpo expresadas se seleccionan para la actividad deseada.

Inserciones de la secuencia del aminoácido incluyen fusiones de terminal amino y/o carboxilo que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen un centenar o más residuos, además de inserciones de intrasecuencia de residuos de un solo o múltiples aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen anticuerpos con un residuo de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a una polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión al término N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, ADEPT) o a un polipéptido que incrementa la vida media del suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución del aminoácido. Estas variantes tienen al menos un residuo del aminoácido en la molécula del anticuerpo remplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero las alteraciones de RF están también contempladas. Sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones resultan en un cambio en la actividad biológica, entonces más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1 o como se describe más abajo con referencia a las clases de aminoácidos, pueden introducirse y los productos seleccionarse.

**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 substanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo son logradas seleccionando las substituciones que difieren perceptiblemente en su efecto sobre mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en la área de la substitución, por ejemplo, como una conformación laminar o en espiral, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio del objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo a similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, in *Biochemistry*, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) no polar: Ala (a), Val (v), Leu (l), Ile (I), Pro (p), Phe (f), Trp (W), Met (M)

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

(3) ácido: ASP (D), Glu (E)

(4) básica: Lys (K), Arg (R), His (H)

Alternativamente, los residuos que se dan de manera natural se pueden dividir en grupos basados en las propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrofóbico: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácido: ASP, Glu;

(4) básico: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influencian la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

Las substituciones no conservadoras ocasionarán intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína no involucrado en mantener la conformación apropiada del anticuerpo también se puede sustituir, generalmente con serina, para perfeccionar la estabilidad oxidativa de la molécula y para prevenir la reticulación aberrante. Contrariamente, el enlace (s) de cisteína se puede agregar al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante sustitutivo implica sustituir unos o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo paternal (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante (s) resultante seleccionada a desarrollar tendrá propiedades biológicas mejoradas con relación al anticuerpo paternal a partir del cual ellos se generaron. Una manera conveniente para generar tales variantes sustitutivas implica la maduración de la afinidad usando el despliegue del fago. Brevemente, varios sitios de región hipervariables (por

ejemplo, sitios 6-7) son mutados para generar todas las substituciones amino posibles en cada sitio. Las variantes del anticuerpo generadas así son exhibidas en una manera monovalente de partículas de fago filamentosas como fusiones al producto del gene III de M13 empacado dentro de cada partícula. Las variantes de fago exhibidas son entonces seleccionadas por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de enlace) como se divulga aquí. Para identificar los sitios de región hipervariables candidatos para la modificación, la mutagénesis de exploración de la alanina se puede realizar para identificar residuos de regiones hipervariables que contribuyen significativamente al enlace del antígeno. Alternativamente, o de manera adicional, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el HER2 humano. Tales residuos de contacto y los residuos vecinos son candidatos para la substitución de acuerdo a las técnicas elaboradas aquí. Una vez que se generen tales variantes, el panel de variantes se somete a selección como se describe aquí y los anticuerpos con las propiedades superiores en unos o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para el desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del

anticuerpo. Alterar se refiere a eliminar uno o más radicales de carbohidratos encontrados en el anticuerpo, y/o agregar uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de los anticuerpos es típicamente ya sea N-enlazada u O-enlazada. N-enlazada se refiere a la unión del radical del carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina del tripéptido, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del radical del carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias del tripéptido en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. La glicosilación O-enlazada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-aceilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un ácido hidroxamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de los sitios de glicosilación al anticuerpo es lograda convenientemente alterando la secuencia del aminoácido tal que esta contiene una o más de las secuencias del tripéptido anteriormente descritas (para los sitios de glicosilación N-enlazados). La alteración también se puede hacer por la adición de, o la substitución por, uno o más residuos de serina o de treonina a la secuencia del

anticuerpo original (para los sitios de glicosilación O-enlazados).

Donde el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a la misma puede ser alterado. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo son descritos en la Solicitud de Patente Norteamericana No. 2003/0157108 A1, Presta, L. Véase también US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) de bisección en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo se les hace referencia en WO03/011878, Jean-Mairet *et al.* y la Patente Norteamericana No. 6,602,684, Umana *et al.* Anticuerpos con por lo menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se reportan en WO97/30087, Patel *et al.* Véase también, WO98/58964 (Raju, S.) y WO99/22764 (Raju, S.) referentes a anticuerpos con el carbohidrato alterado unido a la región Fc del mismo.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, a fin de realzar la citotoxicidad mediada por la célula dependiente del antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede lograrse introduciendo una o más substituciones del aminoácido en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente

o de manera adicional, el residuo (s) de cisteína se puede introducir en la región Fc, permitiendo de tal modo la formación de enlace disulfuro de intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener capacidad de internalization mejorada y/o eliminación celular mediada por el complemento incrementada y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad anti-tumor reforzada se pueden también preparar usando reticuladores heterobifuncionales de acuerdo a lo descrito en Wolff *et al. Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, un anticuerpo se puede diseñar por ingeniería, el cual tiene regiones Fc dobles y puede tener de tal modo lisis de complemento realzada y capacidades de ADCC. Véase Stevenson *et al. Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

El documento WO00/42072 (Presta, L.) describe anticuerpos con función de ADCC mejorada en la presencia de células efectoras humanas, donde los anticuerpos comprenden substituciones de aminoácido en la región Fc del mismo. Preferiblemente, el anticuerpo con ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de residuos). Preferiblemente la región Fc alterada es una región Fc IgG1 humana que

comprende o que consiste de sustituciones en una, dos o tres de estas posiciones. Tales substituciones se combinan opcionalmente con la substitución (s) que aumenta la unión del C1q y/o la CDC.

Anticuerpos con enlace C1q alterado y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) se describen en WO99/51642, Patente Norteamericana No. 6,194,551B1, Patente Norteamericana No. 6,242,195B1, Patente Norteamericana No. 6,528,624B1 y Patente Norteamericana No. 6,538,124 (Idusogie *et al.*). Los anticuerpos comprenden una substitución del aminoácido en una o más de las posiciones 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 del aminoácido y/o 334 de la región Fc del mismo (numeración Eu de residuos).

Para incrementar la vida media del suero del anticuerpo, uno puede incorporar un epítope de enlace del receptor de recuperación en el anticuerpo (especialmente un fragmento del anticuerpo) de acuerdo a lo descrito en la Patente Norteamericana 5,739,277, por ejemplo. De acuerdo a como se utiliza aquí, el término "epítope de enlace del receptor de recuperación" se refiere a un epítope de la región Fc de una molécula del IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) que es responsable de aumentar la vida media del suero *in vivo* de la molécula de IgG.

Anticuerpos con enlace al receptor Fc neonatal (FcRn) mejorado, y vidas medias incrementadas, se describen

en WO00/42072 (Presta, L.) y US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con unas o más substituciones en esta las cuales mejoran el enlace de la región Fc a la FcRn. Por ejemplo, la región Fc puede tener substituciones en una o más de las posiciones 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 o 434 (numeración Eu de residuos). La variante del anticuerpo que comprende la región Fc preferida con enlace a la FcRn mejorado comprende substituciones del aminoácido en una, dos o tres de las posiciones 307, 380 y 434 de la región Fc del mismo (numeración Eu de residuos).

Los anticuerpos diseñados por ingeniería con tres o más (preferiblemente cuatro) sitios de enlace del antígeno funcionales también se contemplan (Solicitud Norteamericana No. US2002/0004587 A1, Miller *et al.*).

Las moléculas de ácido nucleicos que codifican las variantes de la secuencia del aminoácido del anticuerpo son preparadas por una variedad de métodos conocidos en el arte. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias del aminoácido que ocurren de manera natural) o preparación por mutagénesis mediada por el oligonucleótido (o dirigida en el sitio), mutagénesis de PCR, y mutagénesis de casete de una variante anteriormente preparada o una versión no variante

del anticuerpo.

*(viii) Selección de anticuerpos con las propiedades deseadas*

Técnicas para generar los anticuerpos se han descrito anteriormente. Uno puede seleccionar además anticuerpos con ciertas características biológicas, según se desee.

Para identificar un anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER, puede determinarse la capacidad del anticuerpo para bloquear el enlace del ligando HER a las células que expresan el receptor HER (por ejemplo, en conjugación con otro receptor HER con el cual el receptor HER de interés forma un hetero-oligómero HER). Por ejemplo, las células que expresan naturalmente, o que se transfectan para expresar, receptores HER del hetero-oligómero HER se pueden incubar con el anticuerpo y después exponerse a un ligando HER etiquetado. La capacidad del anticuerpo para bloquear el enlace del ligando al receptor HER en el hetero-oligómero HER puede entonces ser evaluada.

Por ejemplo, la inhibición del enlace del HRG a las líneas de células tumorales de seno MCF7 por los anticuerpos HER2 se puede realizar usando cultivos de MCF7 de monocapa en hielo en un formato de placas de 24 cavidades esencialmente según lo descrito en WO01/00245. Los anticuerpos

monoclonales HER2 se pueden agregar a cada cavidad e incubarse por 30 minutos. Se puede entonces agregar rHRG$\beta 1_{177-224}$ $^{125}$I-etiquetado (25 pm), y la incubación se puede continuar por 4 a 16 horas. Las curvas de reacción a la dosis pueden ser preparadas y un valor $IC_{50}$ se puede calcular para el anticuerpo de interés. En una realización, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER tendrá un $IC_{50}$ para inhibir el enlace del HRG a las células MCF7 en este análisis de alrededor de 50nM o de menos, más preferiblemente 10nM o menos. Donde el anticuerpo es un fragmento del anticuerpo tal como un fragmento Fab, el $IC_{50}$ para inhibir el enlace del HRG a las células MCF7 en este análisis puede, por ejemplo, ser de aproximadamente 100nM o menos, preferiblemente 50nM o menos.

Alternativamente, o además, puede evaluarse la capacidad de un anticuerpo para bloquear la fosforilación de la tirosina estimulada por el ligando HER de un receptor HER presente en un hetero-oligómero HER. Por ejemplo, las células que expresan de manera endógena los receptores HER o transfectados para expresarlos se pueden incubar con el anticuerpo y después analizar su actividad de fosforilación de la tirosina dependiente del ligando HER usando un monoclonal anti-fosfotirosina (que se conjuga opcionalmente con una etiqueta detectable). El ensayo de la activación del receptor de la cinasa descrito en la Patente Norteamericana

No 5,766,863 esta también disponible para determinar la activación del receptor HER y bloquear aquella actividad por un anticuerpo.

En una realización, uno puede seleccionar un anticuerpo que inhiba el estímulo del HRG de la fosforilación de la tirosina p180 en las células MCF7 esencialmente de acuerdo a lo descrito en WO01/00245. Por ejemplo, las células MCF7 se pueden colocar en placas en placas de 24 cavidades y los anticuerpos monoclonales para el HER2 se pueden agregar a cada cavidad e incubarse por 30 minutos a temperatura ambiente; entonces se puede agregar rHRG$\beta 1_{177-244}$ a cada cavidad a una concentración final de 0.2 nM, y la incubación se puede continuar por 8 minutos. Se puede aspirar el medio de cada cavidad, y las reacciones se pueden detener mediante la adición del 100 $\mu$l del amortiguador de la muestra de SDS (SDS al 5%, 25 mM DTT, y 25 mM de Tris-HCl, pH 6.8). Cada muestra ($\mu$l 25) se puede someter a electrofóresis en un gel (Novex) de gradiente de 4-12% y entonces transferirse electroforéticamente a la membrana de difluoruro de polivinilideno. Los inmunomanchados de antifosfotirosina (en 1 $\mu$g/ml) se pueden desarrollar, y la intensidad de la banda reactiva predominante en M. - 180,000 se puede cuantificar por densitometría de la reflexión. El anticuerpo seleccionado inhibirá preferiblemente de manera significativa el estímulo del HRG de la fosforilación de la tirosina del

p180 por aproximadamente 0-35% de control en este ensayo. Una curva de la respuesta a la dosis para la inhibición del estímulo del HRG de la fosforilación de la tirosina p180 de acuerdo a lo determinado por densitometría de la reflexión puede ser preparada y puede calcularse un $IC_{50}$ para el anticuerpo del interés. En una realización, el anticuerpo que bloquea la activación del ligando de un receptor HER tendrá un $IC_{50}$ para inhibir el estímulo del HRG de la fosforilación de la tirosina p180 en este análisis de aproximadamente 50nM o de menos, mas preferiblemente de 10nM o menos. Donde el anticuerpo es un fragmento del anticuerpo tal como un fragmento Fab, el $IC_{50}$ para inhibir el estímulo del HRG de la fosforilación de la tirosina p180 en este análisis puede, por ejemplo, ser de aproximadamente 100nM o menos, más preferiblemente de 50nM o menos.

Se pueden también evaluar los efectos inhibitorios del crecimiento del anticuerpo en las células MDA-MB-175, por ejemplo, esencialmente de acuerdo a lo descrito en Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394 (1997). Según este análisis, las células MDA-MB-175 se pueden tratar con un anticuerpo monoclonal HER2 (10$\mu$g/mL) por 4 días y teñirse con violeta cristalina. La incubación con un anticuerpo HER2 puede mostrar a un efecto inhibitorio del crecimiento sobre esta línea de células similar a aquella exhibida por el anticuerpo monoclonal 2C4. En otra realización, el HRG exógeno no

invertirá de manera significativa esta inhibición. Preferiblemente, el anticuerpo podrá inhibir la proliferación celular de las células MDA-MB-175 a un mayor grado que el anticuerpo monoclonal 4D5 (y opcionalmente a un mayor grado que el anticuerpo monoclonal 7F3), ambos en la presencia y la ausencia de HRG exógeno.

En una realización, el anticuerpo HER2 de interés puede bloquear la asociación dependiente de la heregulina del HER2 con el HER3 en ambas células MCF7 y SK-BR-3 de acuerdo a lo determinado en un experimento de co-inmunoprecipitación tal como el que se describe en WO01/00245 substancialmente de manera más efectiva que el anticuerpo monoclonal 4D5, y preferiblemente de manera substancialmente más efectiva que el anticuerpo monoclonal 7F3.

Para identificar los anticuerpos HER2 inhibitorios del crecimiento, uno puede seleccionar anticuerpos que inhiben el incremento de células cancerígenas que sobreexpresan el HER2. En una realización, el anticuerpo inhibitorio del crecimiento de elección es capaz de inhibir el crecimiento de las células SK-BR-3 en cultivo celular por aproximadamente 20-100% y preferiblemente por aproximadamente 50-100% a una concentración del anticuerpo de aproximadamente 0.5 a 30 μg/ml. Para identificar tales anticuerpos, puede realizarse el análisis SK-BR-3 descrito en la Patente Norteamericana No 5,677,171. Según este análisis, las

células SK-BR-3 se crecen en una mezcla 1:1 de medio F12 y DMEM complementada con suero vacuno fetal al 10%, glutamina y estreptomicina de penicilina. Las células SK-BR-3 se colocan en placas a 20,000 células en un plato de cultivo celular de 35mm (plato de 2mls/35mm). Se agregan 0.5 a 30 μg/ml del anticuerpo HER2 por plato. Después de seis días, el número de células, comparadas a las células no tratadas, se cuentan usando un contador de células COULTERJ electrónico. Aquellos anticuerpos que inhiben el crecimiento de las células SK-BR-3 por aproximadamente 20-100% o cerca de 50-100% se pueden seleccionar como anticuerpos inhibitorios del crecimiento. Véase la Patente Norteamericana No. 5,677,171 para los análisis para la selección de anticuerpos inhibitorios del crecimiento, tales como el 4D5 y el 3E8.

Para seleccionar para los anticuerpos que inducen apoptosis, un análisis de enlace de anexina que usa las células BT474 está disponible. Las células BT474 se cultivan y se siembran en platos de acuerdo a lo discutido en el párrafo precedente. El medio entonces se quita y se reemplaza con medio fresco solo o medio que contiene 10μg/ml del anticuerpo monoclonal. Después de un período de incubación de tres días, los monocapas se lavan con PBS y separan mediante tripsinización. Las células después se centrifugan, se vuelven a suspender en amortiguador de enlace de $Ca^{2+}$ y se toman alícuotas en tubos de acuerdo a lo

discutido anteriormente para el análisis de muerte celular. Los tubos entonces reciben la anexina etiquetada (por ejemplo, V-FTIC de anexina) (1μg/ml). Las muestras se pueden analizar usando un citómetro de flujo FACSCANJ y un programa de computadora CellQuest de FACSCONVERTJ (Becton Dickinson). Aquellos anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de enlace de anexina con relación a un control se seleccionan como anticuerpos que inducen apoptosis. Además del análisis de enlace de anexina, un ensayo de teñido de ADN que usa las células BT474 está disponible. Para realizar este análisis, las células BT474 que se han tratado con el anticuerpo de interés como se describió en los dos párrafos precedentes se incuban con 9μg/ml de HOECHST 33342J por 2 horas a 37°C, después se analizan en un citómetro de flujo EPICS ELITEJ (Coulter Corporation) que usa el programa de computadora MODFIT LTJ (Verity software House). Los anticuerpos que inducen un cambio en el porcentaje de células apoptóticas que es de 2 veces o mayor (y preferiblemente tres veces o mayor) que las células no tratadas (hasta células 100% apoptóticas) se pueden seleccionar como anticuerpos pro-apoptóticos usando este análisis. Véase WO98/17797 para los análisis para la selección de anticuerpos que inducen apoptosis, tales como el 7C2 y el 7F3.

Para seleccionar anticuerpos que enlazan a un epítope en un enlace HER2 por un anticuerpo de interés, un

análisis de bloqueo cruzado rutinario tal como el que se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), puede realizarse para evaluar si el anticuerpo bloquea el enlace de un anticuerpo, tal como el 2C4 o el pertuzumab, al HER2. Alternativamente, o además, la asignación del epítope se puede realizar por los métodos conocidos en el arte y/o uno puede estudiar la estructura del HER2 del anticuerpo (Franklin *et al. Cancer Cell* 5:317-328 (2004)) para véase qué dominio (s) del HER2 es/son enlazados por el anticuerpo.

*(ix) Composiciones de Pertuzumab*

En una realización de una composición del anticuerpo HER2, la composición comprende una mezcla de un anticuerpo de pertuzumab de la especie principal y uno o más variantes del mismo. La realización preferida aquí de un anticuerpo de las especies principales del pertuzumab es uno que comprende las secuencias del aminoácidos ligeras variables y pesadas variables en las SEC ID Nos. 3 y 4, y más preferiblemente que comprende una secuencia de aminoácido de cadena ligera seleccionada de la SEC ID No 13 y 17, y una secuencia de aminoácido de cadena pesada seleccionada de la SEC ID No. 14 y 18 (incluyendo variantes desamidadas y/o oxidadas de aquellas secuencias). En una realización, la composición comprende una mezcla del anticuerpo de pertuzumab

de la especie principal y una variante de la secuencia del aminoácido del mismo que comprende una extensión líder de terminal amino. Preferiblemente, la extensión líder de terminal amino esta sobre en una cadena ligera de la variante del anticuerpo (por ejemplo, en una o dos cadenas ligeras de la variante del anticuerpo). El anticuerpo HER2 de especie principal o la variante del anticuerpo pueden ser un anticuerpo de longitud total o un fragmento del anticuerpo (por ejemplo, fragmentos Fab de F (ab=)2), pero ambos son preferiblemente anticuerpos de longitud total. La variante del anticuerpo aquí puede comprender una extensión líder de terminal amino en cualquiera de una o más de las cadenas pesadas o ligeras del mismo. Preferiblemente, la extensión líder de terminal amino está en una o dos cadenas ligeras del anticuerpo. La extensión líder de terminal amino preferiblemente comprende o consiste de VHS-. La presencia de la extensión líder de terminal amino en la composición se puede detectar por varias técnicas analíticas que incluyen, pero que no se limitan a, análisis de secuencia N-terminal, análisis para la heterogeneidad de la carga (por ejemplo, cromatografía por intercambio catiónico o electroforesis de la zona capilar), espectrometría de masas, etc. La cantidad de la variante del anticuerpo en la composición generalmente varía de una cantidad que constituye el límite de detección de cualquier análisis (preferiblemente análisis de secuencia

N-terminal) usado para descubrir la variante a una cantidad menor que la cantidad del anticuerpo de la especie principal. Generalmente, aproximadamente 20% o menos (por ejemplo, de aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, por ejemplo a partir de 5% a aproximadamente 15%) de las moléculas del anticuerpo en la composición comprenden una extensión líder de terminal amino. Tales cantidades del porcentaje se determinan preferiblemente usando el análisis de la secuencia N-terminal cuantitativo o el análisis de intercambio catiónico (preferiblemente usando una columna de intercambio catiónico débil de alta resolución, tal como una columna de intercambio catiónico PROPAC WCX-10J). Aparte de la variante de la extensión líder de terminal amino, se contemplan alteraciones adicionales de la secuencia del aminoácido del anticuerpo de la especie principal y/o variantes, incluyendo pero no limitadas a un anticuerpo que comprende un residuo de lisina C-terminal en una o ambas cadenas pesadas del mismo, una variante del anticuerpo desamidado, etc.

Además, el anticuerpo o variante de la especie principal puede comprender variaciones de glicosilación, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen el anticuerpo que comprende una estructura de oligosacárido G1 o G2 unida a la región Fc del mismo, un anticuerpo que comprende un radical de carbohidrato unido a una cadena ligera del mismo

(por ejemplo, uno o dos radicales de carbohidratos, 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 comprende una o dos cadenas pesadas no glicosiladas, o un anticuerpo que comprende un oligosacárido sometido a sialilación unido a una o dos cadenas pesadas del mismo, etc.

La composición se puede recuperar de una línea de células genéticamente diseñada por ingeniería, por ejemplo, una línea de células de Ovario de Hámster Chino (CHO) que expresa el anticuerpo HER2, o se puede preparar por síntesis del péptido.

*(x) Immunoconjugados*

La invención también pertenece a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina de moléculas pequeñas o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fungicida, de plantas o de animales, incluyendo fragmentos y/o variantes de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunoconjugados se han descrito anteriormente. También se contemplan aquí conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una

calicamicina, una maitansina (Patente Norteamericana No. 5,208,020), un tricoteno, y el CC1065.

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

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de calicamicina. La familia de antibióticos de calicamicina es capaz de producir rompimientos de ADN de doble hebra a concentraciones sub-picomolares. Análogos estructurales del calicamicina que pueden ser utilizados incluyen, pero no se limitan a, $\gamma_1^I$, $\alpha_2^I$, $\alpha_3^I$, N-acetil-$\gamma_1^I$, PSAG y $\theta^I_1$ (Hinman *et al. Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993) y Lode *et al. Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)). Véase también las Patentes Norteamericanas Nos. 5,714,586; 5,712,374; 5,264,586; y 5,773,001 expresamente incorporadas aquí como referencia.

Las toxinas y los fragmentos enzimáticamente activas de los mismos que pueden ser utilizados incluyen la cadena de difteria A, fragmentos activos de no enlace de la toxina de la difteria, cadena de la exotoxina A (de

*Pseudomonas aeruginosa*), la cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modecina A, alfa-sarcina, proteínas *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de la carantia momórdica, curcina, crotina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotenos. Veáse, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y una composición con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o un endonucleasa de ADN tal como un deoxiribonucleasa; DNase).

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

Conjugados del anticuerpo y del agente citotóxico se pueden hacer usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tales como el propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como el HCl de dimetil adipimidato), ésteres activos (tales como el suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), composiciones bis-azido (tales como el

hexanodiamina del bis (p-acidobenzoilo)), derivados del bis-diazonio (tales como el bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como el 2,6-diisocianato de tolueno), y composiciones bis-activas de flúor (tales como el 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar de acuerdo a lo descrito en Vitetta *et al. Science* 238: 1098 (1987). El ácido triaminopentaacético de 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno etiquetado con Carbono 14, es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase WO94/11026. El reticulador puede ser un enlazador que se puede desdoblar que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, pueden utilizarse un enlazador de ácido lábil, un reticulador sensible a la peptidasa o un reticulador que contiene disulfuro (Chari *et al. Cancer Research* 52: 127-131 (1992)).

Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y el agente citotóxico se pueden hacer, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o de síntesis del péptido.

Se contemplan aquí otros inmunoconjugados. Por ejemplo, el anticuerpo se puede enlazar a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de

polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede ser atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente), en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington´s Pharmaceutical Sciences, 16va edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Los anticuerpos descritos aquí también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por los métodos conocidos en la técnica, tales como se describen en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci, EEUU, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU, 77:4030 (1980); Las Patentes Norteamericanas Nos. 4,485,045 y 4,544,545; y WO97/38731, Publicadas el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se describen en la Patente Norteamericana No. 5,013,556.

Los liposomas particularmente útiles se pueden generar por el método de evaporación en fase invertida con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros de tamaño de

poro definidos para dar liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) vía una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está contenido opcionalmente dentro de los liposomas. Véase Gabizon et al., J. Nacional Cancer Inst. 81(19)1484 (1989).

**III. Métodos de diagnóstico**

En un primer aspecto, la invención de aquí proporciona un método para seleccionar una terapia, para un paciente con un tipo de cáncer (por ejemplo, cáncer ovárico) el cual puede responder a un inhibidor de HER o un inhibidor de la dimerización de HER (por ejemplo, el pertuzumab) que comprende determinar la expresión de HER3 en una muestra del cáncer del paciente y seleccionar un inhibidor de la dimerización de HER como la terapia si la muestra de cáncer expresa HER3 a niveles menores que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer y/o si la muestra de cáncer expresa HER2:HER3 a un nivel, el cual es mayor que el 25 por ciento (o mayor que el nivel de la mediana) para la expresión de HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para seleccionar una terapia para un paciente con un

tipo de cáncer (por ejemplo, cáncer ovárico) el cual pueda responder a un agente quimioterapéutico, que comprende determinar la expresión de HER3 en una muestra del cáncer del paciente y seleccionar un agente quimioterapéutico (por ejemplo, gemcitabina) como la terapia, si la muestra de cáncer expresa el HER3 a un nivel mayor que el nivel de la mediana para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

La mediana o el nivel de expresión porcentaje se puede determinar esencialmente al mismo tiempo que se mide la expresión de HER3 (o la expresión de HER2 y HER3), o se puede haber determinado previamente.

Antes de los métodos terapéuticos descritos abajo, se evalúa el o los niveles de expresión de HER3, y opcionalmente el o los niveles de expresión de HER2. Por lo general, se obtiene una muestra biológica del paciente en necesidad de la terapia, la cual muestra se somete a uno o más ensayos de diagnóstico, usualmente al menos un ensayo de diagnóstico in vitro (IVD). Sin embargo, aquí se contemplan expresamente otra formas para evaluar la expresión de HER2 y/o de HER2, tales como el diagnóstico in vivo. La muestra biológica es usualmente una muestra del tumor, preferiblemente una muestra de un tumor de cáncer ovárico, cáncer peritoneal, cáncer de las trompas de Falopio. Cáncer de pecho metastático (MBC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de próstata, o cáncer colorectal.

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

Los varios métodos para determinar la expresión del ARNm o la proteína incluyen, pero no se limitan a, perfilado de expresión genética, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que incluye PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), análisis de microarreglos, análisis en serie de expresión de genes (SAGE), MassARRAY, Análisis de Expresión de Genes por Secuenciamiento de Signatura Masivamente Paralela (MPSS), proteómica, inmunohistoquímica (IHC), etc. Preferiblemente se cuantifica el ARNm. Tal análisis de ARNm se realiza preferiblemente usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por análisis de microarreglos. Cuando se emplea la PCR, una forma preferida de PCR es la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). El ensayo de qRT-PCR preferido es aquel como se describe en el Ejemplo 1 a continuación.

Los pasos de un protocolo representativo para perfilar la expresión de genes usando tejidos fijados, insertados en parafina como la fuente de ARN, incluyen el aislamiento del ARN, la purificación, extensión de cebadores y la amplificación, se dan en varios artículos publicados en revistas (por ejemplo, Godfrey et al., J. Molec. Diagnostics 2:84-91 (2000); Specht et al., Am. J. Pathol 158: 419-29

(2001)). Brevemente, un proceso representativo comienza cortando secciones de aproximadamente 10 microgramos de las muestras de tejido tumoral insertadas en parafina. El ARN se extrae entonces y se extrae la proteína y el ADN. Después del análisis de la concentración del ARN, se pueden incluir pasos de reparación y/o amplificación de ARN, si es necesario, y el ARN se transcribe a la inversa usando los promotores de genes específicos seguido por PCR. Finalmente, los datos se analizan para identificar la o más mejores opciones de tratamiento disponibles para el paciente, sobre la base del patrón de expresión genética característica identificada en la muestra del tumor examinado.

Varios métodos ejemplificantes para determinar la expresión genética se describirán ahora con más detalle.

*(i) Perfilado de la Expresión Genética*

En general, los métodos de perfilado de la expresión genética se pueden dividir en dos grandes grupos; los métodos basados en el análisis de hibridación de polinucleótidos, y los métodos basados en el secuenciamiento de los polinucleótidos. Los métodos usados más comúnmente conocidos en la técnica para la cuantificación de la expresión del ARNm en una muestra incluyen la transferencia northern y la hibridación in situ (Parker & Barnes, Methods in Molecular Biology 106:247-283 (1999)); ensayos de

protección de RNAsa (Hod, Biotechniques 13:852-854 (1992)); y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Weis et al., Trenes in Genetics 8:263-264 (1992)). Alternativamente se pueden emplear anticuerpos que reconozcan los duplos específicos. Incluyendo duplos de ADN, duplos de ARN, y duplos híbridos de ADN-ARN o duplos de ADN-proteína. Los métodos representativos para los análisis de expresión de genes basados en le secuenciamiento incluyen el Análisis en Serie de la Expresión Genética (SAGE), y el análisis de la expresión genética por secuenciamiento de signatura paralela masivamente (MPSS).

*(ii) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*

De las técnicas listadas arriba, un método cuantitativo sensible y flexible es la PCR, la cual se puede usar para comparar los niveles de ARN en diferentes poblaciones de muestra, en los tejidos normales y tumorales, con o sin tratamiento con fármacos, caracterizar los patrones de expresión genética, discriminar entre los ARNm relacionados cercanamente y analizar la estructura del ARN.

El primer paso es el aislamiento del ARNm de una muestra objetivo. El material inicial es típicamente el ARN total aislado de tumores humanos o líneas de células tumorales, y los tejidos o las líneas celulares normales correspondientes, respectivamente. Por lo tanto el ARN se

puede aislar de una variedad de tumores primario, incluyendo tumores o líneas celulares de tumores de pecho, pulmón, colon, próstata, cerebro, hígado, riñones, páncreas, bazo, timo, testículos, ovarios, útero, etc., con el ADN reunido de donadores saludables. Si la fuente de ARNm es un tumor primario, el ARNm puede ser extraído, por ejemplo, de muestras de tejido congeladas o archivadas insertadas en parafina y fijadas (por ejemplo, fijadas en formalina). Los métodos generales para la extracción de ARNm son bien conocidos en la técnica y se describen en los libros de texto estándar de biología molecular, incluyendo Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, john wiley and Sons (1997). Los métodos para la extracción del ARN de los tejidos insertados en parafina se describen, por ejemplo, en Rupp y Locker, Lab Invest 56:A67 (1987), y De Andrés et al., BioTechniques 18:42044 (1985). En particular, el aislamiento del ARN se puede realizar usando un equipo de purificación, un conjunto de amortiguadores y proteasa de fabricantes comerciales, tales como Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, el ARN total de las células en cultivo se puede aislar usando minicolumnas RNeasy de Qiagen. Otros equipos de aislamiento de ARN disponibles comercialmente incluyen, el Equipo de Purificación de ADN y ARN Completo MASTERPURE® (EPICENTRE®. Madison. Wis.) y el Equipo de Aislamiento de ARN del Bloque

de Parafina (Ambion. Inc.). El ARN total de las muestras de tejido se puede aislar usando el ARN Stat-60 (Tel-Test). El ARN preparado del tumor se puede aislar, por ejemplo, por ejemplo, por centrifugación por gradiente de densidad de cloruro de cesio.

Como el ARN no sirve como una plantilla para la PCR, el primer paso en el perfilado de la expresión genética por PCR es la transcripción invertida de la plantilla de ARN en ADNc, seguido por su amplificación exponencial en una reacción de PCR. Las dos transcriptasas inversas usadas comúnmente son la transcriptasa inversa del virus de mieloblastosis avilo (AMV-RT) y la transcriptasa inversa del virus de leucemia de murino de Molones (MMLV-RT). El paso de transcripción invertida se ceba típicamente usando cebadores específicos, hexámeros aleatorios, o cebadores de oligo-dT, dependiendo de las circunstancias y del objetivo del perfilado de la expresión. Por ejemplo, el ARN extraído puede ser transcrito de manera inversa usando el equipo de RNA PCR GENEAMP™ (Perkin elmer, Calif. EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc derivado se puede usar entonces como una plantilla en la reacción de PCR subsecuente. Aunque el paso de PCR usa una variedad de polimerasas de ADN dependientes de ADN termoestable, esta típicamente emplea la polimerasa de ADN Taq, la cual tiene actividad de nucleasa 5'-3-' pero carece de actividad de

endonucleasas de corrección 3'-5'. Por lo tanto, la PCR TAQMAN® típicamente utiliza la actividad de la 5'-endonucleasa de la polimerasa Taq o Tth para hidrolizar una sonda de hibridación enlazada a su amplicón objetivo, pero se puede usar cualquier enzima con la actividad de la 5' endonucleasa equivalente. Dos oligonucleótidos se usan para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Un tercer oligonucleótido o sonda, se diseña para detectar la secuencia de nucleótidos localizada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no es extensible por la enzima Taq ADN polimerasa, y se etiqueta con un tinte fluorescente reportero y un tinte apagador fluorescente. Cualquier emisión inducida por láser del tinte reportero se apaga por el tinte de apagado cuando los dos tintes se acercan, ya que estos están en la sonda. Durante la reacción de amplificación, la enzima Taq ADN polimerasa divide la sonda en una manera dependiente de la plantilla. Los fragmentos de sonda resultantes se disocian en solución, y la señal del tinte reportero liberado está libre del efecto de apagado del segundo fluoróforo. Una molécula de tinte reportero se libera por cada nueva molécula sintetizada, y la detección de tinte reportero no apagado proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

La PCR TAQMAN® se puede realizar usando el equipo disponible comercialmente, tales como, por ejemplo, ABI Prism

770 Sequence Detection System® (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, Calif., EEUU), o un Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). En una realización preferida, el procedimiento de la nucleasa 5' se corre en un dispositivo de PCR cuantitativa en tiempo real tal como el ABI PRISM 7700® Sequence Detection System. El sistema consiste de un termociclo, láser, un dispositivo acoplado a la carga (CCD), cámara y computadora. El sistema amplifica las muestras en un formato de 96 pozos en un termociclo. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por el láser se colecta en tiempo real a través de cables de fibra óptica para todas las 96 placas, y se detecta en el CCD. El sistema incluye un programa informático para correr el instrumento y para analizar los datos.

Los datos del ensayo de 5'-Nucleasa se expresan inicialmente como Ct, o el ciclo umbral. Como se discute arriba, los valores de fluorescencia se registran durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado a este punto en la reacción de amplificación. El punto cuando la señal fluorescente se registra primero como estadísticamente significativa es el ciclo del umbral (Ct).

Para minimizar los errores y el efecto de las variaciones muestra a muestra, la PCR se realiza usualmente usando un estándar interno. El estándar interno ideal se expresa a un nivel constante entre diferentes tejidos, y no

se ve afectado por el tratamiento experimental. Los ARNs usados más frecuentemente para normalizar los patrones de la expresión genética son los ARNm para los genes de mantenimiento gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la P-actina.

Una variación más reciente de la técnica de PCR es la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), la cual mide la acumulación del producto de PCR a través de una sonda fluorigénica con etiquetado doble (es decir, la sondas TQMAN®). La PCR en tiempo es compatible con la PCR competitiva cuantitativa, donde el competidor interno para cada objetivo se usa para la normalización y con la PCR comparativa cuantitativa que usa el gen de normalización contenido dentro de la muestra, o un gen de mantenimiento para PCR. Para más detalles véase, por ejemplo, Held et al., Genome Research 6:986,994(1996).

Los pasos de un protocolo representativo para el perfilado de la expresión genética usando tejidos insertados en parafina fijados, como la fuente de ARN, que incluyen el aislamiento de ARNm, la purificación, la extensión de cebadores, y la amplificación, se dan en varios artículos publicados en revistas (por ejemplo, Godfrey et al., J. Molec. Diagnostics 2:84-91 (2000); Specht et al., Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001)). Brevemente, un proceso representativo inicia cortando secciones gruesas de

aproximadamente 10 microgramos de las muestras de tejido tumoral insertadas en parafina. El ARN se extrae entonces, y la proteína y el ADN se extraen. Después del análisis del la concentración de ARN, se pueden incluir pasos de reparación y/o amplificación de ARN, si es necesario, y el ARN se transcribe de manera invertida usando los promotores específicos, seguido por PCR.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, los cebadores de PCR y las sondas se diseñan con base en las secuencias intrónicas presentes en el gen a ser amplificado. En esta realización, el primer paso en el diseño del cebador/sonda es la delineación de las secuencias intrónicas dentro de los genes. Esto se puede hacer mediante los programas informáticos disponibles públicamente, tales como el programa informático DNA BLAT desarrollado por Kent, W., *Genome Res.* 12(4):656-64 (2002), o por el programa informático BLAST que incluye sus variaciones. Los pasos subsecuentes siguen los métodos bien establecidos del diseño de cebadores y sondas de PCR.

Con el fin de evitar las señales no específicas, es importante enmascarar las secuencias repetitivas dentro de los intrones cuando se diseñan los cebadores y las sondas. Esto se puede realizar fácilmente usando el programa Repeat Master disponible en línea a través del Baylos Collage of Medicine, el cual selecciona las secuencias de ADN contra una

genoteca de elementos repetitivos y regresa una secuencia de consulta en la cual se ocultan los elementos repetitivos. Las secuencias intrónicas enmascaradas se pueden usar entonces para diseñar las secuencias de los cebadores y las sondas usando los paquetes de diseño de cebadores/sondas disponibles comercialmente o disponibles públicamente de otra manera, tales como Primer Express (Applied Biosystems); MGB assay-by-design (Applied Biosystems); Primer3 (Rozen y Skaletsky (2000) Primer3 en la WWW para usuarios generales y para programadores biológicos. Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, N.J., pp 365-386).

Los factores considerados en el diseño de cebadores de PCR incluyen la longitud del cebador, la temperatura de fusión (Tm), y el contenido de g/C, la especificidad, las secuencias de los cebadores complementarios, y la secuencia del extremo 3'. En general los cebadores de PCR óptimos tienen por lo general 17-30 bases de longitud, y contienen aproximadamente 20-80%, tal como, por ejemplo, aproximadamente 50-60% de bases G+C. Las Tm entre 50 y 80°C, por ejemplo aproximadamente 50 a 70°C, se prefieren típicamente.

Para otras normas para el diseño de cebadores y sondas de PCR, véase, por ejemplo, Dieffenbach et al., "General Concepts for PCR Primer Design" En: PCR Primer, A

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995, pp. 133-155; Innis y Gelfand, "Optimization of PCRs" En: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, CRC Press, London, 1994, pp. 5-11; and Plasterer, T. N. Primerselect: Primer and probe design. Methods Mol. Biol. 70:520- 527 (1997), las descripciones de los cuales se incorporan expresamente aquí como referencia.

Las condiciones preferidas, los cebadores, las sondas, y la referencia interna (G6PDH) son como se describen en el Ejemplo 1 a continuación.

*(iii) Microarreglos*

La expresión diferencial de genes también se puede identificar, o se confirma usando la técnica de microarreglos. Por lo tanto el perfil de expresión de los genes asociados con el cáncer de pecho se puede medie ya sea en tejidos frescos o insertados en parafina usando la tecnología de microarreglos. En este método. Las secuencias de polinucleótidos de interés (incluyendo los ADNc y los oligonucleótidos) se colocan en placas, sobre un substrato de microcircuito integrado. Las secuencias arregladas se hibridan entonces con sondas de ADN específicas de las células o los tejidos de interés. Justo como en el método PCR, la fuente del ARNm es típicamente el ARN total aislado de los tumores humanos o de las líneas celulares de tumores,

y los tejidos o las líneas celulares normales correspondientes. Por lo tanto, el ARN puede ser aislado de una variedad de tumores o líneas celulares de tumores primarios. Si la fuente del ARNm es un tumos primario, el ARNm se puede extraer, por ejemplo, de muestras de tejido congeladas con archivadas insertadas en parafina y fijadas (por ejemplo, fijadas con formalina), las cuales se preparan de manera rutinaria y se preservan en la práctica clínica diaria.

En una realización especifica de la técnica de microarreglos, los insertos amplificados por PCR de clones de ADNc se aplican a un substrato en un arreglo denso. Preferiblemente al menos 10,000 secuencias de nucleótidos se aplican al substrato. Los genes microarreglados, inmovilizados sobre el microcircuito integrado a 10,000' cada uno, son adecuados para la hibridación bajo condiciones severas. Las sondas de ADNc etiquetadas de manera fluorescente se pueden generar a través de la incorporación de nucleótidos fluorescentes por la transcripción invertida del ARN extraído de los tejidos de interés. Las sondas de ADNc aplicadas al microcircuito integrado se hibridan con especificidad con cada pinto del ADN sobre el arreglo. Después del lavado severo para eliminar las sondas de ADN enlazadas no específicamente, el microcircuito se explora por microscopia láser confocal o por otro método de detección,

tal como una cámara CCD. La cuantificación de la hibridación de cada elemento arreglado permite la evaluación de la abundancia del ARNm correspondiente. Con fluorescencia de color doble, las sondas de ADNc etiquetadas por separado, de dos fuentes de ARN se hibridan en pares con el arreglo. La abundancia relativa de las transcripciones de las dos fuentes correspondientes a cada gen especificado se determinan así simultáneamente. La escala miniaturizada de la hibridación da una evaluación rápida y conveniente del patrón de expresión para un gran número de genes. Se ha mostrado que tales métodos tienen la sensibilidad requerida para detectar transcriptos raros, los cuales se expresan en una cuantas copias por célula, y de detectar de manera reproducible al menos de aproximadamente el doble de las diferencias en los niveles de expresión (Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 93(2):106-149 (1996)). El análisis por microarreglos se puede llevar a cabo mediante los equipos disponibles comercialmente, siguiendo las instrucciones del fabricante, tal como usando la tecnología de Affymetrix GENCHIP™, o la tecnología de microarreglos de Incite.

El desarrollo de los métodos de microarreglos para el análisis a gran escala de la expresión genética hace posible investigar sistemáticamente los marcadores moleculares de la calificación del cáncer y la predicción de resultados en una variedad de tipos de tumores.

*(iv) Análisis en Serie de la Expresión Genética (SAGE)*

El análisis en serie de la expresión genética (SAGE) es un método que permite el análisis simultáneo y cuantitativo de un gran número de transcriptos de genes, son la necesidad de proporcionar una sonda de hibridación individual para cada transcripto. Primero se genera una secuencia etiqueta de secuencia corta (de aproximadamente 10-14 bp) que contiene la suficiente información para identificar de manera única un transcripto, siempre y cuando la etiqueta se obtenga de una posición única dentro de cada transcripto. Después, muchos transcriptos se enlazan para formar moléculas en serie largas, que pueden ser secuenciadas, revelando la identidad de varias etiquetas simultáneamente. El patrón de expresión de cualquier población se transcriptos de puede evaluar cuantitativamente determinando la abundancia de las etiquetas individuales e identificando los genes correspondientes a cada etiqueta. Para más detalles, véase, por ejemplo, Velculescu et al., Science 270:484-487 (1995); y Velculescu et al., Cell 88:243-51 (1997).

*(v) Tecnología MassARRAY*

La tecnología MassARRAY (Sequenom, San Diego, Calif.) es un método de alto rendimiento de análisis de expresión genética que usa espectrometría de masas (MS) para

la detección. De acuerdo con este método, enseguida del aislamiento de ARN, la transcripción y la amplificación por PCR, los ADNc se someten a extensión de cebadores. Los productos de la extensión de cebadores derivados del ADNc se purifican, y se dispensan en una arreglo de microcircuitos integrados que se pre-carga con los componentes necesarios para la preparación de la muestra MALTA-TOF. Los varios ADNc presentes en la reacción se cuantifican analizando las áreas máximas en el espectro de masas obtenido.

*(vi) Análisis de la Expresión Genética por Secuenciamiento de Signatura Masivamente Paralela (MPSS)*

Este método descrito por Brenner *et al.*, *Nature Biotechnology* 18:630-634 (2000), es un enfoque de secuenciamiento que combina el secuenciamiento de signatura no basado en gel con la clonación in vitro de millones de plantillas en microperlas separadas de 5 micrógramos de diámetro. Primero, una genoteca de microperlas de plantillas de ADN se construye por clonación in vitro. Esto es seguido por el ensamblaje de un arreglo plano de las microperlas que contienen las plantillas en un flujo de células a una alta densidad (típicamente mayor a 3 x 106 microperlas/cm2). Los extremos libres de las plantillas clonadas en cada microperla se analizan simultáneamente usando, un método de secuenciamiento de signatura basado en fluorescencia que no

requiere separación del fragmento de ADN. Se ha demostrado que este método proporciona simultáneamente y con precisión, en una sola operación, cientos de miles de secuencias de signatura de genes de una genoteca de ADNc de levadura.

*(vii) Inmunohistoquímica*

Los métodos inmunohistoquímicos también son adecuados para detectar los niveles de expresión de los marcadores de pronóstico de la presente invención. Por lo tanto los anticuerpos o los antisueros, preferiblemente los antisueros policlonales, y más preferiblemente los anticuerpos monoclonales para cada marcador se usan para detectar la expresión. Los anticuerpos se pueden detectar por etiquetado directo de los anticuerpos en si, por ejemplo, con etiquetas radioactivas, etiquetas fluorescentes, etiquetas de hapteno tales como, biotina, o una enzima tal como peroxidasa de rábano o la fosfatasa alcalina. Alternativamente, el anticuerpo primario no etiquetado se usa en conjunción con un anticuerpo secundario etiquetado que comprende antisueros, antisueros policlonales o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario. Los protocolos de inmunohistoquímica y los equipos son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente.

*(viii) Proteómica*

El término "proteoma" se define como la totalidad de las proteínas presentes en una muestra (por ejemplo, tejidos, organismos, o cultivos celulares) en un cierto punto de tiempo. La proteómica incluye, entre otras cosas, el estudio de los cambios globales de la expresión de proteínas en una muestra (denominada también como "proteómica de expresión"). La proteómica incluye típicamente los siguientes pasos: (1) separación de las proteínas individuales en una muestra por electroforesis en gel 2-D (2-D PAGE); (2) identificación de las proteínas individuales recuperadas del gel, por ejemplo, por espectrometría de masas o secuenciamiento de N-terminal y (3) análisis de los datos usando bioinformática. Los métodos proteómicos son complementos valioso para otros métodos de perfilado de la expresión genética, y se pueden usar, individualmente o en combinación con otros métodos, para detectar los productos de los marcadores de pronóstico de la presente invención.

*(ix) Descripción General del Aislamiento de ARNm, Purificación y amplificación*

Los pasos de un protocolo representativo para perfilar la expresión genética usando tejidos insertados en parafina, fijados, como la fuente de ARN, incluyen el aislamiento, purificación, extensión de cebadores, y

amplificación del ARNm se dan en varios artículos publicados en revistas (por ejemplo: Godfrey et al., J. Molec. Diagnostics 2:84-91 (2000); Specht et al., Am. J. Pathol 158: 419-29 (2001)). Brevemente un proceso representativo comienza cortando secciones gruesas de aproximadamente 10 microgramos de las muestras de tejido tumoral insertadas en parafina. El ARN se extrae entonces, y la proteína y el ADN se extraen. Después del análisis de la concentración del ARN, se pueden incluir pasos de reparación y/o amplificación del ARN, si es necesario, y el ARN de transcribe de manera inversa usando los promotores específicos del gen seguido por PCR. Finalmente, los datos se analizan para identificar la o las mejores opciones de tratamiento disponibles para el paciente, sobre la base del patrón de expresión genética característico identificado en la muestra de tumor examinado.

En una realización, el paciente tratado aquí, además de expresar el HER3 a un cierto nivel y/o expresar HER2:HER3 a un cierto nivel, el paciente además no sobreexpresa el HER2. la sobreexpresión de HER2 se puede analizar por IHC, por ejemplo, usando HERCEPTETS®(Dako). Las secciones del tejido insertado en parafina, de una biopsia del tumor, se pueden someter al ensayo de IHC y se conviene un criterio de intensidad del teñido de la proteína HER2, como sigue:

Puntuación 0 no se observa teñido o se observa

teñido de la membrana en menos de 10% de las células tumorales.

Puntuación 1+ se detecta un teñido tenue/apenas perceptible de la membrana en más del 10% de las ce lulas tumorales. Las Células sólo se tiñen en parte de su membrana

Puntuación 2+ se observa un teñido de la membrana completa débil a moderado en más del 10% de las células tumorales.

Puntuación 3+ se observa un teñido de la membrana completa moderado a fuerte en más del 10% de las células tumorales

Aquellos tumores con puntuaciones de 0 o 1+ para la evaluación de la sobreexpresión de HER2 se pueden caracterizar como sin sobreexpresión de HER2, en tanto que aquellos tumores con puntuaciones de 2+ o 3+ se pueden caracterizar como con sobreexpresión de HER2.

Los tumores que sobreexpresan la HER2 se pueden calificar por los puntajes inmunohistoquímicos correspondientes al número de copias de más moléculas de HER2 expresadas por células, y se pueden determinar bioquímicamente:

0=0-10,000 copias/célula,

1+= al menos aproximadamente 200,000 copias/célula,

2+=al menos aproximadamente 500,000 copias/células,

3+=al menos aproximadamente 2,000,000

copias/célula,

La sobreexpresión de HER2 en el nivel 3+, lo cual lleva a la activación independiente del ligando de la tirosina cinasa (Hudziak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7159-7163 (1987), ocurre en aproximadamente 30% de los canceres de pecho, y en estos pacientes, la supervivencia libre de recaídas y la supervivencia total se reducen (Slamon et al., Science, 244:707-712 (1989); Slamon et al., Science, 235:177-182 (1987)). Alternativamente, o adicionalmente, los ensayos FISH tales como el INFORN™ (vendido por Ventana, Arizona) o PATHVISION™ (Vysis, Illinois) se pueden llevar a cabo sobre el tejido de tumores insertados en parafina, fijados en formalina para determinar la extensión (si hay alguna) de la amplificación de HER2 en el tumor.

La expresión de HER3 y/o de HER2 también se puede evaluar usando un ensayo de diagnóstico in vivo, por ejemplo administrando una molécula (tal como un anticuerpo) el cual enlaza la molécula a ser detectada y se marca con una etiqueta detectable (por ejemplo, un isótopo radioactivo) y explorando al paciente eternamente para la localización de la etiqueta.

**IV. Formulaciones Farmacéuticas**

Las formulaciones terapéuticas del inhibidor de HER, el inhibidor de dimerización de HER, o el agente

terapéutico usado de acuerdo con la presente invención, se preparan para el almacenamiento mezclando un anticuerpo que tenga el grado deseado de pureza con los portadores, excipientes o estabilizadores opcionales, aceptables farmacéuticamente (Remington's Pharmaceutical Sciences 16va edición, Osol, A. Ed. (1980)), por lo general en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los cristales del anticuerpo también se contemplan (véase, la Solicitud de Patente Norteamericana 2002/0136719). Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a la dosis y las concentraciones empleadas, e incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservadores (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol, resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menor a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que

incluyen glucosa, manosa, o dextrinas, agentes de formación de quelatos tales como EDTA; azucares tales como sacarosa, manitol trehalosa, o sorbitol; contrapones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEENJ, PLURONICSJ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones de anticuerpo liofilizadas se describen en WO 97/04801, incorporada expresamente aquí como referencia.

La formulación de pertuzumab para uso terapéutico comprende 30 mg/mL de pertuzumab en acetato de histidina 20 mM, sacarosa 120 mM, 0.02% de polisorbato 20, a pH 6.0. Una formulación alternativa de pertuzumab comprende 235 mg/mL de pertuzumab, amortiguador de histidina-HCl 10 mM, sacarosa 240 mM, 0.02% de polisorbato, pH 6.0

La formulación de aquí también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular a ser tratada, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten adversamente entre si. Los varios fármacos los cuales se pueden combinar con el inhibidor de HER, o el inhibidor de dimerización de HER se describen en la Sección de Tratamiento, a continuación. Tales moléculas se presentan adecuadamente en combinación, en cantidades que son afectivas para el propósito deseado.

Los ingredientes activos también pueden puede ser

atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington´s Pharmaceutical Sciences, 16va edición, Osol, A., Ed., (1980).

Las preparaciones de liberación sostenida se pueden preparar. Los ejemplos adecuados de reparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofobitos sólidos que contienen el anticuerpo, las cuales matrices se encuentran en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenidas incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliactidas (Patente Norteamericana No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutamico y γ etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradeable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido clicolico tales como LUPRON DEPOTJ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico u acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutirico.

Las formulaciones a ser usadas para la

administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

De acuerdo con esto, se proporciona un método para fabricar un inhibidor de HER, o un inhibidor de la dimerización de HER (tal como pertuzumab), o una composición farmacéutica del mismo, el cual método comprende combinar en un paquete el inhibidor o la composición farmacéutica y una etiqueta, la cual indica que el inhibidor o la composición farmacéutica se indican para tratar a un paciente con un tipo de cáncer (por ejemplo, cáncer ovárico) el cual puede responder al inhibidor, en donde el cáncer del paciente HER3 a un nivel menor que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer y/o si la muestra de cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 25 por ciento para la expresión de HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

Además, se proporciona un método para fabricar un agente quimioterapéutico (tal como gemcitabina) o una composición farmacéutica del mismo, en donde el método comprende combinar en un paquete el agente quimioterapéutico o la composición farmacéutica y una etiqueta, la cual establece que el agente quimioterapéutico o la composición farmacéutica están indicadas para tratar a un paciente con un tipo de cáncer (ejemplificado por el cáncer ovárico), en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel mayor

que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

**V. Tratamiento con inhibidores de HER**

La invención de aquí proporciona un método para tratar a un paciente con un tipo de cáncer el cual puede responder a un inhibidor de HER o un inhibidor de la dimerización de HER, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva terapéuticamente del inhibidor, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer y/o si la muestra del cáncer expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 25 por ciento para la expresión de HER2:HER3 en el tipo de cáncer. Preferiblemente, el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel el cual es menor que el 25 por ciento para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer y/o expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el nivel medio (más preferiblemente mayor que el 75 por ciento para la expresión de HER2:HER3) en el tipo de cáncer.

En una realización preferida particularmente, la invención proporciona un método para tratar a un paciente con cáncer ovárico, peritoneal, o de las trompas de Falopio, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva terapéuticamente de pertuzumab, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor al nivel medio para la

expresión de HER3 en el cáncer ovárico, peritoneal, o de las trompas de Falopio y/o en donde la muestra de cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 25 por ciento para la expresión de HER2:HER3 en el cáncer ovárico, peritoneal, o de las trompas de Falopio. En esta realización, preferiblemente el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel el cual es menor que el 25 por ciento para la expresión de HER3 en el cáncer ovárico, peritoneal, o de las trompas de Falopio y/o expresa HER2: HER3 a un nivel el cual es mayor que el nivel medio (más preferiblemente mayor que el 75 por ciento para la expresión de HER2:HER3) en el cáncer ovárico, peritoneal y de las trompas de Falopio.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para seleccionar unja terapia para un paciente con un tipo de cáncer el cual puede responder a un agente quimioterapéutico, que comprende determinar la expresión de HER3 en una muestra de cáncer del paciente, y seleccionar un agente quimioterapéutico como la terapia, si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel mayor que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer. En esta realización, preferiblemente el tipo de cáncer es cáncer ovárico, peritoneal, o de las trompas de Falopio, incluyendo cáncer ovárico resistente al platino, peritoneal, o de las trompas de Falopio, así como cáncer ovárico avanzado, resistente al tratamiento y/o recurrente. El agente quimioterapéutico es

preferiblemente un antimetabolitos, tal como gemcitabina. Por lo tanto, en esta realización, el HER3 alto se correlaciona con una respuesta mejorada a la terapia con un agente quimioterapéutico, tal como gemcitabina.

Los ejemplos de los varios tipos de cáncer que se pueden tratar con un inhibidor de HER o un inhibidor de dimerización de HER se listan en la sección de definición de arriba. Los tipos de cáncer preferidos incluyen el cáncer ovárico; cáncer petironeal; cáncer de las trompas de Falopio; cáncer de pecho, incluyendo cáncer de pecho metastático (MBC); cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC); cáncer de próstata; y cáncer colorectal. En una realización, el cáncer el cual se trata en cáncer avanzado, resistente al tratamiento, recurrente, resistente a la quimioterapia, y/o resistente al platino.

La terapia con el inhibidor de HER, el inhibidor de la dimerización de HER y/o el agente quimioterapéutico preferiblemente extiende la supervivencia, incluyendo la supervivencia libre de progresión (PFS) y/o la supervivencia total (OS). En una realización, la terapia con el inhibidor de HER o el inhibidor de dimerización de HER extiende la supervivencia a al menos 20% más que la supervivencia lograda administrando un agente antitumoral aprobado, o un estándar de cuidado para el cáncer que está siendo tratado.

En la realización preferida, el método involucra

tratar a un paciente con cáncer ovárico, peritoneal, o de las trompas de Falopio. El paciente puede tener cáncer ovárico, peritoneal o de las trompas de Falopio, avanzado, resistente al tratamiento, recurrente, resistente a la quimioterapia, y/o resistente al platino. La administración de pertuzumab al paciente puede, por ejemplo, extender la supervivencia al menos aproximadamente 20% más que la supervivencia alcanzada administrando topotecan o doxorubicina liposómica a tal paciente.

El inhibidor de HER, o el inhibidor de la dimerización de HER y/o el agente quimioterapéutico se administra a un paciente humano de acuerdo con los métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por las rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación. La administración intravenosa del anticuerpo se prefiere.

Para la prevención o el tratamiento del cáncer, la dosis del inhibidor de HER, el inhibidor de la dimerización del HER y/o el agente quimioterapéutico dependerá del tipo de cáncer a ser tratado, como se define arriba, la severidad y el curso del cáncer, si el anticuerpo se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el

historial clínico del paciente, y la respuesta a los fármacos, y la discreción del médico encargado.

En una realización, se administra una dosis fija del inhibidor. La dosis fija se puede administrar de manera adecuada al paciente una vez o durante una serie de tratamientos. Cuando se administra unja dosis fija, preferiblemente está en el rango desde aproximadamente 20mg a aproximadamente 2000 mg del inhibidor. Por ejemplo, la dosis fija puede ser de aproximadamente 420 mg, aproximadamente 525 mg, aproximadamente 840 mg, o aproximadamente 1050 mg del inhibidor, tal como pertuzumab.

Cuando se administra una serie de dosis, estas pueden, por ejemplo, ser administradas aproximadamente cada semana, aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente cada 3 semanas, o aproximadamente cada 4 semanas, pero preferiblemente aproximadamente casa 3 semanas. La dosis fija puede, por ejemplo, seguir siendo administrada hasta la progresión de la enfermedad, el evento adverso, u otro momento, según lo determine el médico. Por ejemplo, se pueden administrar desde aproximadamente dos, tres o cuatro, hasta aproximadamente 17 o más dosis fijas.

En una realización, una o más dosis de carga del anticuerpo se administran, seguidas por una o más dosis de mantenimiento del anticuerpo. En otra realización, una pluralidad de la misma dosis se administra al paciente.

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

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, una o más dosis fijas de aproximadamente 1050 mg del inhibidor de la dimerización de HER (por ejemplo, pertuzumab) se administran, por ejemplo cada 3 semanas. De acuerdo con esta realización, una, dos o más de las dosis fijas se administran, por ejemplo, hasta por un año (17 ciclos), y durante más tiempo si se desea.

En otra realización, una dosis fija de aproximadamente 1050mg del inhibidor de la dimerización de HER (por ejemplo, pertuzumab) se administra como una dosis de carga, seguido por una o más dosis de mantenimiento de aproximadamente 525mg. Aproximadamente una, dos o más dosis de mantenimiento se pueden administrar al paciente cada 3 semanas de acuerdo con esta realización.

Aunque el inhibidor de HER, el inhibidor de la dimerización de HER o el agente quimioterapéutico se pueden administrar como un agente antitumoral individual, el

paciente se trata opcionalmente con una combinación del inhibidor (o el agente quimioterapéutico), y uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales. Los agentes quimioterapéuticos ejemplificantes de aquí incluyen; gemcitabina, carboplatina, paclitaxel, docetaxel, topotecan, y/o doxorubicina liposomica. Preferiblemente, al menos uno de los agentes quimioterapéuticos es un agente quimioterapéutico antimetabolitos tal como gemcitabina. La administración combinada incluye la coadministración o la administración concurrente, usando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica individual, y la administración consecutiva en cualquier orden, en donde preferiblemente hay un periodo de tiempo mientras ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Por lo tanto, el agente quimioterapéutico antimetabolitos se puede administrar antes de, o enseguida de la administración del inhibidor. En esta realización, el tiempo entre al menos una administración del agente quimioterapéutico antimetabolitos y al menos una administración del inhibidor es de aproximadamente 1 mes o menos, y más preferiblemente, aproximadamente 2 semanas o menos. Alternativamente, el agente quimioterapéutico antimetabolitos y el inhibidor se administran concurrentemente al paciente, en una formulación única o en formulaciones separadas. El tratamiento con la combinación del agente quimioterapéutico (por ejemplo, el agente

quimioterapéutico antimetabolitos, tal como gemcitabina) y el inhibidor (por ejemplo, pertuzumab) puede resultar en un efecto terapéutico sinérgico, o más que aditivo, benéfico para el paciente.

Los agentes quimioterapéuticos particularmente deseados para la combinación con el inhibidor, por ejemplo para la terapia del cáncer ovárico, incluyen: un agente quimioterapéutico antimetabolitos tal como gemcitabina; un compuesto e platino, tal como carboplatina; un toxoide tal como paclitaxel o docetaxel; o doxorubicina liposómica. Un agente quimioterapéutico antimetabolitos, si se administra, se administra usualmente a dosis conocidas del mismo, u opcionalmente reducidas debido a la acción combinada de los fármacos o los afectos secundarios atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico antimetabolitos. La preparación y los itinerarios de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes o como se determinen empíricamente por los médicos experimentados. Cuando el agente quimioterapéutico antimetabolitos es gemcitabina, preferiblemente, esta se administra a una dosis entre aproximadamente 60mg/$m^2$ a 150 mg/$m^2$ (por ejemplo aproximadamente 1000 mg/$m^2$), por ejemplo, en los días 1 y 8 de un ciclo de 3 semanas.

Aparte del inhibidor y el agente quimioterapéutico

antimetabolitos, otros regimenes terapéuticos se pueden combinar con estos. Por ejemplo, se puede administrar un segundo (tercero, cuarto, etc.) agente(s) quimioterapéutico(s), en donde el segundo agente quimioterapéutico es ya sea otro agente quimioterapéutico antimetabolitos diferente, o un agente quimioterapéutico que no sea un antimetabolitos. Por ejemplo, el segundo agente quimioterapéutico puede ser un taxano (tal como paclitaxel o docetaxel), cepecitabina, o un agente quimioterapéutico basado en platino (tal como carbpplatina, cisplatina o oxaliplatina), antraciclina (tal como doxorubicina, incluyendo, doxodrubicina liposómica), topotecan. Pemeterexed, vinca alcaloides (tal como vinorelbina), y TLK 286. Se puede administrar un cóctel de diferentes agentes quimioterapéuticos.

Otros agentes terapéuticos que se pueden combinar con el inhibidor y/o el agente quimioterapéutico incluyen uno o más de: un inhibidor de HER diferente, un inhibidor de la dimerización de HER (por ejemplo, un anticuerpo de HER2 inhibidor del crecimiento, tal como trastuzumab, o un anticuerpo de HER2 el cual induce la apoptosis de las células que sobre expresen HER2, tal como 7C2, 7F3 o las variantes humanizadas de los mismos); un anticuerpo dirigido contra un antígeno asociado con un tumor diferente, tal como EGFR, HER3, HER4; un compuesto anti-hormonal, por ejemplo, un

compuesto anti.estrogenos, tal como tamoxifen, o un inhibidor de aromatasa; un cardioprotector (para evitar o reducir las disfunciones del miocardio asociadas con la terapia); una citosina; un fármaco dirigido a EGFR (tal como TARCEVA7, IRESSA7 o cetuxibam); un agente anti-angiogenico (en especial bevacizumab, vendido por Genetech bajo la marca AVASTATINJ); un inhibidor de tirosina cinasa; un inhibidor de COX (por ejemplo, un inhibidor de COX-1 o COX-2); un fármaco antiinflamatorio no esferoidal, celecoxib (CELEBREX 7); un inhibidor de farnesil transferasa (por ejemplo, Tipifarnib/ZARNESTRA 7 R1115777 dispinible de Jonson and Jonson o Lonafarnib SCH66336 disponible de Schering_Plough); un anticuerpo que se enlace a la proteína oncofetal CA125 tal como Oregovomab (MoAB N43.13); una vacuna de HER2 (tal como la vacuna HER2 AutoVac de Pharmexia, o una vacuna de la proteína APC8014 de Dendreon o una vacuna del péptido HER2 de GSK/Corixa); otra terapia dirigida al HER (por ejemplo, trastuzumab, cetuximab, ABX-EGF, EMD7200, gefitinib, erlotinib, CP724714, C11033, GW572016, IMC-11F8, TAK165, etc.); un inhibidor de Raf y/o ras (véase, por ejemplo, WO 2003/86467); una inyección de liposomas de doxorubicina HCl (DOXOIL®); un inhibidor de topoisomerasa I, tal como topotecan; taxano, un inhibidor de tirosina cinasa doble para HER2 y EGFR tal como lapatinib/GW572016; TLK286 (TECYTA®); EMD-7200; un medicamento que trate la nausea tal como el

antagonista de serotonina, esteroides, o benzodiazepina; un medicamento que evite o trate el sarpullido de la piel o las terapias estándar para el acné. Incluyendo antibióticos tópicos u orales; un medicamento que trate o evite la diarrea; un medicamento que reduzca la temperatura corporal, tal como acetaminofen, difenhidramina, o meperidina; un factor de crecimiento hematopoyético, etc.

Las dosis adecuadas para algunos de los agentes coadministrados son aquellas usadas actualmente y se pueden bajar debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el inhibidor.

Además de los regimenes terapéuticos de arriba, el paciente puede ser sometido a la remoción quirúrgica de las células cancerosas y/o a terapia de radiación.

Cuando el inhibidor es un anticuerpo, preferiblemente, el anticuerpo administrado es un anticuerpo desnudo. Sin embargo, el inhibidor administrado se puede conjugar con un agente citotóxico. Preferiblemente, el inhibidor conjugado y/o el antígeno al cual se enlaza este, es/son internalizados por las células, resultando en una eficacia terapéutica aumentada del conjugado para matar las células cancerosas a las cuales se enlaza. En una realización preferida, el agente citotóxico tiene como objetivo o interfiere con el ácido nucleico en las células cancerosas. Los ejemplos de tales agentes citotóxicos incluyen

maytansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

La presente solicitud contempla la administración del inhibidor por terapia genética. Véase por ejemplo, WO96/07321 publicada el 14 de marzo de 1996, concerniente al uso de la terapia genética para generar anticuerpos intracelulares.

Hay dos enfoques principales para obtener el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) dentro de las células del paciente; in vivo y ex vivo. Para el suministro in vivo, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, usualmente en el sitio donde se requiere el anticuerpo. Para el trata miento ex vivo, las células del paciente se extraen, 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 las cuales se implantas en el paciente (véanse, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas Nos. 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 trasfiere dentro de células cultivadas in vitro, o in vivo en las células del anfitrión deseado. Las técnicas adecuadas para la transferencia del ácido nucleico dentro de células de mamíferos in vitro incluyen el uso de liposomas,

electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextran, el método de precipitación por fosfato de calcio, etc. Un vector usado comúnmente para la administración ex vivo del gen es un retrovirus.

Las técnicas de transferencia de ácidos nucleicos in vivo preferidas incluyen la transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus de Herpes simples I, o virus adeno-asociado) y sistemas basados en lípidos (los lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son DOTMA, DOPE Y DC-ChoI, por ejemplo). En algunas situaciones, es deseable proporcionar la fuente del ácido nucleico con un agente que tenga como objetivo las células objetivo, tal como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana celular o las células objetivo, un ligando para un receptor sobre las células objetivo, etc. Cuando se emplean liposomas, las proteínas que se enlazan a la proteína de la membrana de la superficie celular asociada con la endocitosis, se puede usar para focalizar y/o para facilitar la absorción, por ejemplo, proteínas de la cápsida o fragmentos del mismo trópico para un tipo de células particular, los anticuerpos para las proteínas, los cuales experimentan internalización en ciclo, y las proteínas que tienen como objetivo la localización intracelular y mejoran la vida media intracelular. La técnica de la endocitosis mediada por receptores se describe, por ejemplo, por Wu et

al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987); y Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos de marcado genético y de terapia genética conocidos actualmente. Véase Anderson et al., Science 256:808-813 (1992). Véase también WO 93/25673 y las referencias citadas ahí.

**VI. Artículos de Manufactura**

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo que contiene materiales útiles para el tratamiento de las enfermedades o las condiciones descritas arriba. El artículo de manufactura comprende un recipiente y una etiqueta o anexo en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas, etc. Los recipientes se pueden formar de una variedad e materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición la cual es efectiva para tratar la enfermedad o la condición de elección y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un frasco que tenga un tapón que se puede perforar por la aguja de una jeringa hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es el inhibidor de la dimerización de HER, tal como pertuzumab, o un agente quimioterapéutico, tal como gemcitabina.

El artículo de manufactura puede comprender además un segundo recipiente que comprende un amortiguador diluyente, aceptable farmacéuticamente, tal como agua bacteriostática para inyección (BWEI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. El artículo de manufactura puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

Los paquetes y los artículos de manufactura de la presente invención también pueden incluir información, por ejemplo, en forma de un anexo o etiqueta, que indique que la composición se usa para tratar el cáncer donde el cáncer del paciente expresa HER3 y/o HER2:HER3, a un nivel definido que depende del fármaco. El anexo o la etiqueta puede tener cualquier forma, tal como papel o un medio electrónico, tal como un medio registrado magnéticamente (por ejemplo, un disco flexible), o un CD-ROM. La etiqueta o el anexo también puede incluir otra información relacionada con las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación en el paquete o el artículo de manufactura.

Por lo general, tal información ayuda a los pacientes y a los médicos a usar las composiciones farmacéuticas contenidas y las formas de dosificación efectivamente y de manera segura. Por ejemplo, la siguiente

información con relación al inhibidor de dimerización de HER o al agente quimioterapéutico se puede suministrar en el anexo: farmacocinética, farmacodinámica, estudios clínicos, parámetros de eficacia, indicaciones y uso, contraindicaciones, advertencias, precauciones, reacciones adversas, sobredosificación, dosificación apropiada y administración, como se suministra, las condiciones de almacenaje apropiadas, referencias e información al paciente.

En una realización especifica de la invención, se proporciona un artículo de manufactura que comprende, empacados juntos, una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de HER, o un inhibidor de la dimerización de HER en un portador aceptable farmacéuticamente, y una etiqueta que establece que el inhibidor o la composición farmacéutica está indicada para tratar a un paciente con un tipo de cáncer, el cual puede responder a un inhibidor de HER, o un inhibidor de la dimerización de HER, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor al nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer y/o si la muestra de cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 25 por ciento para la expresión de HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

En una realización opcional de este aspecto inventivo, el artículo de manufactura de aquí comprende además un recipiente que comprende un segundo medicamento, en

donde el inhibidor de HER o el inhibidor de la dimerización de HER es un primer medicamento, y el cual artículos comprende además las instrucciones en el anexo, para tratar al paciente con el segundo medicamento, en una cantidad efectiva. El segundo medicamento puede ser cualquiera de aquellos definidos arriba, con un segundo medicamento ejemplificante que es otro anticuerpo HER2 o un agente quimioterapéutico.

En otro aspecto, se proporciona un artículo de manufactura el cual comprende, empacados juntos, una composición farmacéutica que comprende un agente quimioterapéutico (tal como gemcitabina) en un portador aceptable farmacéuticamente y una etiqueta que establece que el agente quimioterapéutico o la composición farmacéutica está indicada para tratar a un paciente con un tipo de cáncer, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel mayor que el nivel medio para la expresión del HER3 en el tipo de cáncer.

El anexo está en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas, etc. Los recipientes pueden ser formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. Los recipientes mantienen o contienen una composición que es fectiva para tratar un tipo de cáncer, puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede

ser una bolsa de solución intravenosa o un frasco que tiene un tapón que se puede perforar por la aguja de una jeringa hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es el inhibidor de HER, o el inhibidor de la dimerización de HER, o el agente quimioterapéutico. La etiqueta o el anexo indica que la composición se usa para tratar el cáncer en un sujeto elegible para el tratamiento con la guía específica relacionada a las cantidades de dosificación y los intervalos del inhibidor y cualquier otro medicamento que se proporcione. El artículo de manufactura puede comprender además un recipiente adicional que comprenda un amortiguador diluyente aceptable farmacéuticamente, tal como agua bacteriostática para inyección, (BWFI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer, y/o solución de dextrosa. El artículo de manufactura puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

Muchos métodos experimentales alternativos conocidos en la técnica se pueden sustituir exitosamente por aquellos descritos específicamente aquí en la practica de esta invención, como por ejemplo, descritos en muchos de los excelentes manuales y libros de texto disponibles en las áreas de la tecnología relevantes para esta invención (por ejemplo, Using Antibodies, A Laboratory Manual, editado por

Harlow, E. y Lane, D., 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (por ejemplo, ISBN 0-87969-544-7); Roe B. A. et. al. 1996, DNA Isolation and Sequencing (Essential Techniques Series), John Wiley & Sons.(por ejemplo, ISBN 0-471-97324-0); Methods in Enzymology: Chimeric Genes and Proteins, 2000, ed. J. Abelson, M. Simon, S. Emr, J. Thomer. Academic Press; Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2001, 3ra Edición, de Joseph Sambrook y Peter MacCallum, (el antiguo Maniatis Cloning manual) (por ejemplo ISBN 0-87969-577-3); Current Protocols in Molecular Biology, Ed. Fred M. Ausubel, et. al. John Wiley & Sons (por ejemplo, ISBN 0-471-50338-X); Current Protocols in Protein Science, Ed. John E. Coligan, John Wiley & Sons (por ejemplo, ISBN 0-471-11184-8); y Methods in Enzymology: Guide to protein Purification, 1990, Vol. 182, Ed. Deutscher, M.P., Acedemic Press, Inc. (por ejemplo, ISBN 0-12-213585-7)), o como se describe en muchos sitios de red universitarios o comerciales dedicados a describir los métodos experimentales en la biología molecular.

**VII. Métodos de Publicidad**

La invención de este documento también abarca un método para publicitar un inhibidor de HER, un inhibidor de la dimerización de HER (por ejemplo pertuzumab) o una composición aceptable farmacéuticamente de los mismos, que comprende promover, a una audiencia objetivo, el uso del

inhibidor o la composición farmacéutica del mismo para tratar una población de pacientes con un tipo de cáncer (tal como cáncer ovárico), donde el donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer y/o donde la muestra de cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor al 25 por ciento para la expresión de HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

En aun otra realización, la invención proporciona un método para publicitar un agente quimioterapéutico (tal como, gemcitabina) o una composición aceptable farmacéuticamente del mismo que comprende promover, a una audiencia objetivo, el uso del agente quimioterapéutico o la composición farmacéutica del mismo para tratar a una población de pacientes con un tipo de cáncer (tal como cáncer ovárico), donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel mayor que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

La publicidad es por lo general comunicaciones pagados, a través de un medio no personal en el cual se identifica el patrocinador y el mensaje se controla. La publicidad para los propósitos de aquí incluye anuncios, relaciones públicas, colocación del producto, patrocinio, aseguramiento, y promoción de ventas. Este término también incluye avisos públicos de información patrocinada que

aparecen en cualquiera de los medios de comunicación impresos diseñados apelar a una audiencia en masa para persuadir, informar, promover, motivar o modificar de otra manera el comportamiento hacia un patrón de compras, apoyo, o aprobación favorable, de la invención de este documento.

La publicidad y la promoción del método de diagnostico de este documento se pueden realizar por cualquier medio. Los ejemplos de medios publicitarios usados para proporcionar estos mensajes incluyen la televisión, la radio, películas, revistas, periódicos, la Internet, y vallas publicitarias, que incluyen, comerciales, los cuales son mensajes que aparecen en los medios de difusión. Los anuncios también incluyen aquellos en los asientos de los carritos de compras, en las paredes del pasillo de los aeropuertos, y en los costados de los autobuses, o escuchados en mensajes de espera la teléfono o en sistemas de PA en almacenamiento, o en cualquier parte donde se pueda colocar una comunicación visual o audible.

Los ejemplos más específicos de los medios publicitarios o de promoción incluyen la televisión, radio, películas, la Internet, tal como difusión virtual y seminarios en Internet, redes computarizadas interactivas hechas para alcanzar a usuarios simultáneos. Vallas publicitarias fija so electrónicas y otros indicios públicos, carteles, literatura tradicional o electrónica tal como

revistas y periódicos, otros medios de comunicación, presentaciones o contactos individuales, por ejemplo, por correo electrónico, teléfono, mensajería instantánea, correo, mensajería, correo portador o en masa, visitas en personas, etc.

El tipo de publicidad usado dependerá de muchos factores, por ejemplo, de la naturaleza de la audiencia objetivo a ser alcanzada, por ejemplo, hospitales, compañías de seguros, clínicas, doctores, enfermeras, y pacientes, así como consideraciones de costos y las leyes y normas jurisdiccionales relevantes que gobiernan la publicidad de medicamentos y diagnósticos. La publicidad puede ,sr individualizada o personalizada con base en las caracterización de los usuarios definida por la interacción de servicios y/u otros datos tales como la demografía y la ubicación geográfica del usuario.

**VIII. Depósito de Materiales**

Las siguientes líneas celulares de hibridoma se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EEUU (ATCC):

| Designación del Anticuerpo | ATCC No. | 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 |

Los detalles adicionales de la invención se ilustran, por los siguientes Ejemplos no limitantes. Las descripciones de todas las citas en la especificación se incorporan expresamente en este documento como referencia.

## EJEMPLO 1

## Pertuzumab y gemcitabina para la terapia del cáncer ovárico resistente al platino, el carcinoma peritoneal primario, o el carcinoma de las trompas de Falopio

Este ejemplo proporciona los resultados para una prueba clínica fase III que evalúa la seguridad, la torelabilidad, y la eficacia del pertuzumab en combinación con la gemcitabina en pacientes con cáncer ovárico resistente al platino, carcinoma peritoneal primario, o carcinoma de las trompas de Falopio. El pertuzumab representa una nueva clase de agentes buscados como objetivos llamados inhibidores de la dimerización de HER (HID) que inhiben la dimerización de HER2

con EGFR, HER3 y HER4, e inhiben la señalización a través de MAP y P13 cinasa. El pertuzumab se enlaza al sitio de interacción dímero-dímero, tiene un gran efecto sobre el papel de HER2 como un co-receptor, evita la dimerización EGFR/HER2 y HER3/HER2, e inhibe varias vías de señalización mediadas por HER.

El efecto del pertuzumab y la gemcitabina sobre la supervivencia libre de progresión (PFS) y la supervivencia total (OS), se evaluó en todos los pacientes, y en el subconjunto de pacientes cuyos tumores contenían marcadores que indican la activación de HER2. El diseño/esquema del estudio se muestra en la FIG. 9.

Los pacientes quienes habían progresado mientras recibían, en un intervalo de 6 meses de recibir, un régimen quimioterapéutico basado en platino, eran elegibles para este estudio. Los pacientes se seleccionaron al azar para recibir ya sea la gemcitabina en combinación con pertuzumab, o la gemcitabina en combinación con el placebo. Los pacientes tratados aquí incluyen aquellos quienes no habían recibido un tratamiento de régimen de salvamento previo para las enfermedades resistentes al platino previas su entrada al estudio, y aquellos quienes recibieron un régimen previo para las enfermedades resistentes al platino.

La gemcitabina se administró a 1000 $mg/m^2$ en los días 1 y 8 de cada ciclo de 21 días. La gemcitabina se

infundió primero durante 30 minutos. Se permitieron reducciones de la dosis por su toxicidad. El placebo o el pertuzumab se administró el día 1 del ciclo de 21 días. A los sujetos seleccionados al azar para recibir el pertuzumab se les administró una dosis de carga inicial de 840 mg (Ciclo 1) seguido por 420 mg en los Ciclos 2 y posteriores. A los sujetos seleccionados al azar para recibir el placebo se les administró el placebo en el mismo volumen como se administró con el brazo de pertuzumab para el Ciclo 1, los Ciclos 2 y posteriores. Los sujetos con enfermedades progresivas recibieron el tratamiento hasta por 17 ciclos, o 1 año. Los pacientes tuvieron una reducción estándar de la dosis de gemcitabina y dosis sostenidas como resultado de la citopenias. El pertuzumab también se mantuvo para las dosis de gemcitabina del Día 1 sostenidas. Las dosis subsecuentes fueron las dosis reducidas y no se incrementaron. Si se requiriera la reducción de la dosis o el sostenimiento de la dosis en más de 4 ocasiones, o si la dosis se mantuviera por más de 3 semanas, entonces se descontinuó la gemcitabina con la aprobación del médico tratante y del médico supervisor, se continuo el fármaco del tratamiento ciego hasta la progresión de la enfermedad. Si las dosis de gemcitabina del Día 8 fueran sostenidas, entonces se omitió la dosis del Día 8 y el tratamiento subsecuente se comenzó con el siguiente ciclo (Día 22 del ciclo previo).

La gemcitabina se retuvo y la dosis se redujo como se recomienda en la tabla siguiente:

| Conteo Absoluto de Granulocitos ($x10^6$/L) | | Conteo de Plaquetas ($x10^6$/L) | % de la dosis ttotal |
|---|---|---|---|
| >1000 | Y | >100,000 | 100 |
| 500-999 | O | 50,000-99,000 | 75 |
| <500 | O | <50,000 | Retenido |

Las dosis subsecuentes para cualquier paciente que requiriera una reducción de la dosis fueron las dosis de reducción. Su las dosis se mantuvieran por mas de 3 semanas como resultado de las citopenias, se asumió que los pacientes tenían una toxicidad inaceptable y se descontinuó la gemcitabina. Si no hubiera otro grado adicional de las toxicidades III o IV, la continuación del fármaco del tratamiento ciego fue a la discreción del médico y el supervisor médico. La toxicidad hematológica de la gemcitabina ha sido relacionada con la velocidad de la administración de las dosis. La gemcitabina se administra durante 30 min independientemente de la dosis total. El uso de agentes estimulantes de colonias para las citopenias NCI-CTC Grado se usó a la discreción del médico tratante.

Se ofreció la opción para cruzas a un sólo agente, el pertuzumab. Una dosis de carga de 840 mg se administró en el siguiente ciclo debido con la continuación de 420 mg con los ciclos subsecuentes cada 21 días.

Se evaluó la respuesta al final de los Ciclos 2, 4,

6, 8, 12 y 17. La enfermedad medible se evaluó usando el Criterio de Evaluación de la Respuesta para Tumores sólidos (RECIST), por la evaluación clínica y la Exploración CT o los equivalentes. La respuesta para los sujetos con enfermedades que se podrían evaluar se evaluó de acuerdo con los cambios de CA-125 y la evidencia clínica y radiológica de la enfermedad. Las respuestas de confirmaron 4-8 semanas después de la documentación inicial de la respuesta, las siguientes mediciones de resultados se evaluaron

Punto Final de la Eficacia Primaria

Supervivencia libre de progresión, como se determinó por la evaluación del investigador usando los cambios de RECIST o CA-125, enseguida del inicio del tratamiento del estudio asignado de todos los sujetos en cada brazo.

Supervivencia libre de progresión, como se determinó por la evaluación del investigador usando los cambios de RECIST o CA-125, enseguida del inicio del tratamiento del estudio asignado en cada brazo en los siguientes subgrupos:

Sujetos con marcadores detectables de la activación de HER2.

Sujetos sin marcadores detectables de la activación de HER2.

Puntos Finales de Eficacia Secundaria

Respuesta Objetivo (PR o CR)

Duración de la respuesta

Tiempo de Supervivencia

Libertad de la progresión a los 4 meses

Estos puntos finales se evaluaron en todos los sujetos en cada brazo y en los siguientes subgrupos:

Sujetos con marcadores detectables de la activación de HER2.

Sujetos sin marcadores detectables de la activación de HER2.

Para evitar o tratar la posible náusea y vomito, los pacientes se premeditaron con antagonistas de serotonina, esteroides y/o benzodiazepinas. Para evitar o tratar el posible salpullido, se usaron terapias estándar para el acne, que incluyen antibióticos típicos y/u orales. Otras medicaciones concomitantes fueron todas las medicaciones de prescripción o las preparaciones sobre el contador usadas por un sujeto en el intervalo que inicia 7 días antes del Día 1, y que continua hasta el último día del periodo de seguimiento. Los sujetos quienes experimentaron elevaciones de temperatura asociadas con la infusión a >38.5°C, u otros síntomas asociados con la infusión se trataron sintomáticamente con acetaminofen, difenhidramina, o

meperidina. Los factores de crecimiento hematopoyéticos no experimentales se administraron para las citopenias de NCI-CTC Grado 2.

Las muestras insertadas en parafina, fijadas con formalina, obtenidas de los pacientes en este estudio clínico, se analizaron por EGFR, HER2, HER3, dos ligandos de HER (amfiregulina y betaclulina) y G6PDH (un gen de mantenimiento) por qRT-PCR. El ensayo de qRT-PCR se llevó a cabo por TARGOS Molecular Pathology GMBH (Kassel, Alemania) usando los equipos lab lot de Roche Diagnostics. El flujo de trabajo y el análisis para llevar a cabo el ensayo qRT-PCR sobre las muestras clínicas se representan en las Figs. 27 y 28 en este documento.

El análisis de ARNm de EGFR, HER2, HER3, amfiregulina, y betacelulina se llevó a cabo por duplicado. Para permitir el análisis cuantitativo de los datos también se analizó el G6PDH como una referencia interna. Los cebadores y las sondas se diseñaron para amplificar sólo el ARN, no el ADN. El qRT-PCR se realizó por separado para cada marcador y el G6PDH como un procedimiento de dos pasos

En el primer paso, el ADNc se transcribió a la inversa a partir de 5 $\mu$l de ARN total usando transcriptasa inversa AMV y cebado específico para cada marcador y CG6PDH. El perfil de temperatura fue 10min/25°C para el reforzamiento, 60min/42°C para la transcripción inversa y

54min/94°C para la desactivación enzimática.

En el segundo paso, un fragmento de 100-120 bp, del ARNm del marcador y de G6PDH se amplificó a partir de 5 µl de ADNc usando el instrumento LIGHTCYCLER® (Roche Applied, Science, Mannheim, Alemania).

Los amplicones fueron detectados mediante fluorescencia usando pares específicos de sondas de hibridación etiquetadas (principio de la transferencia de energía de fluorescencia-resonancia). Todos los reactivos usados para qRT-PCR provinieron de Roche Applied Science, Mannheim, Alemania. El perfil de temperatura fue 10 min./95° para la desnaturalización inicial y 45 ciclos de 10 seg./62°C para el fijado, 9 seg./72°C para la elongación, 10 seg./95°C para la desnaturalización. Véase la siguiente tabla para consultar las secuencias cebador/sonda usadas.

| **Nombre** | **Secuencia** |
|---|---|
| Cebador de ADNc G6PDH | 5'- tgc gga tgt cag cca ctg tg -3` (SEC ID NO: 23) |
| Cebador delantero G6PDH | 5'-ggg tgc atc ggg tga cct g-3` (SEC ID NO: 24) |
| Cebador inverso G6PDH | 5'-agc cac tgt gag gcg gga -3` (SEC ID NO: 25) |
| Sonda Fluos G6PDH | 5'-ggt gtt ttc ggg cag aag gcc atc c-Fluos-3` (SEC ID NO: 26) |
| Sonda LC Roja G6PDH LC Red | 5'-LCred 640-aac agc cac cag atg gtg ggg tag atc tt-3` (SEC ID NO: 27) |
| | |
| Cebador de ADNc EGFR | 5'- ccg tca atg tag tgg gca cac-3` (SEC ID NO: 28) |
| Cebador delantero EGFR | 5'- ggg tga gcc aag gga gtt tg -3` (SEC ID NO: 29) |
| Cebador inverso EGFR | 5'- gca cac tgg ata cag ttg tct ggt c -3` (SEC ID NO: 30) |
| Sonda LC Fluos EGFR | 5'- tgt gca ggt gat gtt cat ggc ctg agg-Fluos -3` (SEC ID NO: 31) |
| Sonda LC Roja EGFR | 5'-LCred 640-cac tct ggg tgg cac tgt atg cac tc -3` (SEC ID NO: 32) |

| Nombre | Secuencia |
|---|---|
| Cebador de ADNc HER2 | 5'-gga cct gcc tca ctt ggt tg-3` (SEC ID NO: 33) |
| Cebador delantero HER2 | 5'-cag gtg gtg cag gga aac ct-3` (SEC ID NO: 34) |
| Cebador inverso HER2 | 5'-ctg cct cac ttg gtt gtg agc-3` (SEC ID NO: 35) |
| Sonda Fluos HER2 | 5'-caa tgc cag cct gtc ctt cct gca g-Fluos -3` (SECID NO: 36) |
| Sonda LC Roja HER2 | 5'-LCred 640-tat cca gga ggt gca ggg cta cgt gc-3` (SEC ID NO: 37) |
| | |
| Cebador de ADNc HER3 | 5'-gtg tcc atg tga caa agc tta tcg-3` (SEC ID NO: 38) |
| Cebador delantero HER3 | 5'-gat ggg aag ttt gcc atc ttc g-3` (SEC ID NO: 39) |
| Cebador inverso HER3 | 5'-tct caa tat aaa cac ccc ctg aca g-3` (SEC ID NO: 40) |
| Sonda Fluos HER3 | 5'-aac acc aac tcc agc cac gct ctg-Fluos -3` (SEC ID NO: 41) |
| Sonda LC Roja HER3 | 5'-LCred 640-agc tcc gct tga ctc agc tca ccg-3` (SEC ID NO: 42) |
| | |
| Cebador de ADNc Amfiregulina | 5'-ctt gtc gaa gtt tc-3` (SEC ID NO: 43) |
| Cebador delantero Amfiregulina | 5'- cca tag ctg cct tta tgt ctg c-3` (SEC ID NO: 44) |
| Cebador inverso Amfiregulina | 5'- ctt tcg ttc ctc agc ttc tcc ttc-3` (SEC ID NO: 45) |
| Sonda Fluos Amfiregulina | 5'-tga tcc tca cag ctg ttg ctg tta-Fluos-3` (SEC ID NO: 46) |
| Sonda LC Roja Amfiregulina | 5'-LC red tac agt cca gct tag aag aca ata cgt cag gaa-3` (SEC ID NO: 47) |
| | |
| Cebador de ADNc Betacelulina | 5'-gtc aac tct ctc aca c -3` (SEC ID NO: 48) |
| Cebador delantero Betacelulina | 5'-tct agg tgc ccc aag c-3` (SEC ID NO: 49) |
| Cebador inverso Betacelulina | 5'- tag cct tca tca cag aca cag-3` (SEC ID NO: 50) |
| Sonda Fluos Betacelulina | 5'-gca tta ctg cat caa agg gag atg ccg-Fluos -3` (SEC ID NO: 51) |
| Sonda LC Roja Betacelulina | 5'-LCred 640-tcg tgg tgg ccg agc aga cg -3` (SEC ID NO: 52) |

En cada corrida se incluyó un ARN calibrador (ARN purificado de la línea celular HT29) para permitir la cuantificación relativa, se usaron controles positivos y negativos para verificar el flujo de trabajo y los reactivos.

Se realizaron los análisis de datos usando el Paquete Informatico de Cuantificación Relativa LIGHTCYCLER® (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El resultado fue una "relación normalizada del calibrador" de cada marcador para cada muestra del paciente.

Para 119/130 pacientes (92%) estuvieron disponibles los valores qRT-PCR. El rango dinámico fue: EGFR - aproximadamente 10 veces, HER2 - aproximadamente 10 veces, HER3 - aproximadamente 20 veces. Se usó el principio de "cuantificación relativa". La expresión genética (nivel de ARNm) en una muestra fue cuantificado relativamente haciendo referencia a la expresión de un gen de mantenimiento de la misma muestra (referencia = G6PDH). Esta expresión genética relativa entonces se normalizó a la expresión genética relativa en el calibrador. Para cada marcador, se calculó una "relación normalizada del calibrador" de la siguiente manera:

$$\text{Relación normalizada del calibrador} = \frac{\dfrac{\text{concentración del objetivo}}{\text{concentración de la referencia}}\ (\textit{muestra})}{\dfrac{\text{concentración del objetivo}}{\text{concentración de la referencia}}\ (\textit{calibrador})}$$

donde:

Objetivo = gen de interés

Referencia = gen de mantenimiento (G6PDH)

Calibrador = ARN de la línea celular del cáncer colorectal HT29

Se evaluaron los resultados de eficacia en un seguimiento mediano de 7.1 meses (rango 1.3-20.3). Hubo 101 eventos de supervivencia libre de progresión (PFS, *Progression Free Survival*) en ese momento. Las Figuras 10A y B representan PFS en todos los pacientes tratados con gemcitabina y placebo, o gemcitabina o pertuzumab. Se estimaron los valores P usando un modelo Cox estratificado y una prueba de Rango Logarítmico estratificada mediante factores de estratificación de aleatorización (ECOG PS, número de regimenes previos para la enfermedad resistente a platino enfermedad resistente al platino y mensurabilidad de la enfermedad).

En las Figuras 11A y B se muestra la PFS mediante la situación predicha de pHER2, comparando la PFS en pacientes con predicción negativa para pHER2, y en pacientes con predicción positive para pHER2. Se desarrolló un algoritmo de predicción usando 80 muestras de cáncer ovárico comercialmente obtenidas. Una combinación de HER2, HER3 y la

expresión amfiregulina predice las muestras pHER más elevadas con una exactitud del 80%. Los pacientes tuvieron una predicción positiva para pHER2 si la amfiregulina, HER2 y HER3 eran mayores o iguales al 70 por ciento, otros pacientes fueron considerados como negativos para pHER2.

Las Figuras 12A y B representan la PFS basada en los cortes qRT-PCR EGFR; las 13A y B representan la PFS basada en los cortes qRT-PCR HER2; las 14A y B representan la PFS mediante los cortes qRT-PCR HER3. Los pacientes con HER3 bajo tuvieron mejores resultados en términos de la PFS. Estos datos se muestran con mayor detalle en las Figuras 15A y B. Tal como se muestra en estas figuras, la actividad del pertuzumab es más grande en pacientes con tumores expresión baja del gen HER3 y tienden a incrementarse conforme disminuye el nivel de expresión del gen HER3. Estas figuras incluyen el valor absoluto para la expresión de HER3 tal como se calificó en el ensayo de qRT-PCR.

Las Figuras 16A y B ilustra la PFS mediante los subgrupos de HER3. Estos datos muestran que puede haber una interacción negativa entre el pertuzumab y la gemcitabina en pacientes con tumores de alta expresión del gen HER3.

Las Figuras 17A y B son otras tablas que resumen los datos de la PFS mediante subgrupos HER3 para tanto la expresión elevada del gen HER3 como la expresión baja del gen HER3. Las Figuras 18A y B representan la PFS mediante los

subgrupos de HER3 con base en cuatro por cientos diferentes. Los pacientes en el valor 0 a menos del 50 por ciento, y particularmente del valor 0 al 25 por ciento para la expresión de HER3 tuvieron una mejor relación de riesgo (HR, *hazard ration*) para la PFS. La HR inferior se correlaciona con un mejor resultado conforme las mediciones mediante la PFS.

Las Figuras 19A y B proveen los datos que muestran la PFS mediante HER3 qRT-PCR con una escisión de 50/50. Los pacientes con una baja expresión del gen HER3 (menos del 50 por ciento) tuvieron una duración incrementada de la PFS conforme las mediciones en los meses en comparación con los pacientes con una elevada expresión del gen HER3 (mayor o igual al 50 por ciento). Esta correlación es más pronunciada en las Figuras 20A y B donde los pacientes con una baja expresión del gen HER3 fueron caracterizados como aquellos en los menores del 25 por ciento, y los pacientes con una elevada expresión del gen HER3 fueron aquellos en el mayor o igual al 25 por ciento. El valor P de la diferencia en HR entre los dos grupos de diagnóstico fue 0.0007. El 25 por ciento es igual a 1.19 CNR.

Se pudo tener acceso a datos preliminares para la supervivencia global (OS, *Overall Survival*). En las Figuras 21A y B se proporcionan estos datos para todos los pacientes. Las Figuras 22A y B comparan la OS mediante HER3 qRT-PCR

comparando la expresión baja del gen HER3 (menos de 50 por ciento) y la expresión elevada del gen HER3 (mayor o igual al 50 por ciento).

Las Figuras 23A y B ilustran la PFS mediante HER3 qRT-PCR con una escisión de 50/50, relación de alto y bajo riesgo (HR). En las Figuras 24A y B se muestra este conjunto completo de datos PFS desde 5% a 95%.

En la Figura 26 se muestra la expresión de relación normalizada y calibrada del gen HER3. Este rango es aproximadamente 20-80 veces.

Se evaluaron aún más los resultados de la PFS con respecto a la relación HER2:HER3. Los resultados de estos análisis adicionales se describen en las Figuras 29 a 31. Tal como estas figuras muestran, la actividad del pertuzumab es mayor en pacientes con una elevada relación HER2:HER3.

Conclusiones

La actividad del pertuzumab es mayor en pacientes con un cáncer de baja expresión del gen HER3 y tiende a incrementarse conforme disminuye el nivel de expresión del gen HER3. La actividad del pertuzumab también es mayor en pacientes con un cáncer de elevada expresión HER2:HER3 y tiende a incrementarse conforme se incrementa la expresión genética HER2:HER3. La mayoría de los pacientes con un nivel bajo de expresión del gen HER3 que respondieron a la terapia

con pertuzumab también tuvieron una elevada relación HER2:HER3.

Puede haber una interacción negativa entre el pertuzumab y la gemcitabina en pacientes con tumores de una elevada expresión del gen HER3.

Se puede hacer un mejor pronóstico de la expresión del gen HER3 en el antecedente de quimioterapia con tumores de elevada expresión.

Los resultados fueron sorprendentes e inexplicables.

**Ejemplo 2**

**Pertuzumab para terapia de cáncer ovárico avanzado, refractario o recurrente**

Este ejemplo se enfoca a una prueba clínica de un solo grupo, de etiqueta abierta, multicentro y Fase II de paciente con cáncer ovárico. Se trataron pacientes con cáncer ovárico avanzado, refractario o recurrente con pertuzumab, un anticuerpo HER2 humanizado.

Los pacientes con recaída del cáncer ovárico fueron enrolados para recibir terapia con el agente único pertuzumab en una "dosis baja"; se administró pertuzumab por vía intravenosa (IV) con una carga de 840 mg seguida por 420 mg cada 3 semanas.

Se trató un segundo cohorte de pacientes con

pertuzumab en "dosis alta"; 1050 mg cada 3 semanas, administrados como un solo agente.

Se obtuvieron valoraciones de tumor después de 2, 4, 6, 8, 12 y 16 ciclos. La relación de respuesta (RR) mediante fue el criterio de valoración primario. Además, se evaluó la seguridad y tolerabilidad. Los criterios de valoración primarios fueron TTP, la duración de la respuesta, la duración de la supervivencia, la farmacocinética (PK, *pharmacokinetics*) y FOSI (cohorte 2).

Se llevaron a cabo ensayos qRT-PCR en tejido impregnado de parafina fijada con formalina lograda. Se contó con datos de ensayo para 46/117 pacientes. En la Figura 25 se muestra la PFS y OS mediante HER3 qRT-PCR con 25/75 seleccionados como la mejor escisión. En este punto, los expresores elevados de HER3 estuvieron en el mayor o igual al 75 por ciento, mientras que los expresores bajos de HER3 estuvieron en el menor de 75 por ciento.

Nueva cuenta, los pacientes con expresión baja del gen HER3 tratados con pertuzumab mostraron mejores resultados en términos de PFS y OS.

## Ejemplo 3

## Pertuzumab para terapia de cáncer ovárico recurrente resistente al platino

En este estudio clínico aleatorizado, de etiqueta

abierta y Fase II, se investigó la eficacia y seguridad del tratamiento con pertuzumab en combinación con la quimioterapia estándar basada en carboplatina en pacientes con cáncer ovárico recurrente y sensible al platino. El tamaño de la muestra objetivo es 100-500 individuos. El tamaño de muestra objetivo es 148.

Criterios de inclusión:

Histológicamente se confirmó el cáncer ovárico, peritoneal primario o de las trompas de Falopio;

sólo 1 régimen previo, el cual debe estar basado en el platino;

enfermedad sensible al platino la cual se define por medio de un intervalo libre de progresión mayor de 6 meses después de la conclusión de quimioterapia basada en platino.

Criterios de exclusión:

Radioterapia previa;

tratamiento previo con una vacuna anti-cáncer o cualquier terapia dirigida;

cirugía mayor o lesión traumática dentro de las 4 semanas del estudio;

historia o evidencia de metástasis del sistema central nervioso.

En las Figuras 32-35 se muestran los resultados. Los resultados de esta prueban confirman aún más que la actividad del pertuzumab es la más grande en pacientes con cáncer de baja expresión del gen HER3 y tiende a incrementarse conforme se incrementa el nivel de expresión del gen HER3. La actividad del pertuzumab también es la más grande en pacientes con cáncer de una elevada expresión genética HER2:HER3 y tiende a incrementarse conforme se incrementa la expresión genética HER2:HER3. La mayoría de los pacientes con un nivel de expresión baja del gen HER3 que respondieron a la terapia con pertuzumab tuvieron también una elevada relación HER2:HER3.

Puede hacer una interacción negativa entre el pertuzumab y la gemcitabina en pacientes con tumores con una elevada expresión del gen HER3.

Se puede hacer un mejor pronóstico de la expresión del gen HER3 en el antecedente de quimioterapia con tumores de elevada expresión.

**Ejemplo 4**

**Análisis de expresión genética de trayectoria de HER en un estudio de Fase II del pertuzumab + gemcitabina vs. gemcitabina + placebo en pacientes con cáncer ovárico epitelial resistente al platino**

**Antecedente:** Una prueba de Fase II aleatorizada

(N=130) de pertuzumab + gemcitabina vs. gemcitabina vs. placebo en pacientes con cáncer ovárico epitelial (EOC, *epithelial ovarian cancer*) resistente al platino (CDDP-R) sugirió que el pertuzumab podría prolongar la PFS (HR 0.66, 95% CI 0.43, 1.03) y que la duración de la PFS puede asociarse con la expresión del gen HER3 (véase los Ejemplos 2 y 3).

**Métodos:** Pacientes con CDDP-R EOC fueron aleatorizados a G+P o G+placebo. Se administró el tratamiento hasta la progresión o hasta la toxicidad inaceptable. El criterio de valoración primario fue la PFS. Un objetivo secundario fue evaluar los resultados de eficacia en pacientes con perfiles de expresión relacionados con la activación de HER2. Un ensayo de qRT-PCR usando tejido impregnado de parafina fijada con formalina lograda (FFPET), preformado como a continuación se describe, análisis de expresión de ARNm permitido de los genes de trayectoria, incluyendo HER1, HER2, HER3, amfiregulina y betacelulina. Se describieron los resultados mediante la baja expresión genética (< mediano) y mediante la elevada expresión genética (≥ mediano).

**Resultados:** De los 5 biomarcadores, sólo la expresión del gen HER3 sugirió un subgrupo de paciente con una PFS diferencial y resultado de OS con base en los resultados bajos vs. altos. A continuación se muestran los

resultados finales de PFS y OS de todos los pacientes y mediante los resultados de qRT-PCR HER3:

| | G + P | G + Placebo | Relación peligrosa (95% de CI) |
|---|---|---|---|
| **PFS (media de meses)** | | | |
| Todos los pacientes (n=130) | 2.9 | 2.6 | 0.66* (0.43, 1.03) |
| HER3 bajo (N=61) | 5.3 | 1.4 | 0.34 (0.18,0.63) |
| HER3 bajo (N=61) | 2.8 | 5.5 | 1.48 (0.83, 2.63) |
| **OS (media de meses)** | | | |
| Todos los pacientes (n=130) | 13.0 | 13.1 | 0.91* (0.58,1.41) |
| HER3 bajo (N=61) | 11.8 | 8,4 | 0.62 (0.35,1.11) |
| HER3 alto (N=61) | 16.1 | 18.2 | 1.59 (0.8,3.2) |

*Todos los análisis de pacientes fueron estratificados mediante la situación ECOG, mensurabilidad de la enfermedad y # de regimenes previos para la enfermedad de CDDP-R.

**Conclusiones:** Este análisis exploratorio sugiere que los niveles de expresión baja del gen HER3 de tumor puede usarse como indicadores de pronóstico en pacientes con CDDP-R EOC. El tratamiento con pertuzumab puede agregar a la actividad clínica de la gemcitabina en pacientes cuyos tumores tienen una expresión genética baja de HER3. Estos datos sugieren que los niveles de expresión de ARNm de HER3 pueden emplearse como un biomarcador de pronóstico o de diagnóstico de predicción.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar un paciente con un tipo de cáncer, caracterizado porque es capaz de responder a un inhibidor de dimerización HER, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de dimerización HER al paciente, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor que el nivel mediano para expresión HER3 en el tipo de cáncer.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel el cual es menor que el 25 por ciento para la expresión HER3 en el tipo de cáncer.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1 o reivindicación 2, caracterizado porque la expresión HER3 ha sido determinada usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

4. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque la PCR es reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR).

5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el inhibidor de dimerización de HER es un inhibidor de dimerización HER.

6. El método de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el inhibidor de dimerización de HER inhibe la heterodimerización de HER.

7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el inhibidor de dimerización de HER es un anticuerpo.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el anticuerpo se enlaza a un receptor de HER seleccionado del grupo que consiste de EGFR, HER2 y HER3.

9. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el anticuerpo se enlaza a HER2.

10. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el anticuerpo HER2 se enlaza al Dominio II del dominio extracelular del HER2.

11. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el anticuerpo se enlaza a una unión entre los dominios I, II y III del dominio extracelular de HER2.

12. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el anticuerpo HER2 comprende las secuencias de aminoácido pesada variable y ligera variable en las SEC ID Nos. 3 y 4, respectivamente.

13. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el anticuerpo de HER2 es pertuzumab.

14. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, caracterizado porque el anticuerpo de HER es un anticuerpo puro.

15. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, caracterizado porque el anticuerpo HER es un anticuerpo intacto.

16. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, caracterizado porque el anticuerpo de HER es un fragmento de anticuerpo que comprende una región de enlace al antígeno.

17. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el tipo de cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de trompas de falopio, cáncer de mama metastásico (MBC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de próstata y cáncer colorectal.

18. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el tipo de cáncer es cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio.

19. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el tipo de cáncer es resistente a platino.

20. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el tipo de cáncer es cáncer de ovario avanzado, refractario o recurrente.

21. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque extiende el progreso de supervivencia libre (PFS) en pacientes.

22. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque extiende la supervivencia total (OS) en el paciente.

23. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el inhibidor de dimerización de HER es administrado como un agente anti-tumoral único.

24. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, caracterizado porque comprende administrar un segundo agente terapéutico al paciente.

25. El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste de agente quimioterapéutico, anticuerpo HER, anticuerpo dirigido contra un antígeno asociado al tumor, compuesto anti-hormonal, cardioprotector, citocina, fármaco dirigido a EGFR, agente anti-angiogénico, inhibidor de tirosina cinasa, inhibidor COX, fármaco anti-inflamatorio no esteroidal, inhibidor de farnesil transferasa, anticuerpo que se enlaza a la proteína oncofetal CA 125, vacuna HER2, terapia de objetivo HER, inhibidor Raf o ras, doxorubicina liposomal, topotecano, taxano, inhibidor de tirosina cinasa dual, TLK286, EMD-7200,

un medicamento que trata náusea, un medicamento que previene o trata salpullido de piel, o terapia de acné estándar, un medicamento que trata o previene la diarrea, un medicamento que induce temperatura corporal, y un factor de crecimiento hepatopoyético.

26. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

27. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste de gemcitabina, carboplatino, paclitaxel, docetaxel, topotecano y doxorubicina liposomal.

28. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque el agente quimioterapéutico es un antimetabolito.

29. El método de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el agente quimioterapéutico antimetabolito es gemcitabina.

30. El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque el segundo agente quimioterapéutico es trastuzumab, erlotinib o bevacizumab.

31. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor

del 25 por ciento para la expresión HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

32. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el nivel medio para la expresión HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

33. El método de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado porque el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 75 por ciento para la expresión HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

34. Un método para tratar un paciente con cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio, caracterizado porque comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de pertuzumab al paciente, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor que el nivel medio para la expresión HER3 en cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio.

35. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel el cual es menor que el 25 por ciento para la expresión HER3 cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio.

36. El método de conformidad con la reivindicación 34 o reivindicación 35, caracterizado porque la expresión HER3 ha sido determinada usando reacción en cadena de la

polimerasa (PCR).

37. El método de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado porque la PCR es reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR).

38. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34 a 37, caracterizado porque extiende el progreso de supervivencia libre (PFS).

39. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34 a 38, caracterizado porque extiende la supervivencia total (OS).

40. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34 a 39, caracterizado porque el paciente tiene cáncer de ovario.

41. El método de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque el cáncer de ovario es cáncer de ovario resistente a platino.

42. El método de conformidad con la reivindicación 40 o reivindicación 41, caracterizado porque el paciente tiene cáncer de ovario avanzado, refractario o recurrente.

43. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34 a 42, caracterizado porque además comprende administrar un agente quimioterapéutico al paciente.

44. El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el agente quimioterapéutico se

selecciona del grupo que consiste de gemcitabina, carboplatino, paclitaxel, docetaxel, topotecano y doxorubicina liposomal.

45. El método de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado porque el agente quimioterapéutico es un antimetabolito.

46. El método de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado porque el agente quimioterapéutico antimetabolito es gemcitabina.

47. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 34 a 46, caracterizado porque el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor del 25 por ciento para la expresión HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

48. El método de conformidad con la reivindicación 47, caracterizado porque el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el nivel medio para la expresión HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

49. El método de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 75 por ciento para la expresión HER2:HER3 en cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio.

50. Un método para seleccionar una terapia para un paciente con un tipo de cáncer, el cual es capaz de responder a un inhibidor de dimerización de HER, caracterizado porque

comprende determinar la expresión HER3 en una muestra de cáncer del paciente y seleccionar un inhibidor de dimerización HER como la terapia si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel menor que el nivel medio para la expresión HER3 en el tipo de cáncer.

51. Un artículo de manufactura caracterizado porque comprende envasar en conjunto, una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de dimerización HER en un portador farmacéuticamente aceptable y una etiqueta que dice que el inhibidor o composición farmacéutica está indicado para tratar un paciente con un tipo de cáncer el cual es capaz de responder a un inhibidor de dimerización de HER, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

52. Un método para manufacturar un inhibidor de dimerización HER o una composición farmacéutica del mismo, caracterizado porque comprende combinar en un paquete, el inhibidor o composición farmacéutica y una etiqueta que dice que el inhibidor o composición farmacéutica está indicado para tratar un paciente con un tipo de cáncer el cual es capaz de responder a un inhibidor de dimerización de HER, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

53. Un método para publicitar un inhibidor de dimerización HER o una composición farmacéutica del mismo, caracterizado porque comprende promover, a una audiencia objetivo, el uso de un inhibidor de dimerización HER o composición farmacéutica del mismo, para tratar una población de pacientes con un tipo de cáncer, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

54. Un método para seleccionar una terapia para un paciente con un tipo de cáncer, el cual es capaz de responder a un agente quimioterapéutico, caracterizado porque comprende determinar la expresión de HER3 en una muestra de cáncer a partir del paciente y seleccionar un agente quimioterapéutico como la terapia, si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel mayor que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

55. El método de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado porque el tipo de cáncer es cáncer de ovario, peritoneal, o de trompas de falopio.

56. El método de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado porque el tipo de cáncer es cáncer de ovario resistente a platino, peritoneal o de trompas de falopio.

57. El método de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado porque el tipo de cáncer es cáncer de

ovario avanzado, refractario o recurrente.

58. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 54 a 57, caracterizado porque el agente quimioterapéutico es un antimetabolito.

59. El método de conformidad con la reivindicación 58, caracterizado porque el agente quimioterapéutico antimetabolito es gemcitabina.

60. Un método para tratar un paciente con un tipo de cáncer, el cual es capaz de responder a un agente quimioterapéutico, caracterizado porque comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de HER al paciente, en donde el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 25 porciento para la expresión HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

61. El método de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el nivel medio para la expresión de HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

62. El método de conformidad con la reivindicación 61, caracterizado porque el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 75 porciento para la expresión de HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

63. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 60 a 62, caracterizado porque la expresión HER2 y HER3 ha sido determinada usando reacción en cadena de

la polimerasa (PCR).

64. El método de conformidad con la reivindicación 63, caracterizado porque la PCR es reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR).

65. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 60 a 64, caracterizado porque el inhibidor de HER es un inhibidor de dimerización de HER.

66. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 60 a 65, caracterizado porque el inhibidor HER es un inhibidor HER2.

67. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 65 o reivindicación 66, caracterizado porque el inhibidor de dimerización HER es un inhibidor de dimerización HER2.

68. El método de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el inhibidor HER inhibe la heterodimerización de HER.

69. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 60 a 68, caracterizado porque el inhibidor de HER es un anticuerpo.

70. El método de conformidad con la reivindicación 69, caracterizado porque el anticuerpo se enlaza a un receptor de HER seleccionado del grupo que consiste de EGFR, HER2 y HER3.

71. El método de conformidad con la reivindicación

70, caracterizado porque el anticuerpo se enlaza a HER2.

72. El método de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque el anticuerpo HER2 se enlaza al Dominio II del dominio extracelular de HER2.

73. El método de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque el anticuerpo se enlaza a una unión entre los dominios I, II y III del dominio extracelular de HER2.

74. El método de conformidad con la reivindicación 73, caracterizado porque el anticuerpo HER2 comprende las secuencias de aminoácido de cadena ligera variable y pesada variable en las SEC ID Nos. 3 y 4, respectivamente.

75. El método de conformidad con la reivindicación 74, caracterizado porque el anticuerpo HER2 es pertuzumab.

76. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69 a 75, caracterizado porque el anticuerpo de HER es un anticuerpo puro.

77. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69 a 76, caracterizado porque el anticuerpo HER es un anticuerpo intacto.

78. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69 a 76, caracterizado porque el anticuerpo de HER es un fragmento de anticuerpo que comprende una región de enlace al antígeno.

79. El método de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 60 a 78, caracterizado porque el tipo de cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de trompas de falopio, cáncer de mama metastásico (MBC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de próstata y cáncer colorectal.

80. El método de conformidad con la reivindicación 79, caracterizado porque el tipo de cáncer es cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio.

81. El método de conformidad con la reivindicación 80, caracterizado porque el tipo de cáncer es resistente a platino.

82. El método de conformidad con la reivindicación 80, caracterizado porque el tipo de cáncer es cáncer de ovario avanzado, refractario o recurrente.

83. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 60 a 82, caracterizado porque extiende el progreso de supervivencia libre (PFS) en pacientes.

84. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 60 a 83, caracterizado porque extiende la supervivencia total (OS) en el paciente.

85. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 60 a 84, caracterizado porque el inhibidor de HER es administrado como un agente anti-tumoral único.

86. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 60 a 84, caracterizado porque comprende

administrar un segundo agente terapéutico al paciente.

87. El método de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado porque el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste de agente quimioterapéutico, anticuerpo HER, anticuerpo dirigido contra un antígeno asociado al tumor, compuesto anti-hormonal, cardioprotector, citocina, fármaco dirigido a EGFR, agente anti-angiogénico, inhibidor de tirosina cinasa, inhibidor COX, fármaco anti-inflamatorio no esteroidal, inhibidor de farnesil transferasa, anticuerpo que se enlaza a la proteína oncofetal CA 125, vacuna HER2, terapia de objetivo HER, inhibidor Raf o ras, doxorubicina liposomal, topotecano, taxano, inhibidor de tirosina cinasa dual, TLK286, EMD-7200, un medicamento que trata náusea, un medicamento que previene o trata salpullido de piel, o terapia de acné estándar, un medicamento que trata o previene la diarrea, un medicamento que induce temperatura corporal, y un factor de crecimiento hepatopoyético.

88. El método de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado porque el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

89. El método de conformidad con la reivindicación 88, caracterizado porque el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste de gemcitabina, carboplatino, paclitaxel, docetaxel, topotecano y

doxorubicina liposomal.

90. El método de conformidad con la reivindicación 88, caracterizado porque el agente quimioterapéutico es un antimetabolito.

91. El método de conformidad con la reivindicación 90, caracterizado porque el agente quimioterapéutico antimetabolito es gemcitabina.

92. El método de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado porque el segundo agente quimioterapéutico es trastuzumab, erlotinib o bevacizumab.

93. Un método para tratar un paciente con cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio, caracterizado porque comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de pertuzumab al paciente, en donde el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor del 25 por ciento para la expresión HER2:HER3 en el cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio.

94. El método de conformidad con la reivindicación 93, caracterizado porque el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el nivel medio para la expresión HER2:HER3 en el cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio.

95. El método de conformidad con la reivindicación 94, caracterizado porque el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 75 por ciento

para la expresión HER2:HER3 en el cáncer de ovario, peritoneal o de trompas de falopio.

96. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 93 a 95, caracterizado porque la expresión HER2 y HER3 ha sido determinada usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

97. El método de conformidad con la reivindicación 96, caracterizado porque la PCR es reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR).

98. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 93 a 97, caracterizado porque extiende el progreso de supervivencia libre (PFS).

99. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 93 a 98, caracterizado porque extiende la supervivencia total (OS).

100. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 93 a 99, caracterizado porque el paciente tiene cáncer de ovario.

101. El método de conformidad con la reivindicación 100, caracterizado porque el cáncer de ovario es cáncer de ovario resistente a platino.

102. El método de conformidad con la reivindicación 100 o reivindicación 101, caracterizado porque el paciente tiene cáncer de ovario avanzado, refractario o recurrente.

103. El método de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 93 a 102, caracterizado porque además comprende administrar un agente quimioterapéutico al paciente.

104. El método de conformidad con la reivindicación 103, caracterizado porque el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste de gemcitabina, carboplatino, paclitaxel, docetaxel, topotecano y doxorubicina liposomal.

105. El método de conformidad con la reivindicación 103, caracterizado porque el agente quimioterapéutico es un antimetabolito.

106. El método de conformidad con la reivindicación 105, caracterizado porque el agente quimioterapéutico antimetabolito es gemcitabina.

107. Un método para seleccionar una terapia para un paciente con un tipo de cáncer, el cual es capaz de responder a un inhibidor de HER, caracterizado porque comprende determinar la expresión HER2 y HER3 en una muestra de cáncer del paciente y seleccionar un inhibidor de HER como la terapia si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel el cual es mayor del 25 porciento para la expresión HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

108. Un artículo de manufactura caracterizado porque comprende envasar en conjunto, una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de HER en un portador

farmacéuticamente aceptable y una etiqueta que dice que el inhibidor o composición farmacéutica está indicado para tratar un paciente con un tipo de cáncer el cual es capaz de responder a un inhibidor de HER, en donde el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 25 porciento para la expresión de HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

109. Un método para manufacturar un inhibidor de HER o una composición farmacéutica del mismo, caracterizado porque comprende combinar en un paquete, el inhibidor o composición farmacéutica y una etiqueta que dice que el inhibidor o composición farmacéutica está indicado para tratar un paciente con un tipo de cáncer el cual es capaz de responder a un inhibidor de HER, en donde el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 25 porciento para la expresión de HER2:HER3 en el tipo de cáncer.

110. Un método para publicitar un inhibidor de dimerización HER o una composición farmacéutica del mismo, caracterizado porque comprende promover, a una audiencia objetivo, el uso de un inhibidor de HER o composición farmacéutica del mismo, para tratar una población de pacientes con un tipo de cáncer, en donde el cáncer del paciente expresa HER2:HER3 a un nivel el cual es mayor que el 25 porciento para la expresión de HER2:HER3 en el tipo de

cáncer.

111. Un método para tratar un paciente con un tipo de cáncer, el cual es capaz de responder a un inhibidor de HER, caracterizado porque comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de HER al paciente, en donde el cáncer del paciente expresa HER3 a un nivel menor que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

112. Un método para seleccionar una terapia para un paciente con un tipo de cáncer, el cual es capaz de responder a un inhibidor de HER, caracterizado porque comprende determinar la expresión de HER3 en una muestra de cáncer a partir del paciente y seleccionar un inhibidor de HER como la terapia, si la muestra de cáncer expresa HER3 a un nivel menor que el nivel medio para la expresión de HER3 en el tipo de cáncer.

113. El método de conformidad con la reivindicación 111 o reivindicación 112, caracterizado porque el inhibidor de HER es un inhibidor de HER2.

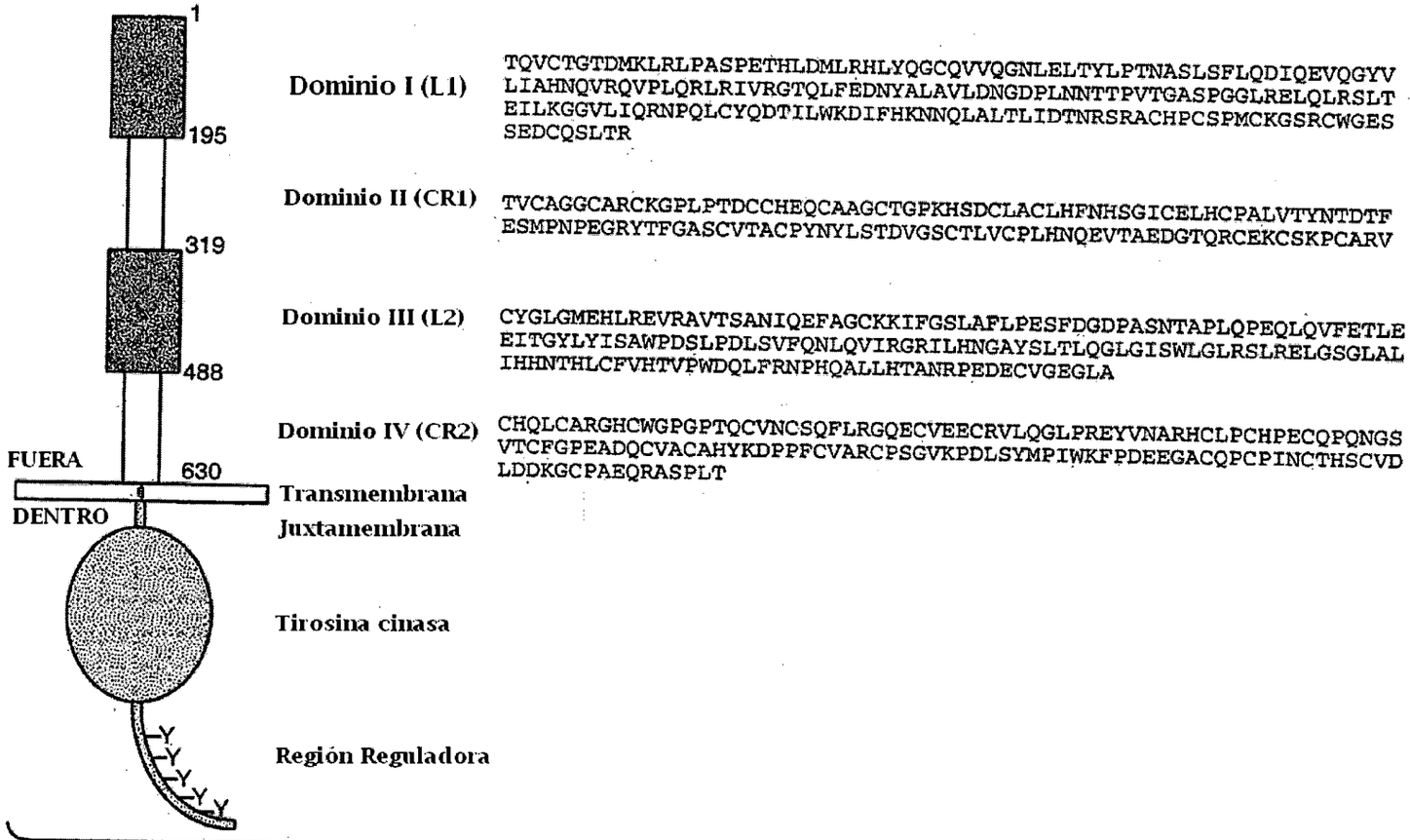

1
195
319
488
630
FUERA
DENTRO
Y
Y
Y
Y
Y
Dominio I (L1)
TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYV
LIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLT
EILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGES
SEDCQSLTR
Dominio II (CR1)
TVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTF
ESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARV
Dominio III (L2)
CYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLE
EITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLAL
IHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLA
Dominio IV (CR2)
CHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGS
VTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVD
LDDKGCPAEQRASPLT
Transmembrana
Juxtamembrana
Tirosina cinasa
Región Reguladora

FIG. 1

**Ligera Variable**

```
                  10          20          30          40
2C4     DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC [KASQDVSIGVA] WYQQRP
         **    **** *       *                       *
574     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [KASQDVSIGVA] WYQQKP
                                    *   ** ***
hum. κI DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASQSISNYLA] WYQQKP

                 50          60          70          80
2C4     GQSPKLLIY [SASYRYT] GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA
          **                  *  *          *   * *
574     GKAPKLLIY [SASYRYT] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
                   * *****
hum κI  GKAPKLLIY [AASSLES] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP

                 90         100
2C4     EDLAVYYC [QQYYIYPYT] FGGGTKLEIK (SEC ID NO:1)
           * *                 *   *
574     EDFATYYC [QQYYIYPYT] FGQGTKVEIK (SEC ID NO:3)
                    *** *
hum κI  EDFATYYC [QQYNSLPWT] FGQGTKVEIK (SEC ID NO:5)
```

**FIG. 2A**

**Pesada Variable**

```
                  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] RFTISRDNSKNTLYL

                  abc       90         100ab        110
2C4     ELRSLTFEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGTTLTVSS (SEC ID NO:2)
        ***  **                                  **
574     QMNSLRAEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGTLVTVSS (SEC ID NO:4)
                           ********
hum III QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLYDY] WGQGTLVTVSS (SEC ID NO:6)
```

**FIG. 2B**

**Secuencia de Aminoácido para Cadena Ligera de Pertuzumab**

```
1          10         20         30         40         50         60
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS

          70         80         90        100        110        120
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP

         130        140        150        160        170        180
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT

         190        200        210
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

**FIG. 3A**

**Secuencia de Aminoácido para Cadena Pesada de Pertuzumab**

```
1          10         20         30         40         50         60
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY

          70         80         90        100        110        120
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSA

         130        140        150        160        170        180
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

         190        200        210        220        230        240
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP

         250        260        270        280        290        300
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS

         310        320        330        340        350        360
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM

         370        380        390        400        410        420
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ

         430        440        448
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
```

**FIG. 3B**

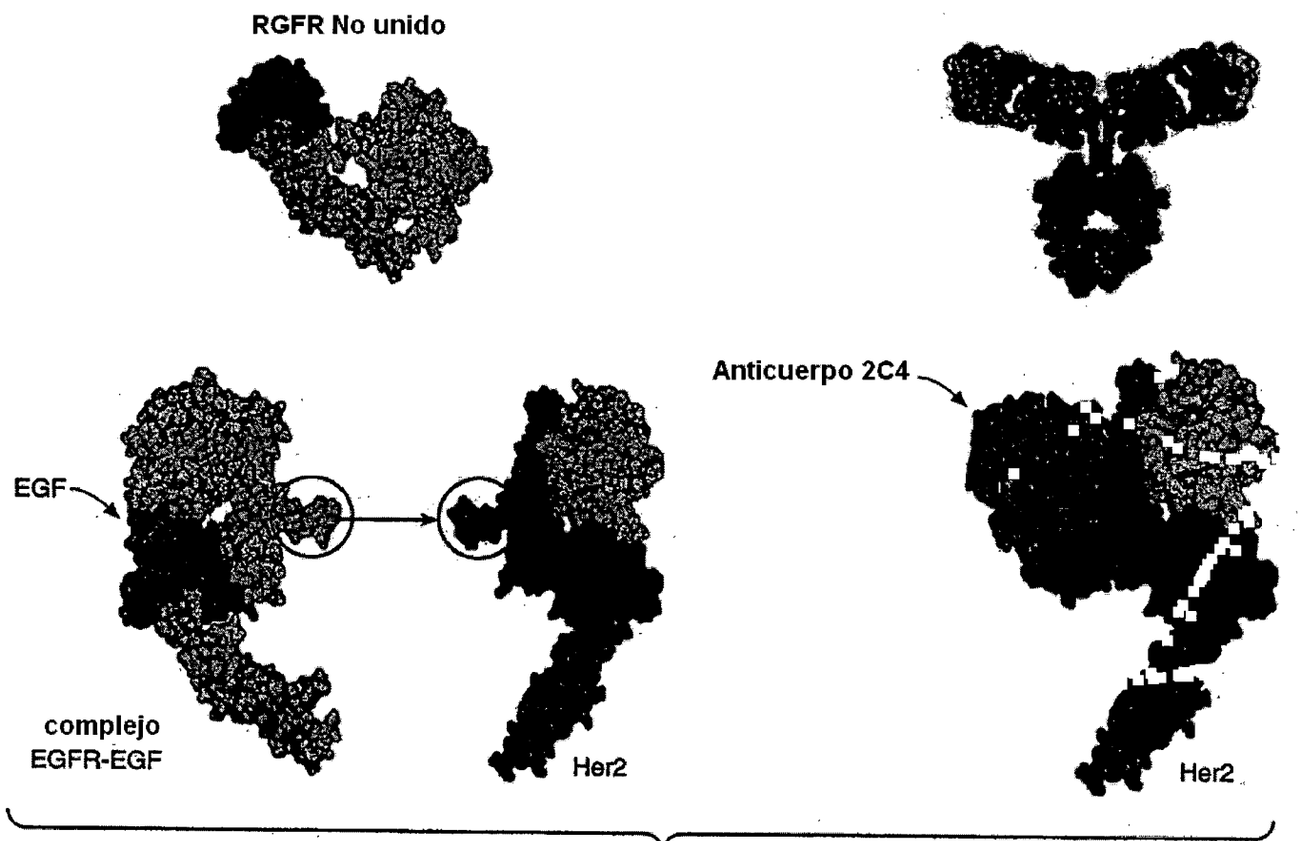

EGFR activado con el Ligando Heterodimeriza con 2c4 HER2 Enlazado al Sitio Enlazante Heterodimérico
RGFR No unido
EGF
complejo EGFR-EGF
Her2
Anticuerpo 2C4
Her2

FIG. 4

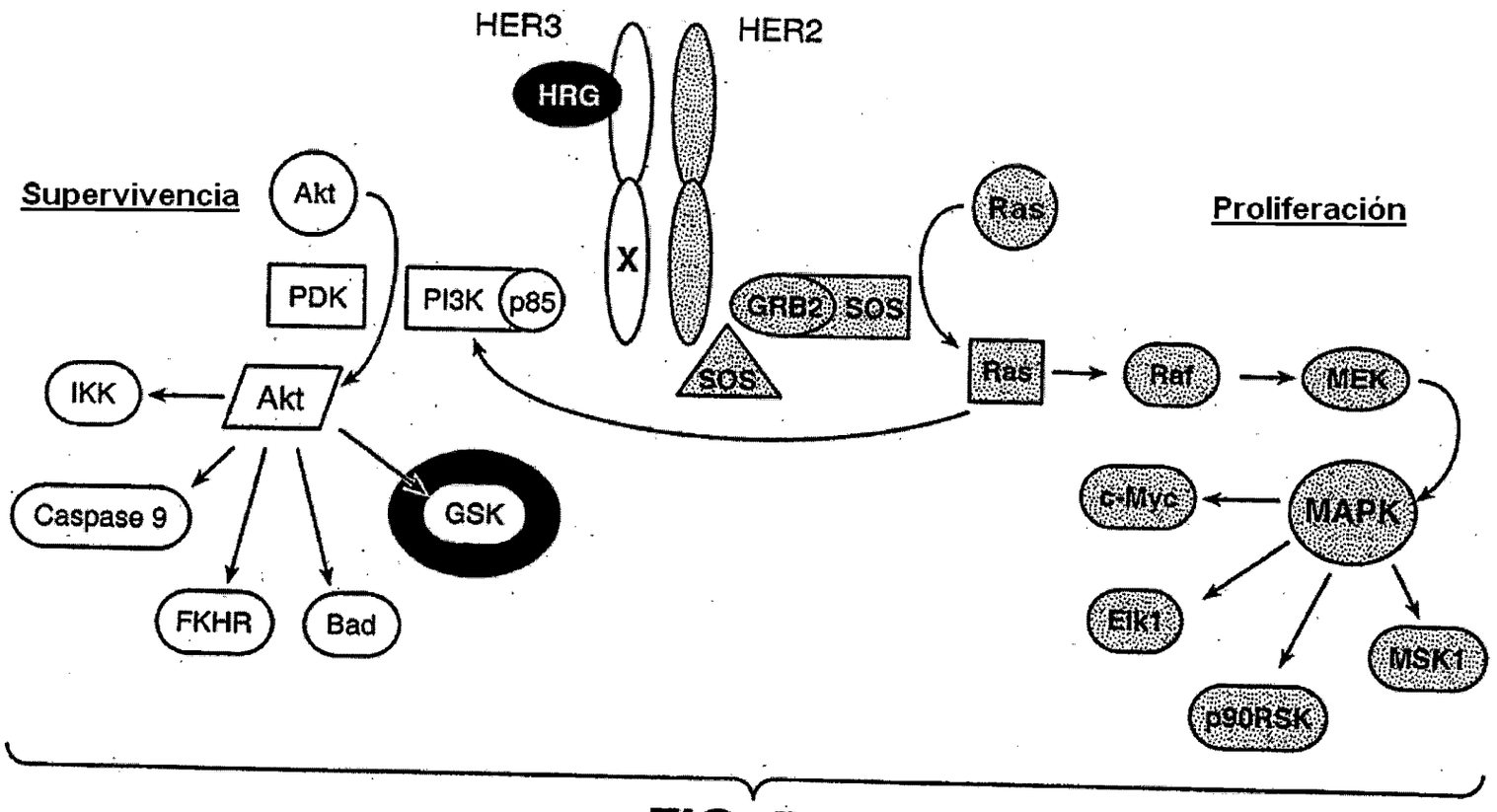
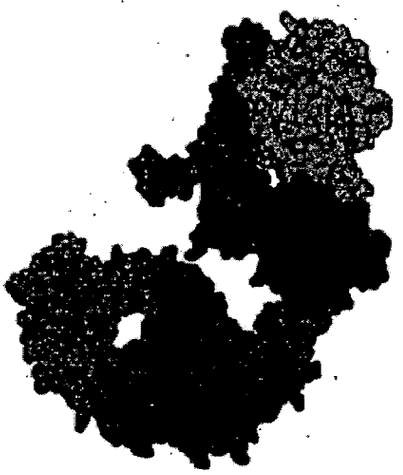

Acoplamiento de HER2/3 a la MAPK y Trayectorias Akt
HER3
HER2
HRG
X
Supervivencia
Akt
PDK
PI3K
p85
IKK
Akt
Caspase 9
GSK
FKHR
Bad
SOS
GRB2
SOS
Ras
Ras
Raf
MEK
Proliferación
c-Myc
MAPK
Elk1
MSK1
p90RSK

FIG. 5

**Trastuzumab**
Herceptina



- Se enlaza en IV cercano a JM
- Protege contra la dispersión del receptor
- Afecta moderadamente la modulación descendente del receptor
- Afecta ligeramente el papel de HER2 como un corereceptor

**Pertuzumab**
Omnitarg



- Se enlaza en II a interface de dimerización
- No previene la dispersión del receptor
- Afecta moderadamente la modulación descendente del receptor
- Afecta más en el papel HER2 como un coreceptor

*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
```

FIG. 7A

Cadena Pesada

```
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 N I K D T Y I H W V R Q A P G K G L

46                              60                              75                              90
E W V A R I Y P T N G Y T R Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D

91                              105                             120                             135
T A V Y Y C S R W G G D G F Y A M 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

136                             150                             165                             180
K 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

181                             195                             210                             225
G 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

226                             240                             255                             270
T 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

271                             285                             300                             315
H 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

316                             330                             345                             360
W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E

361                             375                             390                             405
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G

406                             420                             435                             449
S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G
```

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
```

FIG. 8A

350

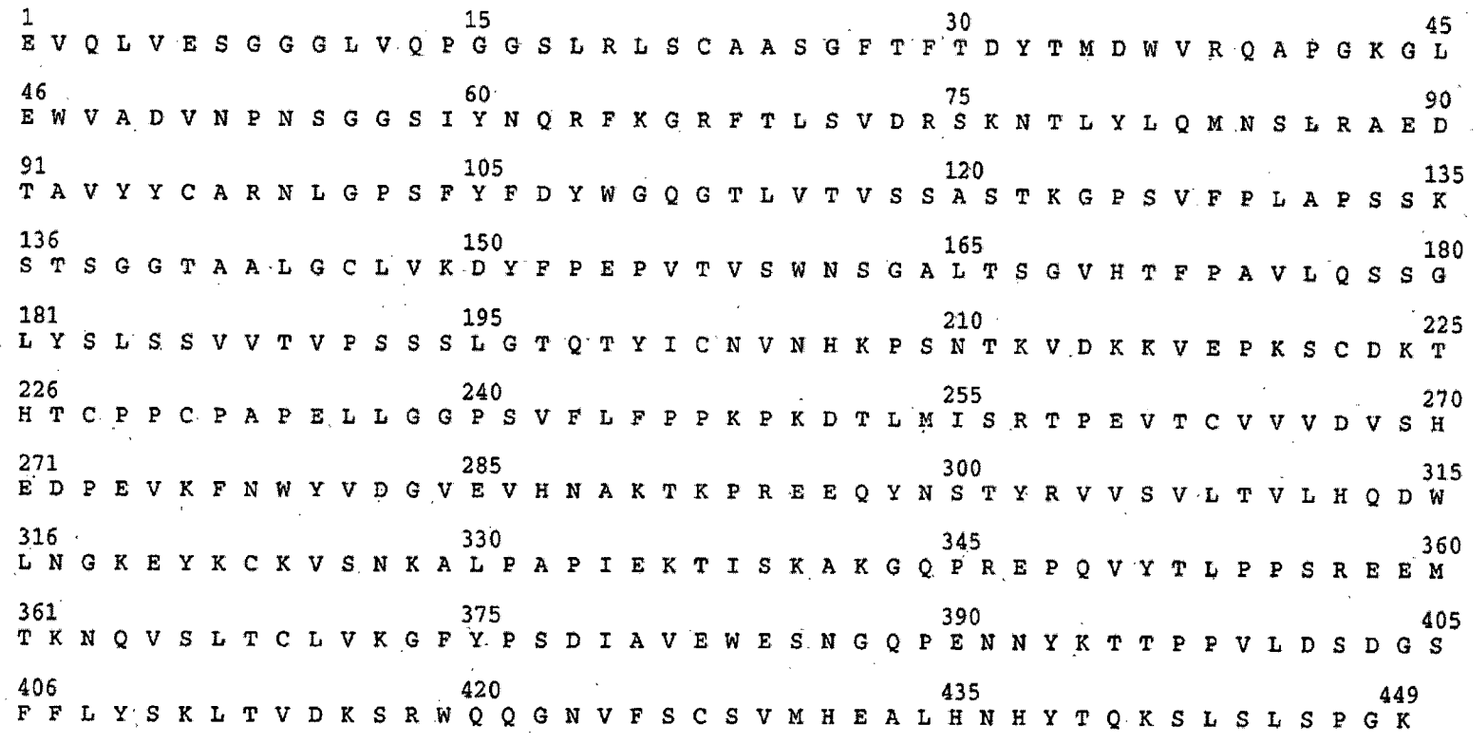

1 15 30 45
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L
46 60 75 90
E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D
91 105 120 135
T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P 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. 9

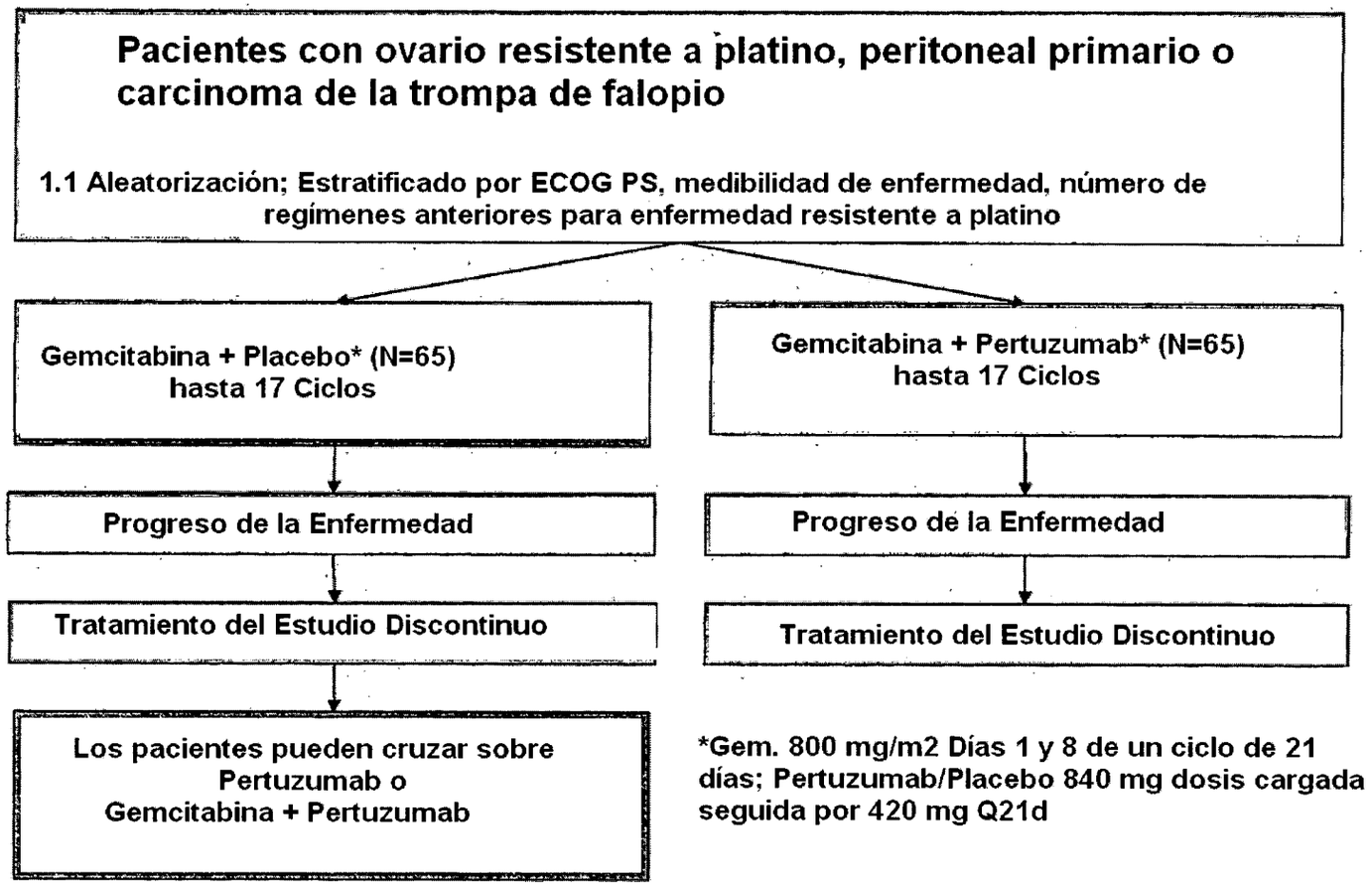

Pacientes con ovario resistente a platino, peritoneal primario o carcinoma de la trompa de falopio
1.1 Aleatorización; Estratificado por ECOG PS, medibilidad de enfermedad, número de regímenes anteriores para enfermedad resistente a platino
Gemcitabina + Placebo* (N=65) hasta 17 Ciclos
Gemcitabina + Pertuzumab* (N=65) hasta 17 Ciclos
Progreso de la Enfermedad
Progreso de la Enfermedad
Tratamiento del Estudio Discontinuo
Tratamiento del Estudio Discontinuo
Los pacientes pueden cruzar sobre Pertuzumab o Gemcitabina + Pertuzumab
*Gem. 800 mg/m2 Días 1 y 8 de un ciclo de 21 días; Pertuzumab/Placebo 840 mg dosis cargada seguida por 420 mg Q21d

FIG. 10A

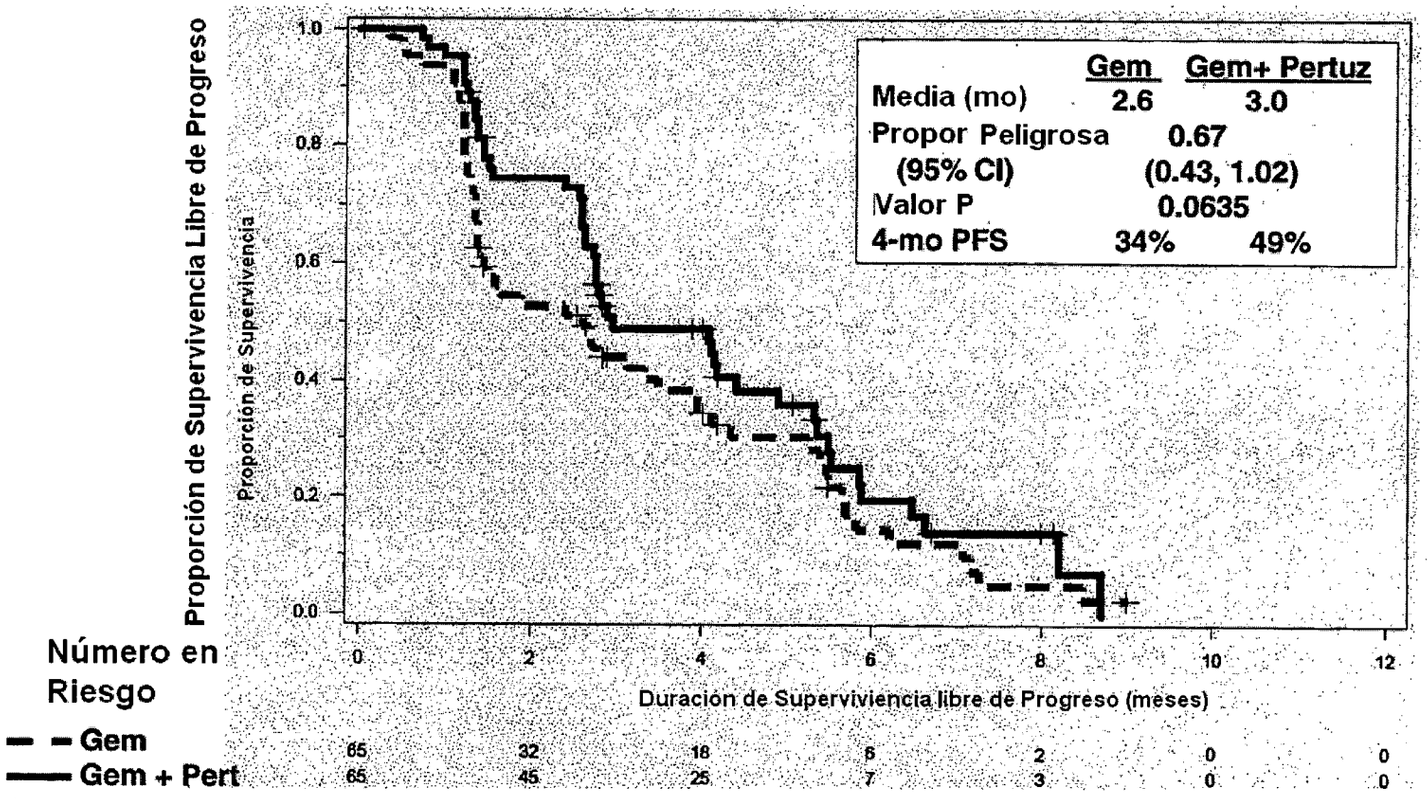
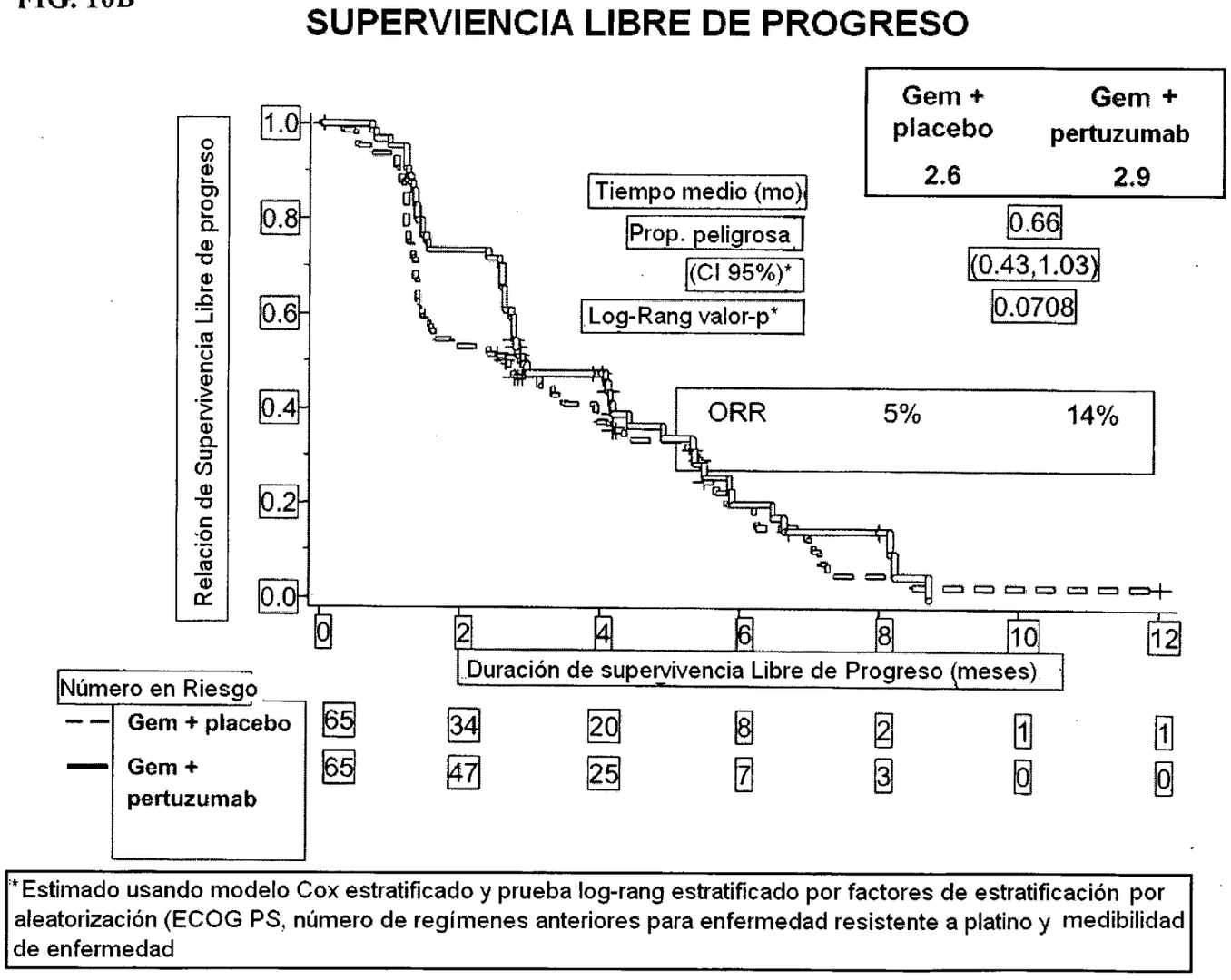
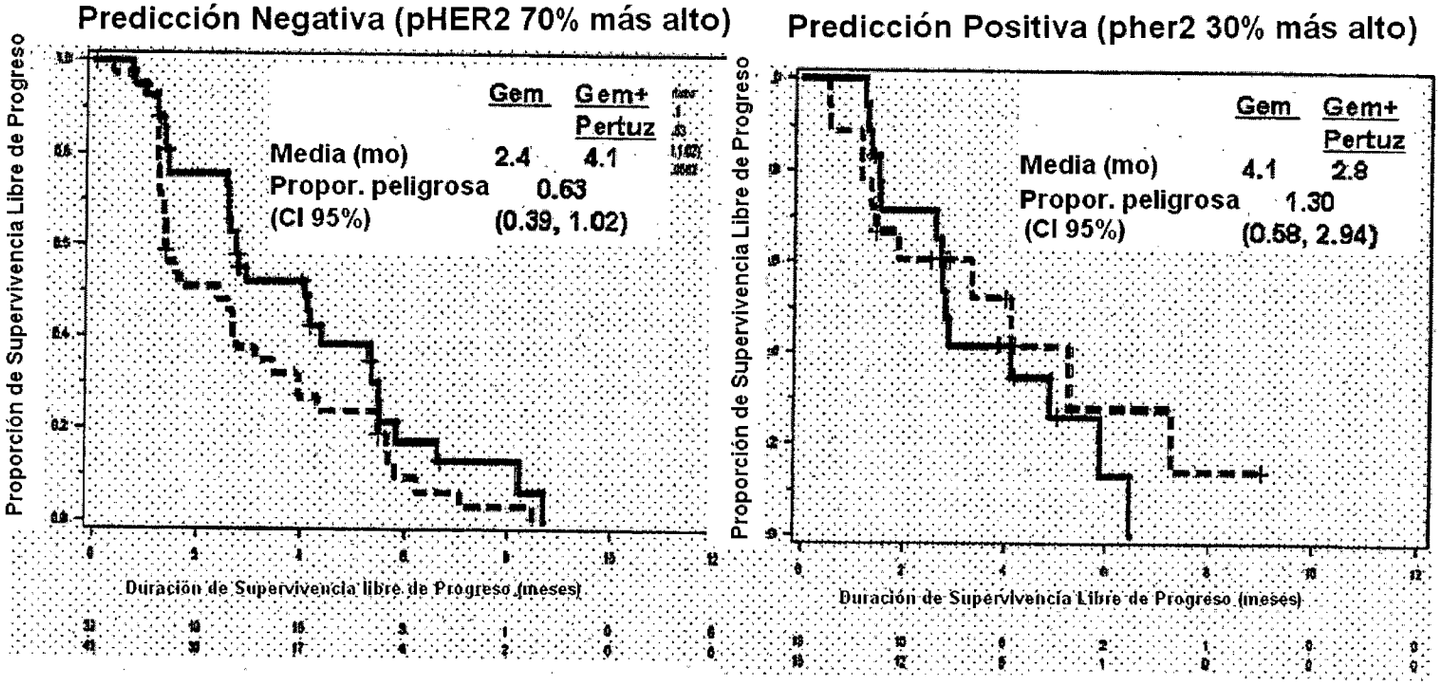

Proporción de Supervivencia Libre de Progreso
Proporción de Supervivencia
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Gem
Gem+ Pertuz
Media (mo) 2.6 3.0
Propor Peligrosa 0.67
(95% CI) (0.43, 1.02)
Valor P 0.0635
4-mo PFS 34% 49%
0
2
4
6
8
10
12
Duración de Supervivencia libre de Progreso (meses)
Número en Riesgo
Gem
Gem + Pert
65 32 18 6 2 0 0
65 45 25 7 3 0 0

FIG. 10B



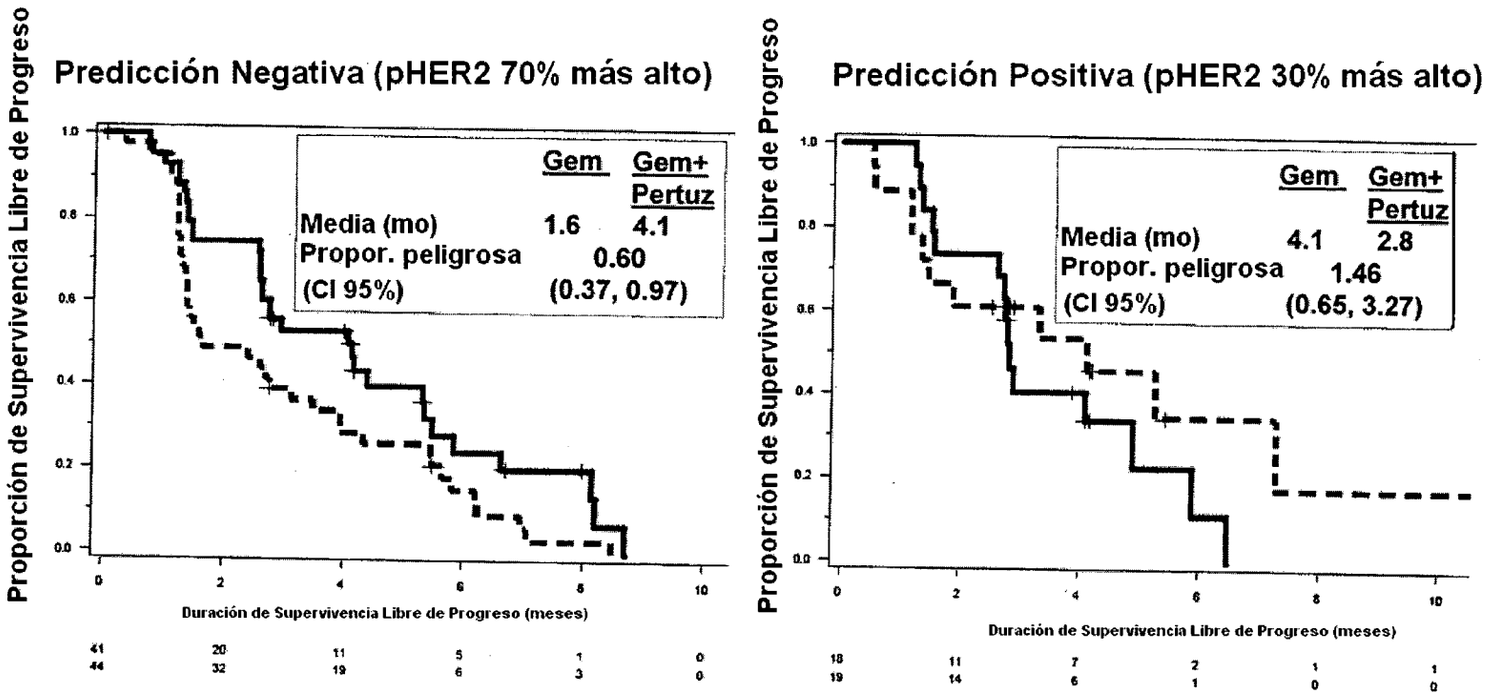

*Estimado usando modelo Cox estratificado y prueba log-rang estratificado por factores de estratificación por aleatorización (ECOG PS, número de regímenes anteriores para enfermedad resistente a platino y medibilidad de enfermedad

FIG. 11A



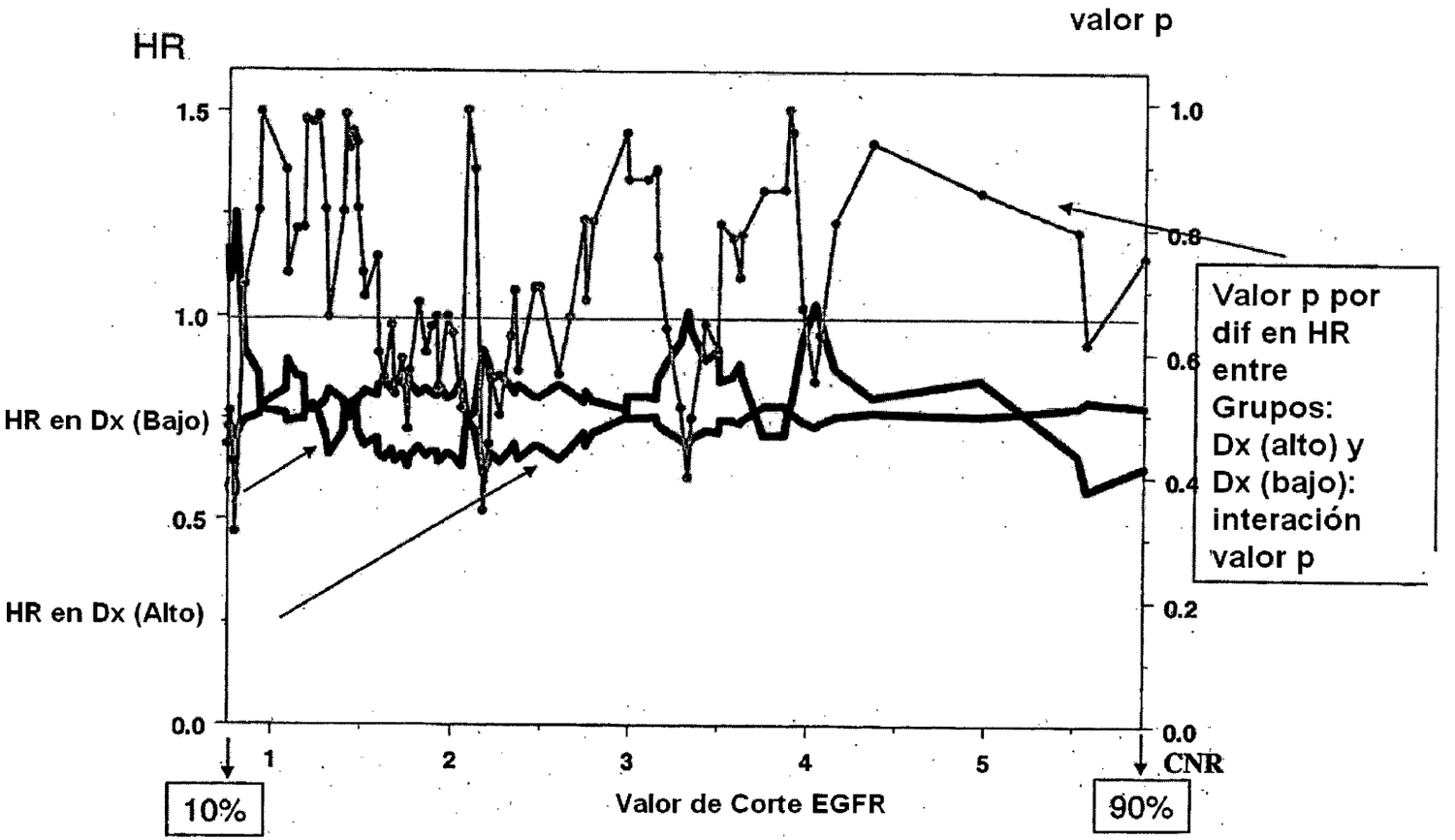

Nota: Dx(+); registro de suma Amfi, Her3, Her3 ≥ 70 por ciento, Dx (-): Otros

FIG. 11B




**Nota: Dx(+): El registro de suma Amfi, Her2, Her3 ≥ 70 por ciento, Dx (-): Otros**

FIG. 12A

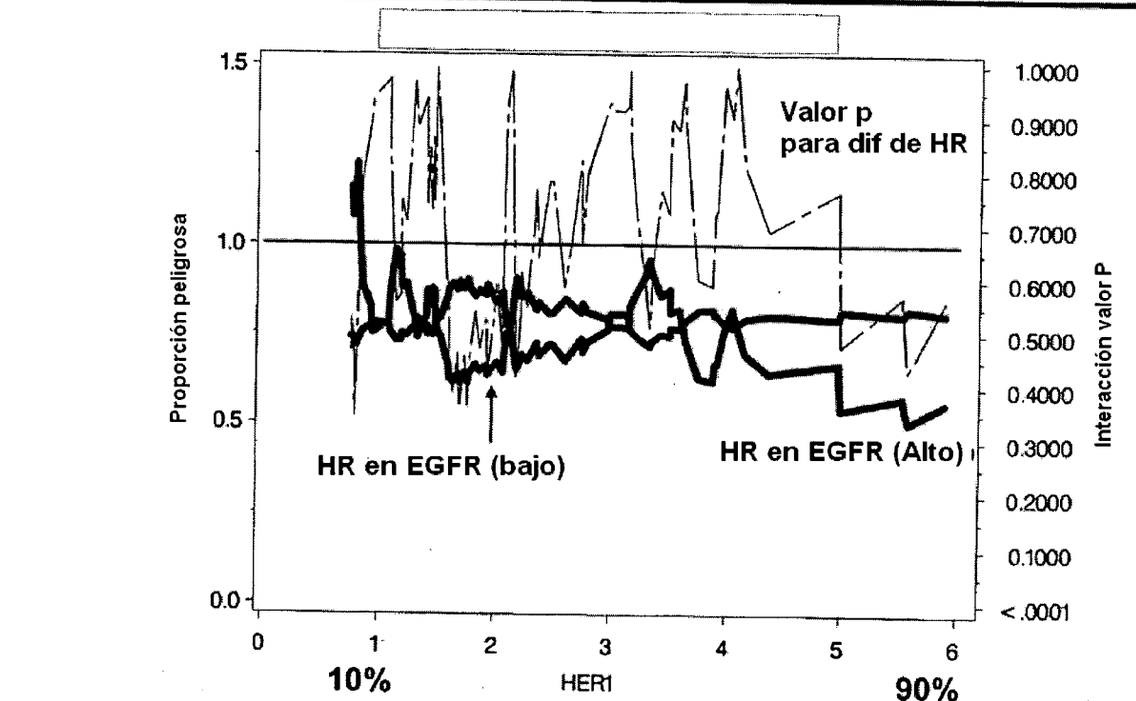



Los valores p no se ajustan por comparaciones múltiples

FIG. 12B

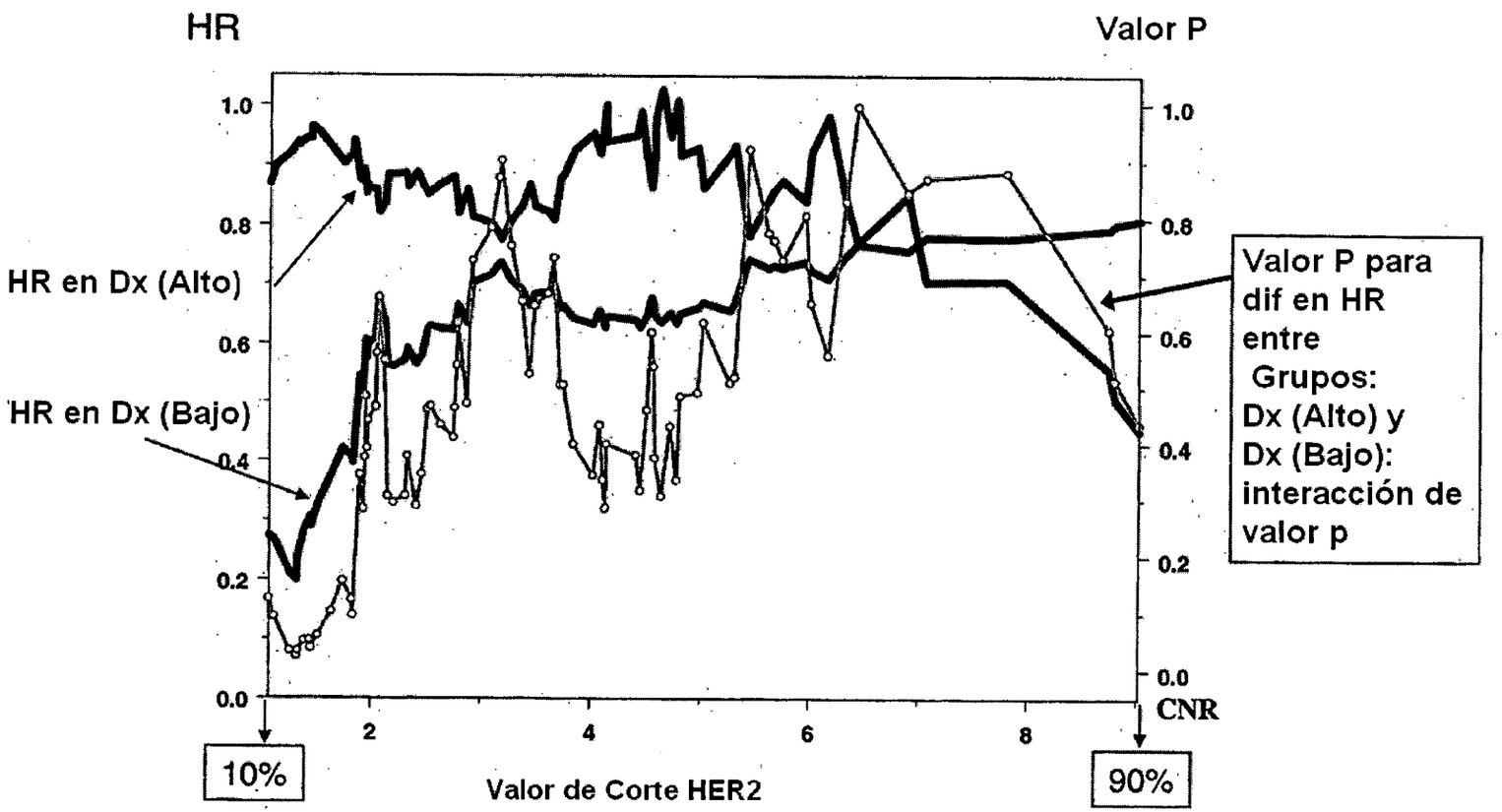
## Análisis de Exploración:

## TOC3258g: PFS por valor de Corte EGFR de qRT-RCP




Valores P no se ajusta por comparaciones múltiples

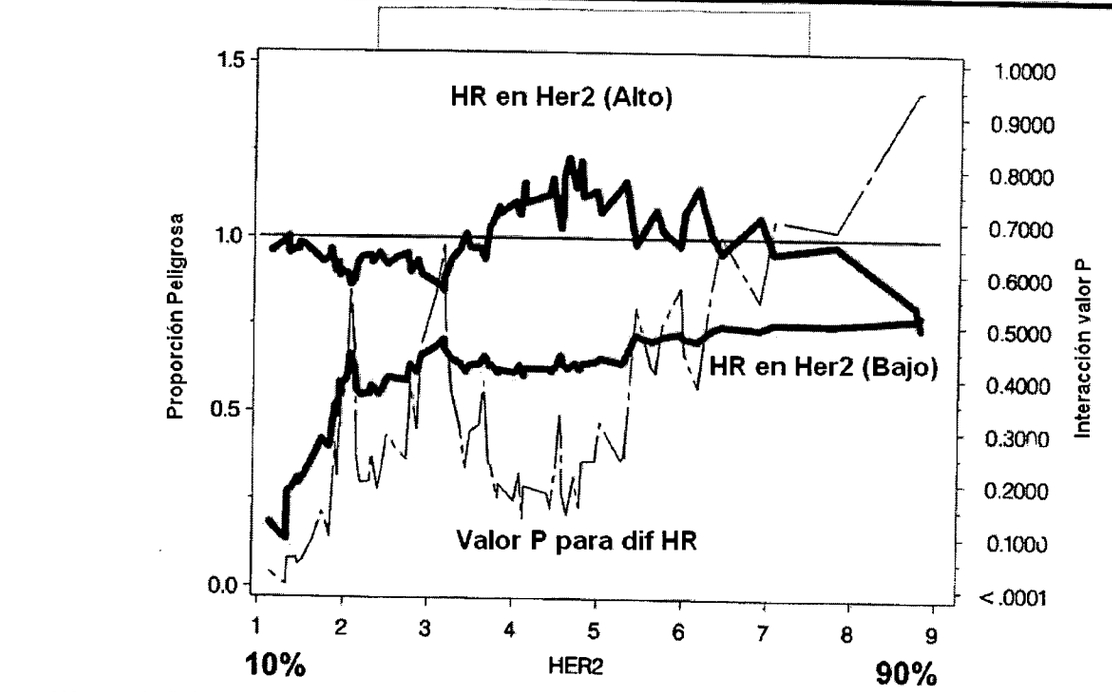
FIG. 13A




Valores P no se ajustan por comparaciones múltiples

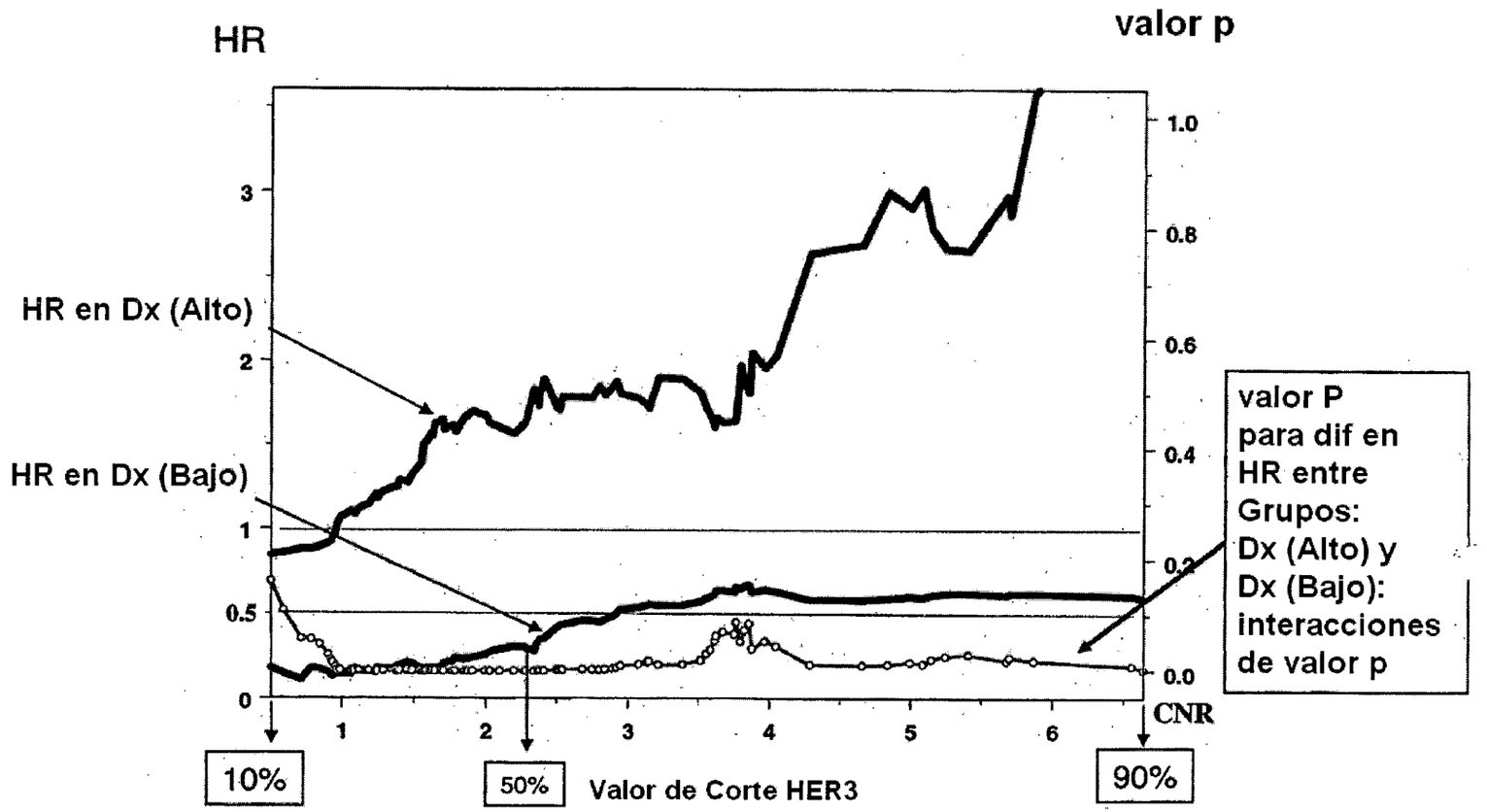
FIG. 13B

# TOC3258g: PFS por Valor de Cortes HER2




**Valores P no se ajustan por comparaciones múltiples**

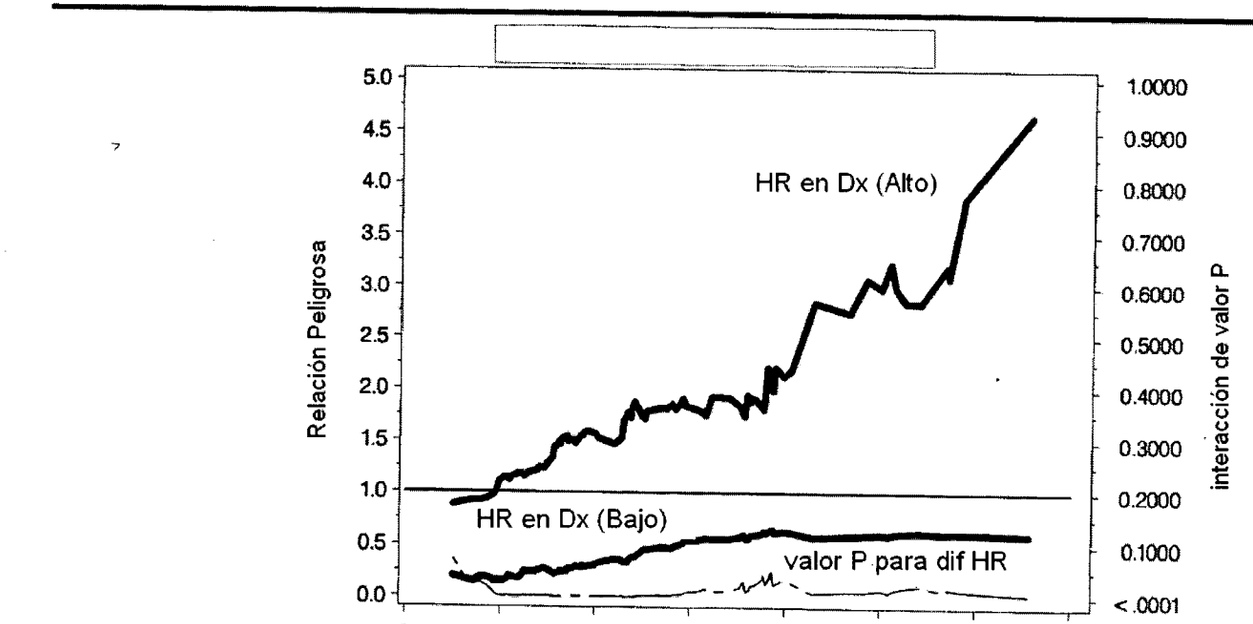
FIG. 14A




Valores P no se ajustan por comparaciones múltiples

FIG. 14B

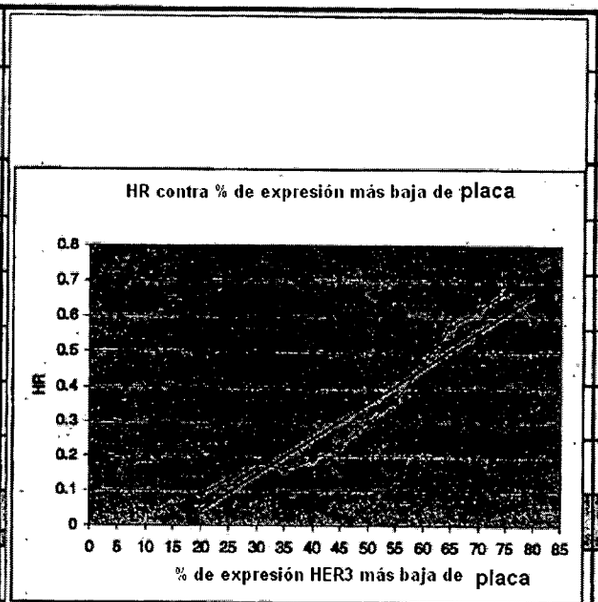
# TOC3258g: PFS por Cortes de HER3 en qRT-PCR




Los valores P no fueron ajustados por comparaciones múltiples

FIG. 15A

| Valor de corte | | | Expresión HER3 baja | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| % de placa | Valor absol. | | N | # Eventos | HR (95%CI) | Valor P de rango Log |
| 20 | 0.99 | | 23 | 16 | 0.09 (0.02, 0.42) | 0.0002 |
| 25 | 1.19 | | 28 | 21 | 0.13 (0.04, 0.45) | 0.0002 |
| 30 | 1.4 | | 35 | 28 | 0.18 (0.06, 0.52) | 0.0004 |
| 35 | 1.57 | | 41 | 32 | 0.16 (0.06, 0.43) | <.0001 |
| 40 | 1.71 | | 47 | 36 | 0.19 (0.08, 0.47) | <.0001 |
| 45 | 1.88 | | 53 | 40 | 0.23 (0.11, 0.50) | <.0001 |
| 50 | 2.28 | | 59 | 46 | 0.30 (0.16, 0.58) | 0.0002 |
| 55 | 2.41 | | 65 | 52 | 0.36 (0.20, 0.65) | 0.0005 |
| 60 | 2.8 | | 71 | 57 | 0.47 (0.27, 0.81) | 0.0060 |
| 65 | 3.14 | | 77 | 63 | 0.57 (0.34, 0.95) | 0.0299 |
| 70 | 3.59 | | 83 | 69 | 0.62 (0.38, 1.00) | 0.0488 |
| 75 | 3.8 | | 89 | 75 | 0.67 (0.42, 1.06) | 0.0898 |
| 80 | 4.29 | | 95 | 78 | 0.59 (0.37, 0.92) | 0.0196 |

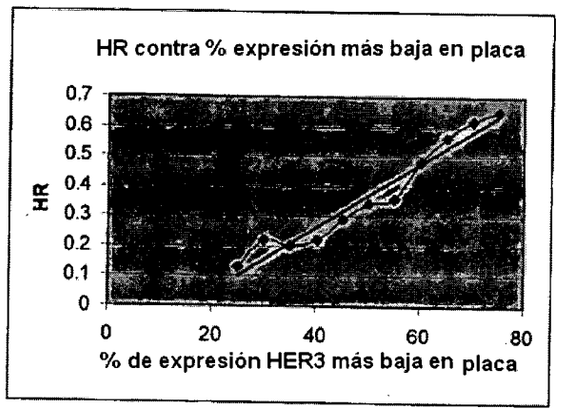



**Los valores P no fueron ajustados por comparaciones múltiples.**

FIG. 15B

# PFS por niveles HER3 en qRT-PCR

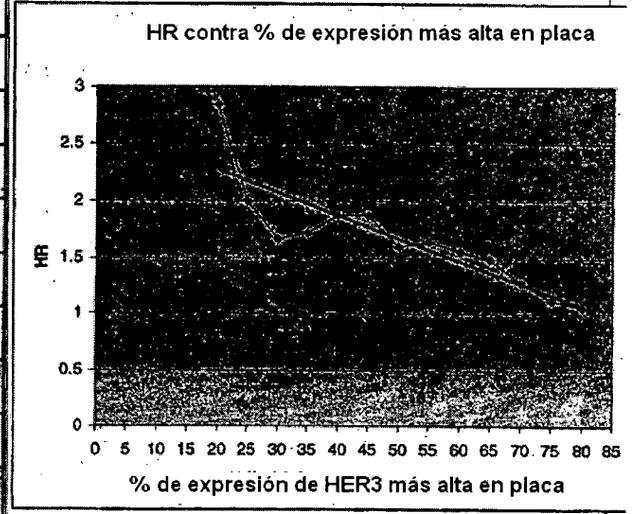
| Valor de corte | |
|---|---|
| % placa | Valor abs. |
| 25 | 1.19 |
| 30 | 1.39 |
| 35 | 1.56 |
| 40 | 1.70 |
| 45 | 1.87 |
| 50 | 2.24 |
| 55 | 2.38 |
| 60 | 2.75 |
| 65 | 3.08 |
| 70 | 3.56 |
| 75 | 3.77 |




| Expresión HER3 Baja | | | |
|---|---|---|---|
| N | # Eventos | HR (95%CI) | valor P en rango Log |
| 30 | 23 | 0.13 (0.04, 0.41) | <.0001 |
| 36 | 29 | 0.22 (0.09, 0.56) | 0.0005 |
| 42 | 33 | 0.20 (0.09, 0.48) | <.0001 |
| 48 | 38 | 0.22 (0.10, 0.50) | <.0001 |
| 54 | 42 | 0.29 (0.14, 0.58) | 0.0002 |
| 61 | 48 | 0.34 (0.18, 0.63) | 0.0004 |
| 66 | 53 | 0.36 (0.20, 0.65) | 0.0005 |
| 73 | 59 | 0.48 (0.28, 0.84) | 0.0080 |
| 79 | 65 | 0.56 (0.34, 0.94) | 0.0255 |
| 85 | 71 | 0.62 (0.38, 1.00) | 0.0459 |
| 91 | 76 | 0.65 (0.41, 1.03) | 0.0650 |

FIG. 16A

| Valor de corte | | Expresión de HER3 Alta | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| % placa | Valor abs. | N | # Eventos | HR (95%CI) | Valor P rango Log |
| 20 | 0.99 | 96 | 78 | 1.06 (0.67, 1.65) | 0.8083 |
| 25 | 1.19 | 91 | 73 | 1.13 (0.71, 1.81) | 0.5875 |
| 30 | 1.4 | 84 | 66 | 1.28 (0.77, 2.10) | 0.3318 |
| 35 | 1.57 | 78 | 62 | 1.49 (0.89, 2.51) | 0.1280 |
| 40 | 1.71 | 72 | 58 | 1.55 (0.90, 2.68) | 0.1141 |
| 45 | 1.88 | 66 | 54 | 1.64 (0.94, 2.88) | 0.0817 |
| 50 | 2.28 | 60 | 48 | 1.60 (0.89, 2.87) | 0.1161 |
| 55 | 2.41 | 54 | 42 | 1.87 (0.97, 3.57) | 0.0565 |
| 60 | 2.8 | 48 | 37 | 1.83 (0.92, 3.64) | 0.0766 |
| 65 | 3.14 | 42 | 31 | 1.72 (0.78, 3.75) | 0.1693 |
| 70 | 3.59 | 36 | 25 | 1.67 (0.72, 3.90) | 0.2270 |
| 75 | 3.8 | 30 | 19 | 2.00 (0.71, 5.62) | 0.1790 |
| 80 | 4.29 | 24 | 16 | 2.85 (0.89, 9.20) | 0.0667 |




**Los valores P no fueron ajustados por comparaciones múltiples**

FIG. 16B

# PFS por niveles de HER3 en qRT-PCR

| Valor de corte | | Expresión HER3 alta | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| % en placa | Valor abs. | N | # Eventos | HR (95%CI) | valor P rango Log |
| 25 | 1.19 | 92 | 74 | 1.16 (0.73, 1.84) | 0.5222 |
| 30 | 1.39 | 86 | 68 | 1.20 (0.74, 1.94) | 0.4674 |
| 35 | 1.56 | 80 | 64 | 1.37 (0.83, 2.26) | 0.2230 |
| 40 | 1.70 | 74 | 59 | 1.50 (0.88, 2.55) | 0.1381 |
| 45 | 1.87 | 68 | 55 | 1.50 (0.87, 2.61) | 0.1468 |
| 50 | 2.24 | 61 | 49 | 1.48 (0.83, 2.63) | 0.1809 |
| 55 | 2.38 | 56 | 44 | 1.74 (0.93, 3.27) | 0.0816 |
| 60 | 2.75 | 49 | 38 | 1.81 (0.90, 3.67) | 0.0945 |
| 65 | 3.08 | 43 | 32 | 1.78 (0.82, 3.86) | 0.1382 |
| 70 | 3.56 | 37 | 26 | 1.73 (0.75, 3.99) | 0.1943 |
| 75 | 3.77 | 31 | 21 | 1.90 (0.73, 4.93) | 0.1804 |

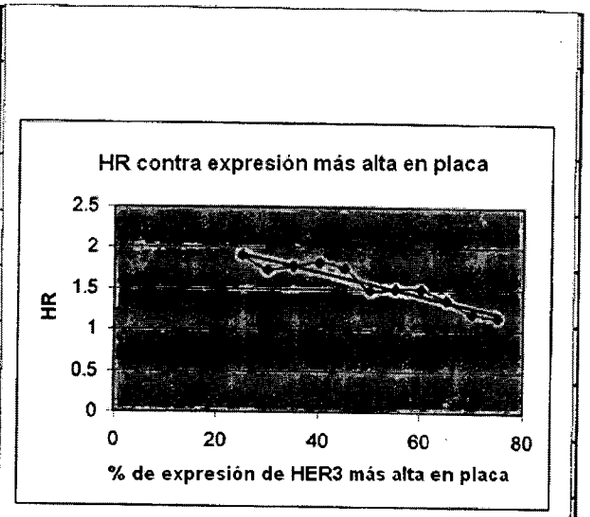


FIG. 17A

| Valor de corte | | Expresión de HER3 Alta | | | | Expresión de HER3 Baja | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % en placa | Valor abs. | N | # Eventos | HR (95%CI) | valor P rango Log | N | # Eventos | HR (95%CI) | valor P rango Log |
| 20 | 0.99 | 96 | 78 | 1.06 (0.67, 1.65) | 0.8083 | 23 | 16 | 0.09 (0.02, 0.42) | 0.0002 |
| KM | 1.19 | 91 | 73 | 1.13 (0.71, 1.81) | 0.5875 | 28 | 21 | 0.13 (0.04, 0.45) | 0.0002 |
| 30 | 1.4 | 84 | 66 | 1.28 (0.77, 2.10) | 0.3318 | 35 | 28 | 0.18 (0.06, 0.52) | 0.0004 |
| 35 | 1.57 | 78 | 62 | 1.49 (0.89, 2.51) | 0.1280 | 41 | 32 | 0.16 (0.06, 0.43) | <.0001 |
| 40 | 1.71 | 72 | 58 | 1.55 (0.90, 2.68) | 0.1141 | 47 | 36 | 0.19 (0.08, 0.47) | <.0001 |
| 45 | 1.88 | 66 | 54 | 1.64 (0.94, 2.88) | 0.0817 | 53 | 40 | 0.23 (0.11, 0.50) | <.0001 |
| KM | 2.28 | 60 | 48 | 1.60 (0.89, 2.87) | 0.1161 | 59 | 46 | 0.30 (0.16, 0.58) | 0.0002 |
| 55 | 2.41 | 54 | 42 | 1.87 (0.97, 3.57) | 0.0565 | 65 | 52 | 0.36 (0.20, 0.65) | 0.0005 |
| 60 | 2.8 | 48 | 37 | 1.88 (0.92, 3.85) | 0.0766 | 71 | 57 | 0.47 (0.27, 0.81) | 0.0060 |
| 65 | 3.14 | 42 | 31 | 1.72 (0.78, 3.75) | 0.1693 | 77 | 63 | 0.57 (0.34, 0.95) | 0.0299 |
| 70 | 3.59 | 36 | 25 | 1.67 (0.72, 3.90) | 0.2270 | 83 | 69 | 0.62 (0.38, 1.00) | 0.0488 |
| 75 | 3.8 | 30 | 19 | 2.00 (0.71, 5.62) | 0.1790 | 89 | 75 | 0.67 (0.42, 1.06) | 0.0898 |
| 80 | 4.29 | 24 | 16 | 2.85 (0.89, 9.20) | 0.0667 | 95 | 78 | 0.59 (0.37, 0.92) | 0.0196 |

Los valores P no fueron ajustados por comparaciones múltiples

FIG. 17B

# PFS by qRT-PCR HER3 Levels

| Valor de Corte | | Expresión de HER3 alta | | | | Expresión de HER3 Baja | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % en placa | Valor abs. | N | # Eventos | HR (95%CI) | valor P rango Log | N | # Eventos | HR (95%CI) | valor P rango Log |
| KM 20 | 1.19 | 92 | 74 | 1.16 (0.73, 1.84) | 0.5222 | 30 | 23 | 0.13 (0.04, 0.41) | <.0001 |
| 30 | 1.39 | 86 | 68 | 1.20 (0.74, 1.94) | 0.4674 | 36 | 29 | 0.22 (0.09, 0.56) | 0.0005 |
| 35 | 1.56 | 80 | 64 | 1.37 (0.83, 2.26) | 0.2230 | 42 | 33 | 0.20 (0.09, 0.48) | <.0001 |
| 40 | 1.70 | 74 | 59 | 1.50 (0.88, 2.55) | 0.1381 | 48 | 38 | 0.22 (0.10, 0.50) | <.0001 |
| 45 | 1.87 | 68 | 55 | 1.50 (0.87, 2.61) | 0.1468 | 54 | 42 | 0.29 (0.14, 0.58) | 0.0002 |
| KM 50 | 2.24 | 61 | 49 | 1.48 (0.83, 2.63) | 0.1809 | 61 | 48 | 0.34 (0.18, 0.63) | 0.0004 |
| 55 | 2.38 | 56 | 44 | 1.74 (0.93, 3.27) | 0.0816 | 66 | 53 | 0.36 (0.20, 0.65) | 0.0005 |
| 60 | 2.75 | 49 | 38 | 1.81 (0.90, 3.67) | 0.0945 | 73 | 59 | 0.48 (0.28, 0.84) | 0.0080 |
| 65 | 3.08 | 43 | 32 | 1.78 (0.82, 3.86) | 0.1382 | 79 | 65 | 0.56 (0.34, 0.94) | 0.0255 |
| 70 | 3.56 | 37 | 26 | 1.73 (0.75, 3.99) | 0.1943 | 85 | 71 | 0.62 (0.38, 1.00) | 0.0459 |
| 75 | 3.77 | 31 | 21 | 1.90 (0.73, 4.93) | 0.1804 | 91 | 76 | 0.65 (0.41, 1.03) | 0.0650 |

FIG. 18A

| qrt-PCR HER3 | n | # de eventos | Tratamiento HR (CI al 95) | Valor P rango Log |
|---|---|---|---|---|
| 0 – < 25 por ciento | 28 | 21 | 0.13 (0.04, 0.45) | 0.0002 |
| 25 – < 50 por ciento | 31 | 25 | 0.42 (0.17, 1.00) | 0.0465 |
| 50 – < 75 por ciento | 30 | 29 | 2.11 (0.94, 4.75) | 0.0631 |
| 75 – 100 por ciento | 30 | 19 | 2.00 (0.71, 5.62) | 0.1790 |

Los valores P fueron ajustados por comparaciones múltiples

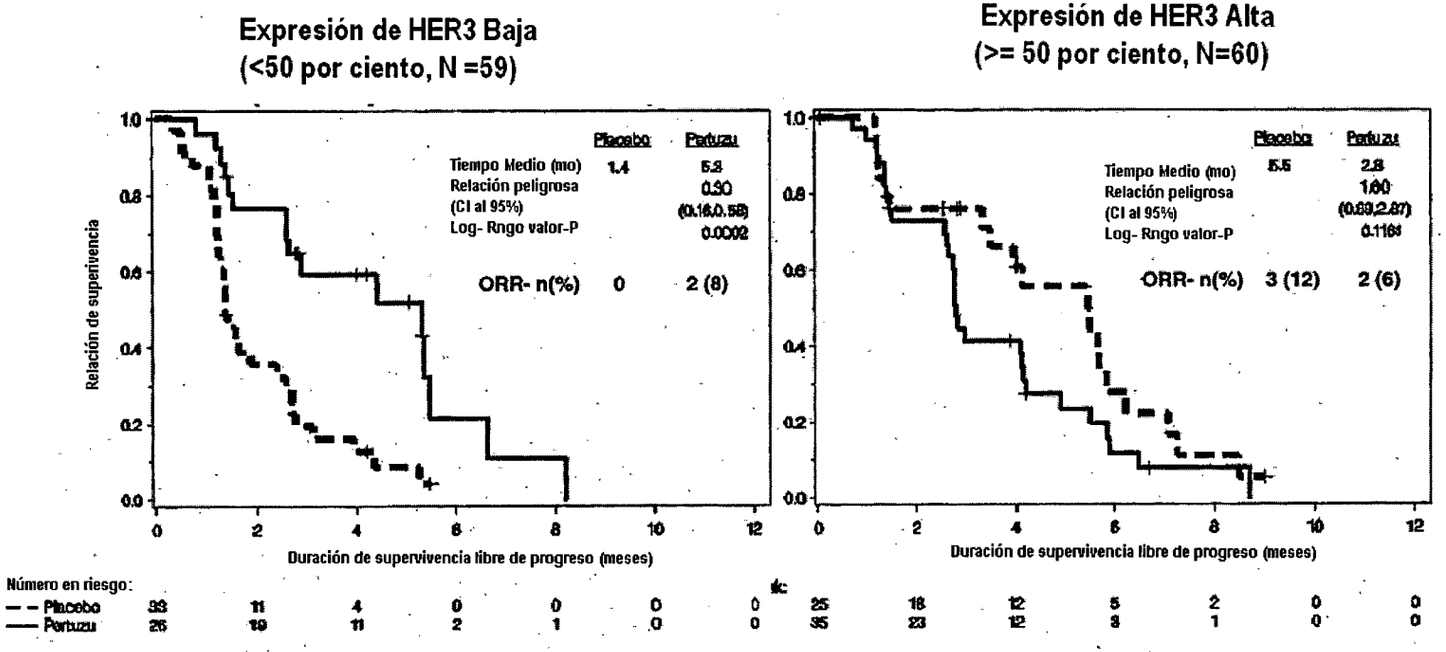
FIG. 18B

# Análisis de Supervivencia libre de progreso (PSF) por Cuartos de Expresión de HER3

| HER3 en qRT-PCR | N | # de Eventos | HR (95%CI) | Valor P rango Log |
|---|---|---|---|---|
| 0 – < 25 por ciento | 30 | 23 | 0.13 (0.04, 0.41) | <.0001 |
| 25 – < 50 por ciento | 31 | 25 | 0.66 (0.29, 1.48) | 0.3181 |
| 50 – < 75 por ciento | 30 | 28 | 1.59 (0.73, 3.44) | 0.2318 |
| 75 – 100 por ciento | 31 | 21 | 1.90 (0.73, 4.93) | 0.1804 |

| Todos los pacientes | Gem | Gem+ Pertuz |
|---|---|---|
| Media (mo) | 2.6 | 3.0 |
| Relación peligrosa* | 0.67 | |
| (CI al 95%) | (0.43, 1.02) | |
| valor-P* | 0.0635 | |
| ORR-n(%) | 3 (5) | 5 (8) |

FIG. 19A



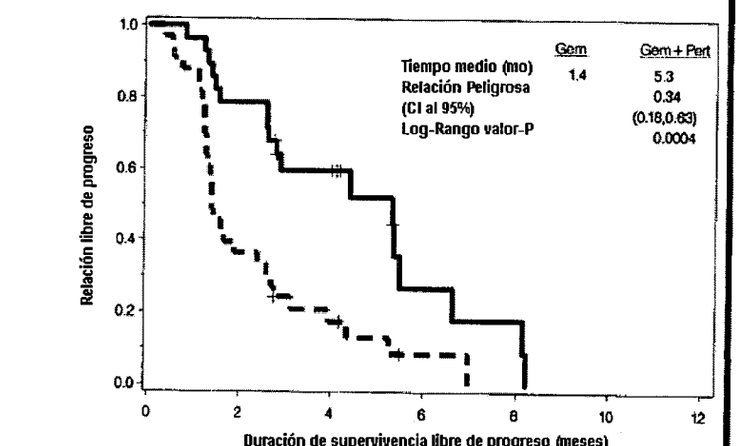

El valor-P para la diferencia en HR entre dos subgrupos dx es 0.0001
Nota: 50 por ciento = 2.28 CNR

FIG. 19B

| Todos los pacientes | Gem | Gem + Pertuz |
|---|---|---|
| Media (mo) | 2.6 | 2.9 |
| Relación peligrosa* | 0.66 | |
| (CI al 95%) | (0.43, 1.03) | |
| valor-P* | 0.07 | |

# PFS por HER3 en qRT-PCR 50/50 - división

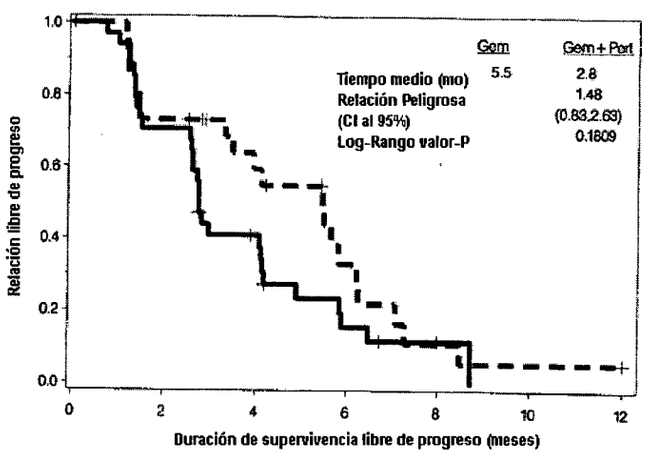
## Expresión de HER3 baja (<50 por ciento, N=61)




Número en riesgo

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gem | 33 | 12 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Gem + Pert | 28 | 22 | 13 | 3 | 2 | 0 | 0 |

## Expresión de HER3 Alta (>= 50 por ciento, N = 61)




Número en riesgo

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gem | 26 | 19 | 13 | 6 | 2 | 1 | 1 |
| Gem + Pert | 35 | 24 | 12 | 4 | 1 | 0 | 0 |

El valor P por la diferencia en HR entre dos subgrupos dx es 0.0005
Nota: 50 por ciento = 2.24 CNR.

FIG. 20A

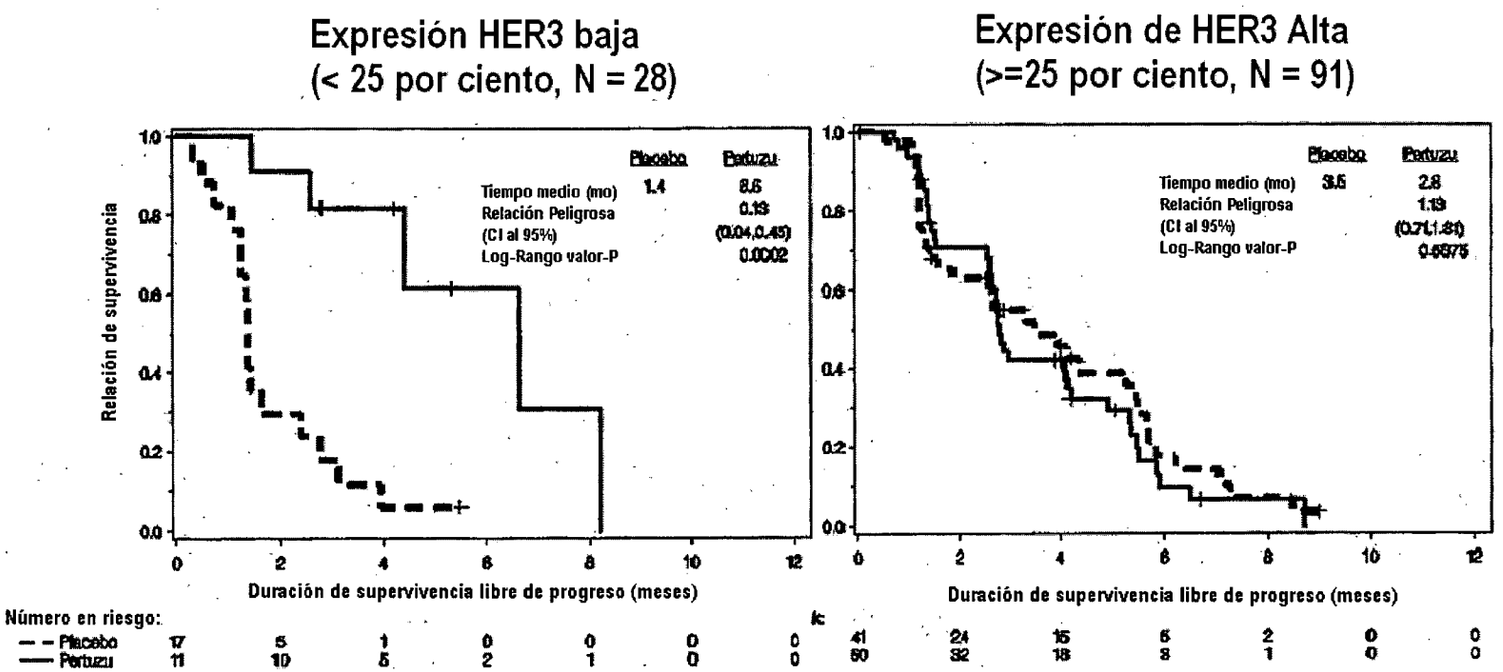
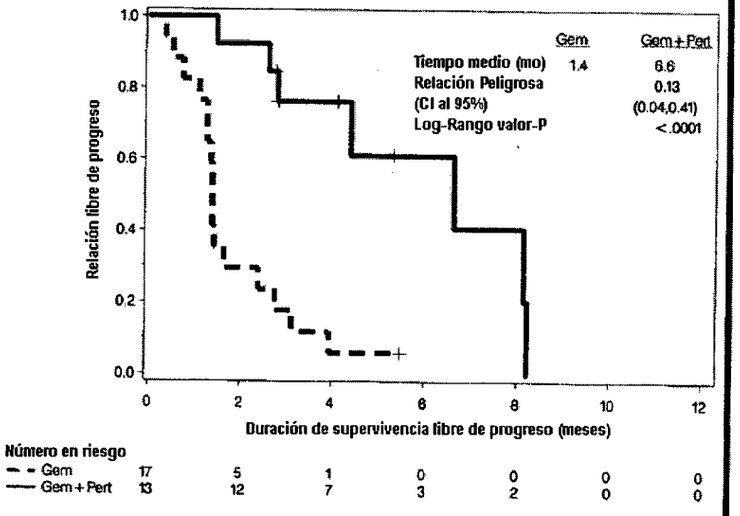

Expresión HER3 baja
(< 25 por ciento, N = 28)
Expresión de HER3 Alta
(>=25 por ciento, N = 91)
Relación de supervivencia
Duración de supervivencia libre de progreso (meses)
Placebo
Pertuzu
Tiempo medio (mo)
Relación Peligrosa
(CI al 95%)
Log-Rango valor-P
1.4
8.5
0.13
(0.04,0.45)
0.0002
3.5
2.8
1.13
(0.71,1.81)
0.6575
Número en riesgo:
Placebo 17 5 1 0 0 0 0
Pertuzu 11 10 5 2 1 0 0
Placebo 41 24 15 5 2 0 0
Pertuzu 50 32 18 8 1 0 0

FIG. 20B

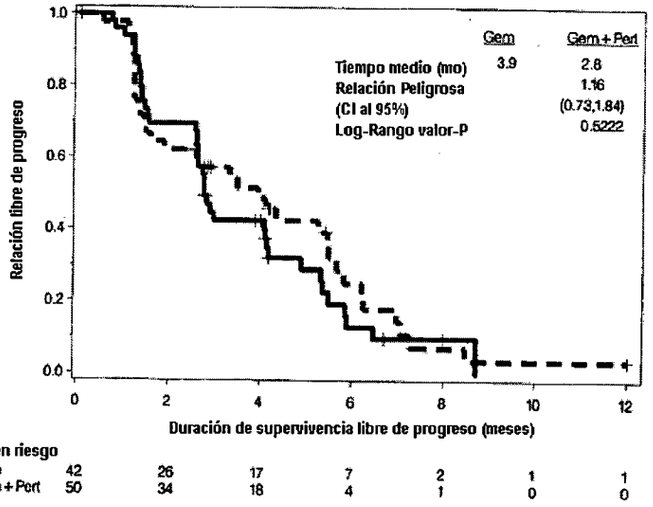
| Todos los pacientes | Gem | Gem + Pertuz |
|---|---|---|
| Media (mo) | 2.6 | 2.9 |
| Relación peligrosa* | 0.66 | |
| (CI al 95%) | (0.43, 1.03) | |
| valor-P* | 0.07 | |

# PFS por HER3 en qRT-PCR 25/75 - división

**Expresión de HER3 baja (<25 por ciento, N = 30)**



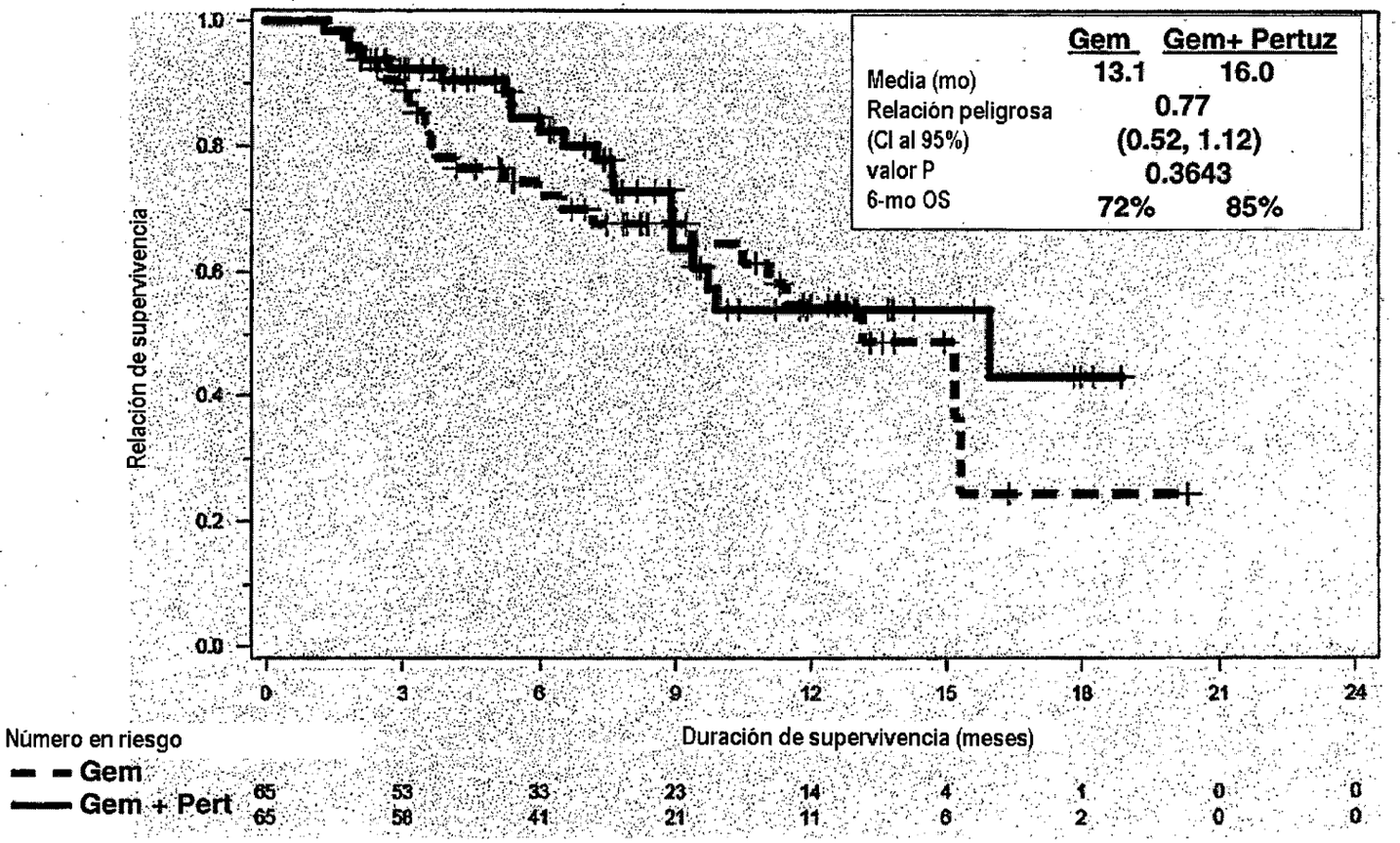

**Expresión de HER3 Alta (>= 25 por ciento, N=92)**




**El valor P para la diferencia en HR entre dos subgrupos dx es 0.0003**
**Nota: 25 por ciento = 1.19 CNR.**

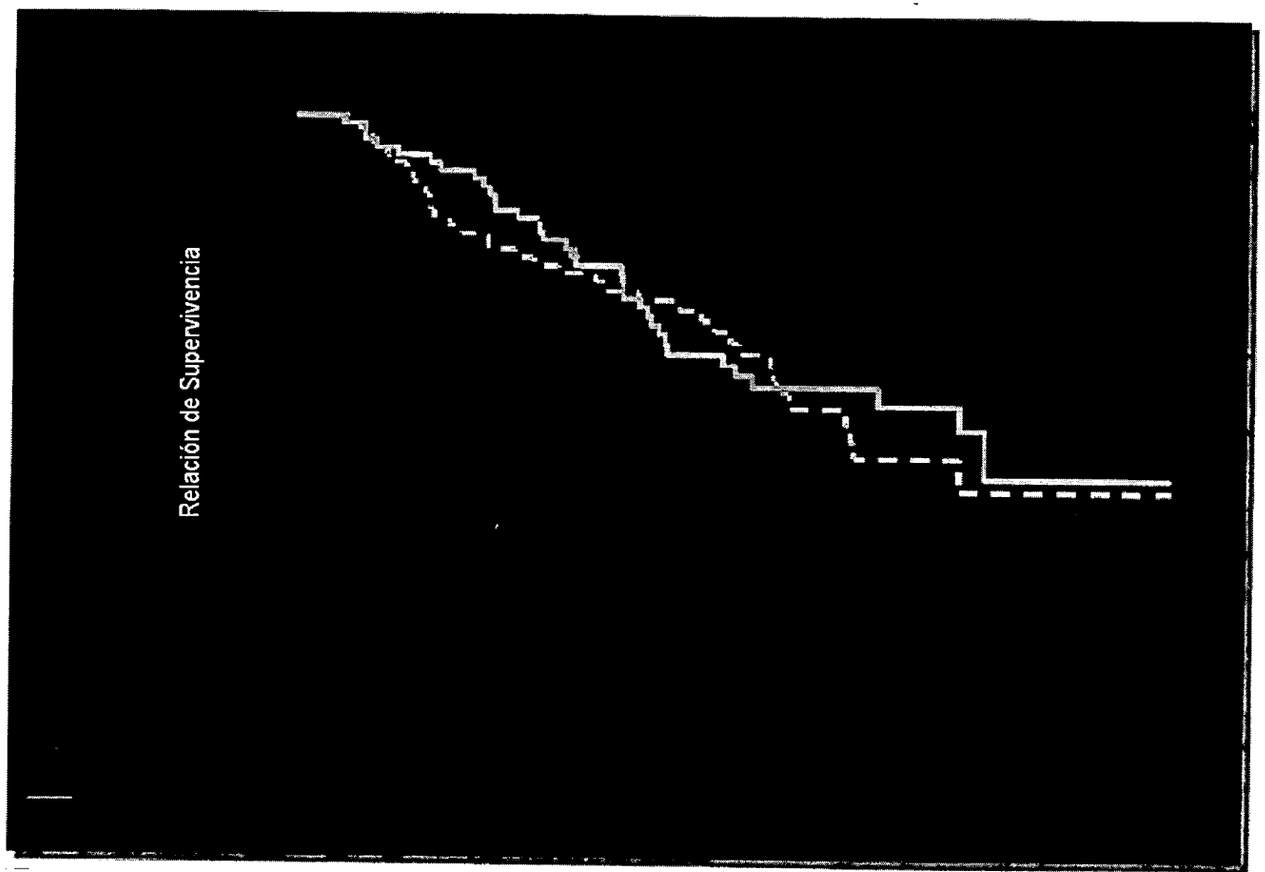
374

FIG. 21A


Gem
Gem+ Pertuz
Media (mo) 13.1 16.0
Relación peligrosa 0.77
(CI al 95%) (0.52, 1.12)
valor P 0.3643
6-mo OS 72% 85%
Relación de supervivencia
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0 3 6 9 12 15 18 21 24
Duración de supervivencia (meses)
Número en riesgo
Gem 65 53 33 23 14 4 1 0 0
Gem + Pert 65 58 41 21 11 6 2 0 0

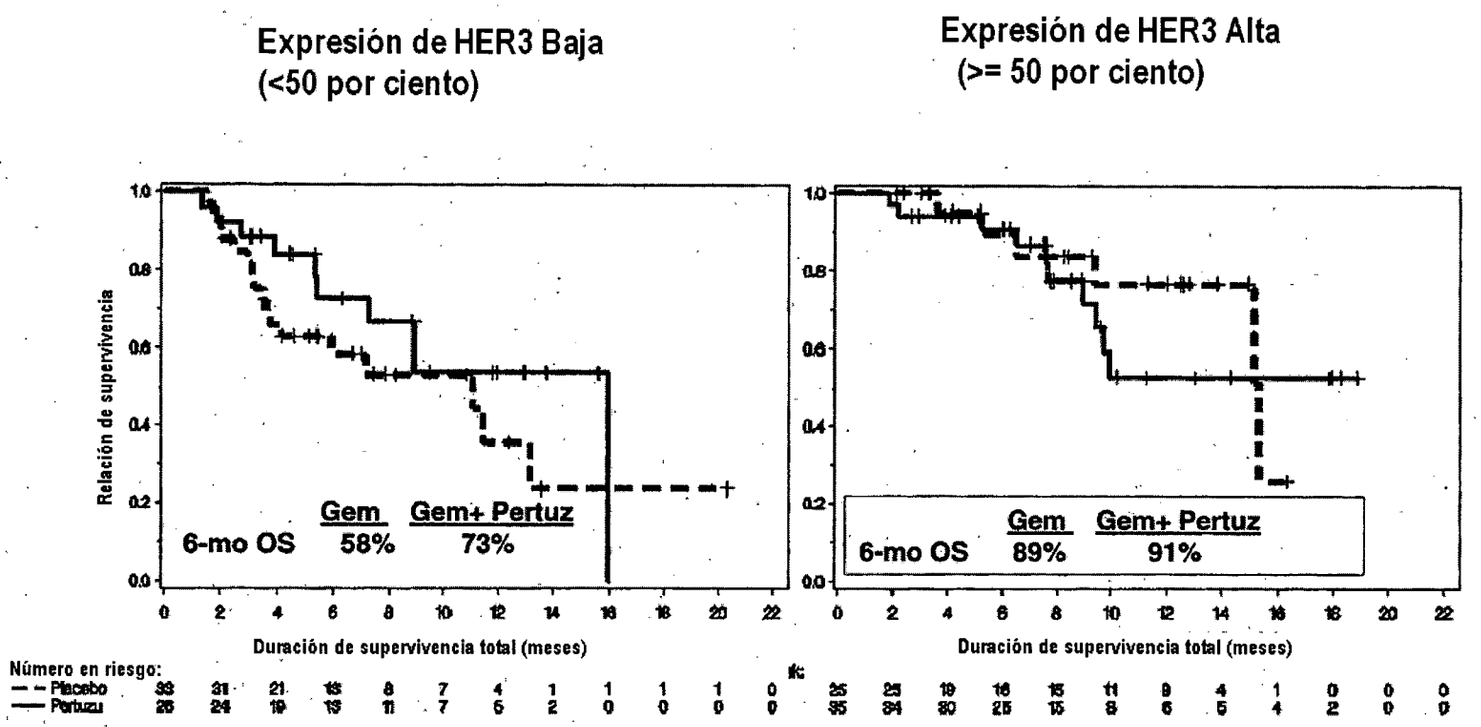
## Supervivencia Total Preliminar
## (71 muertes para Abril 20, 2007)

FIG. 21B




*Estimado usando el modelo Cox estratificado y la prueba log-rango estratificada por factores de estratificación por aleatorización (ECOG PS, número de régimenes previos para enfermedad resistente a platino y capacidad de medición de la enfermedad)

FIG. 22A



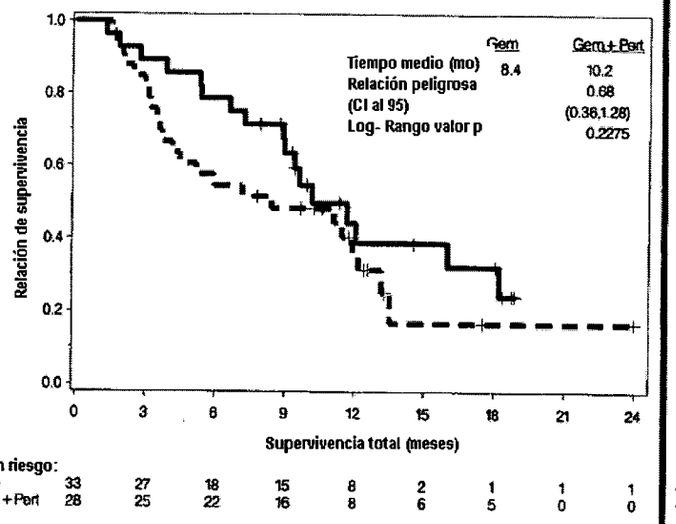

Nota: 50 por ciento = 2.28 CNR

| Todos los pacientes | Gem | Gem+ Pertuz |
|---|---|---|
| 6-mo OS | 72% | 85% |

FIG. 22B

# OS Preliminar por HER3 en qRT-PCR 50-50 - división

## Expresión de HER3 baja (<50 por ciento, N = 61)




## Expresión de HER3 alta (>= 50 por ciento, N = 61)

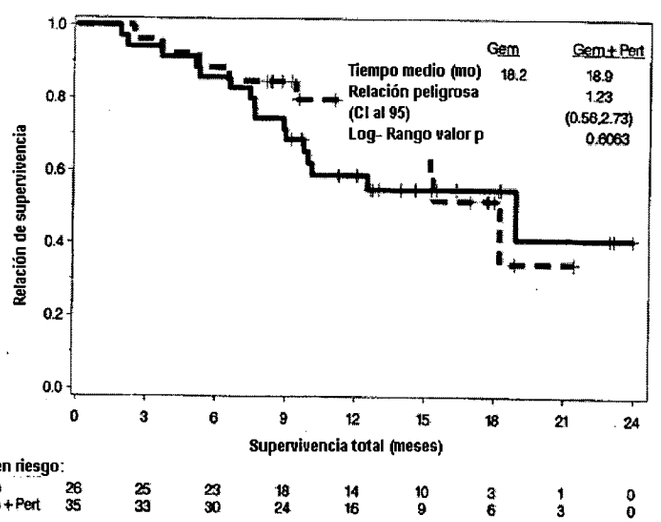


FIG. 23A

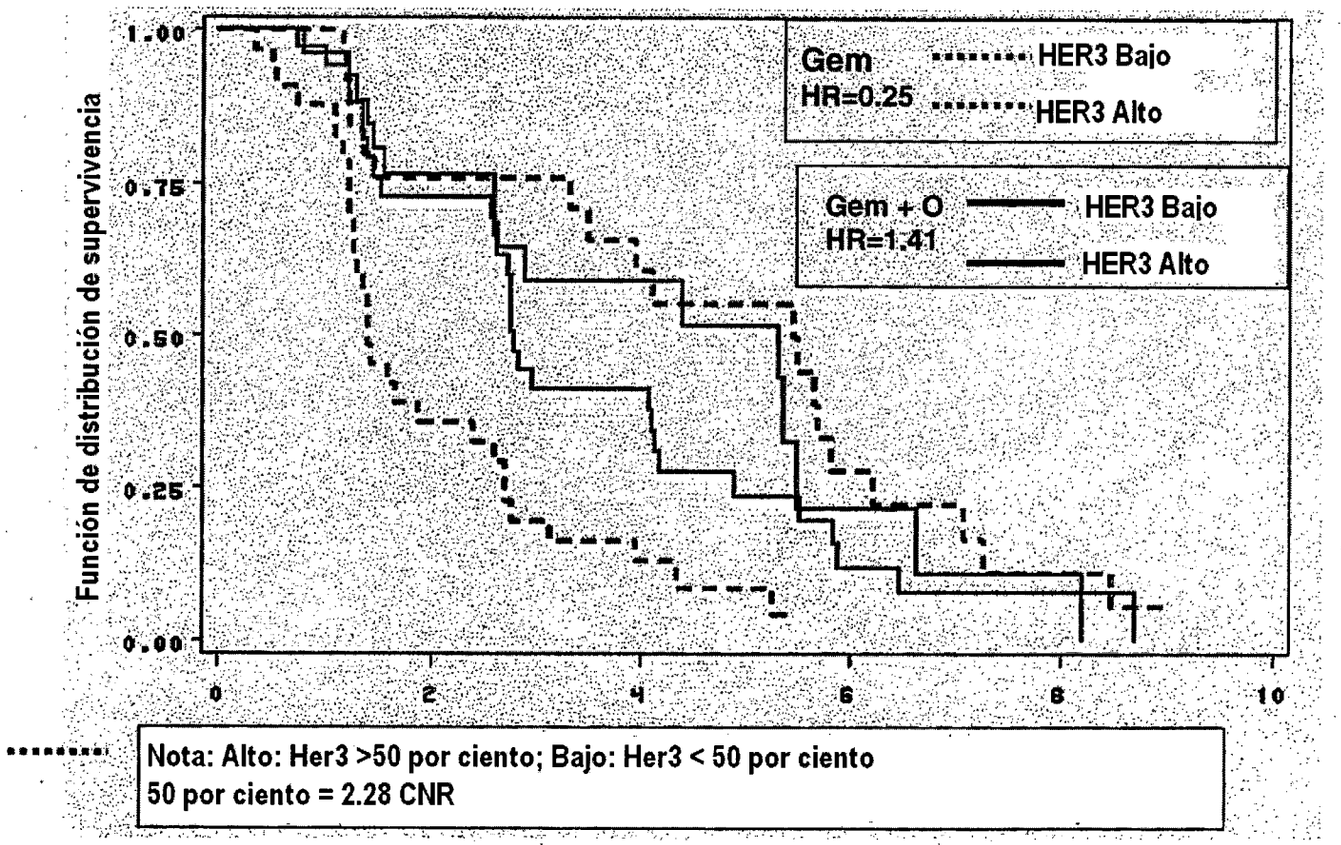

Función de distribución de supervivencia
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
2
4
6
8
10
Gem
HR=0.25
HER3 Bajo
HER3 Alto
Gem + O
HR=1.41
HER3 Bajo
HER3 Alto
Nota: Alto: Her3 >50 por ciento; Bajo: Her3 < 50 por ciento
50 por ciento = 2.28 CNR

FIG. 23B

# PFS por HER3

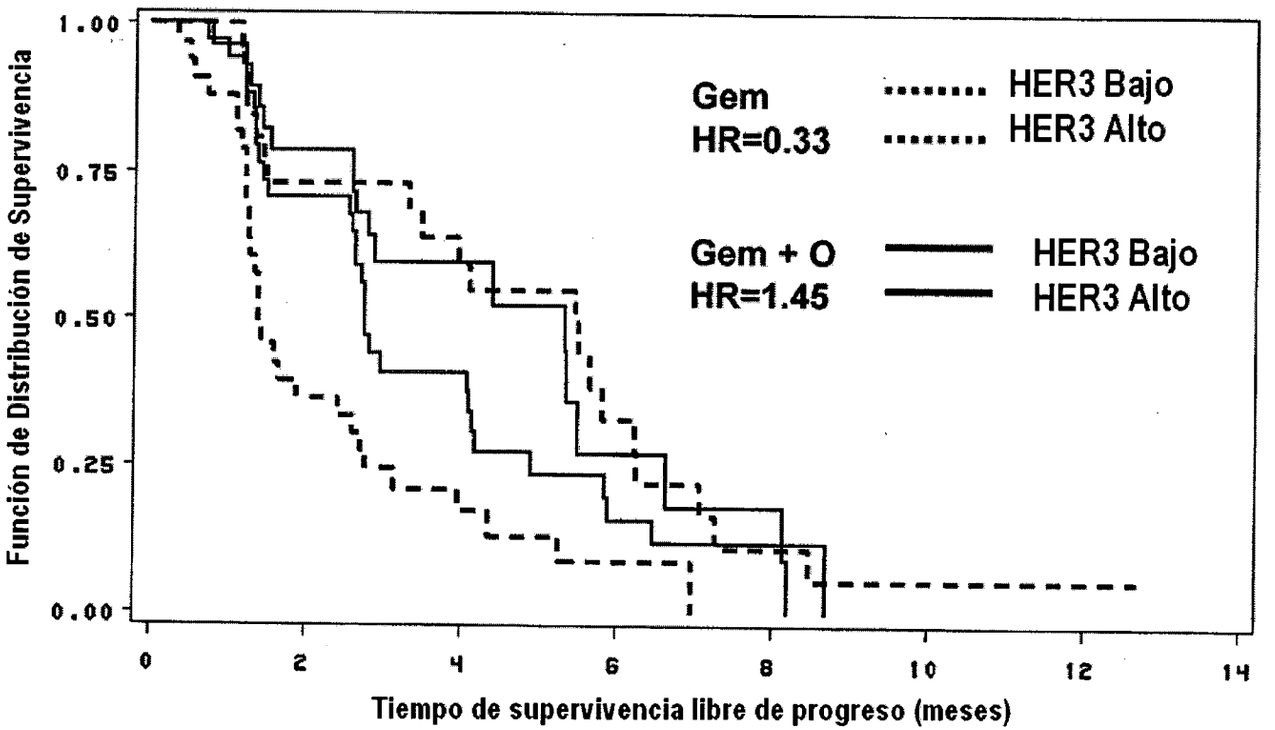


FIG. 24A

# *Cáncer de Ovario Resistente a Platino de Pertuzumab: PFS por HER3 en qRT-PCR*

| Valor de corte | | Grupo HER3 alto | | | | Grupo HER3 bajo | | | | # de Eventos | Gem + Omnitarg (n=61) # de Eventos | | | # de Eventos | Gem Solo (n=58 # de Eventos | | | Interacción |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % de placa | Valor abs. | N | # Eventos | HR (95%CI) | rango log valor P | N | # Eventos | HR (95%CI) | rango log valor P | en Dx(+) | en Dx(-) | HR (95%CI) | rango log valor P | en Dx(+) | en Dx(-) | HR (95%CI) | rango log valor P | valor P |
| 5 | 0.34 | 114 | 91 | 0.81 (0.53, 1.22) | 0.3076 | 5 | 3 | 0.00 (0.00, .) | 0.0389 | 44 | 1 | 1.55 (0.21, 11.46) | 0.6559 | 47 | 2 | 0.32 (0.07, 1.38) | 0.1073 | 0.1195 |
| 10 | 0.48 | 108 | 87 | 0.84 (0.55, 1.26) | 0.4076 | 11 | 7 | 0.15 (0.02, 1.29) | 0.0497 | 44 | 1 | 2.54 (0.35, 18.64) | 0.3357 | 43 | 6 | 0.73 (0.30, 1.74) | 0.4723 | 0.2021 |
| 15 | 0.91 | 102 | 83 | 0.92 (0.60, 1.42) | 0.7155 | 17 | 11 | 0.14 (0.03, 0.66) | 0.0048 | 43 | 2 | 2.60 (0.67, 11.68) | 0.1377 | 40 | 9 | 0.54 (0.26, 1.14) | 0.1001 | 0.0296 |
| 20 | 0.99 | 96 | 78 | 1.06 (0.67, 1.65) | 0.8063 | 23 | 16 | 0.09 (0.02, 0.42) | 0.0002 | 41 | 4 | 3.28 (1.16, 9.25) | 0.0174 | 37 | 12 | 0.49 (0.25, 0.98) | 0.0385 | 0.0017 |
| 25 | 1.19 | 91 | 73 | 1.13 (0.71, 1.81) | 0.5875 | 28 | 21 | 0.13 (0.04, 0.45) | 0.0002 | 40 | 5 | 2.62 (1.02, 6.69) | 0.0369 | 33 | 16 | 0.40 (0.21, 0.76) | 0.0035 | 0.0007 |
| 30 | 1.4 | 84 | 66 | 1.28 (0.77, 2.10) | 0.3318 | 35 | 28 | 0.18 (0.06, 0.52) | 0.0004 | 39 | 6 | 2.17 (0.91, 5.16) | 0.0737 | 27 | 22 | 0.35 (0.19, 0.65) | 0.0006 | 0.0004 |
| 35 | 1.57 | 78 | 62 | 1.49 (0.89, 2.51) | 0.1260 | 41 | 32 | 0.16 (0.06, 0.43) | <.0001 | 38 | 7 | 2.33 (1.03, 5.25) | 0.0355 | 24 | 25 | 0.27 (0.14, 0.52) | <.0001 | <.0001 |
| 40 | 1.71 | 72 | 58 | 1.55 (0.90, 2.68) | 0.1141 | 47 | 36 | 0.19 (0.08, 0.47) | <.0001 | 37 | 8 | 2.25 (1.04, 4.86) | 0.0339 | 21 | 28 | 0.30 (0.16, 0.59) | 0.0002 | <.0001 |
| 45 | 1.88 | 66 | 54 | 1.84 (0.94, 2.88) | 0.0817 | 53 | 40 | 0.23 (0.11, 0.50) | <.0001 | 34 | 11 | 1.96 (0.99, 3.89) | 0.0508 | 20 | 29 | 0.27 (0.14, 0.54) | <.0001 | <.0001 |
| [illegible] | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | 2.41 | 54 | 42 | 1.87 (0.97, 3.57) | 0.0565 | 65 | 52 | 0.36 (0.20, 0.65) | 0.0005 | 28 | 17 | 1.33 (0.72, 2.44) | 0.3610 | 14 | 35 | 0.25 (0.12, 0.49) | <.0001 | 0.0002 |
| [illegible] | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 65 | 3.14 | 42 | 31 | 1.72 (0.78, 3.75) | 0.1693 | 77 | 63 | 0.57 (0.34, 0.95) | 0.0299 | 22 | 23 | 1.06 (0.59, 1.93) | 0.8337 | 9 | 40 | 0.36 (0.17, 0.76) | 0.0050 | 0.0158 |
| 70 | 3.59 | 36 | 25 | 1.67 (0.72, 3.90) | 0.2270 | 83 | 69 | 0.62 (0.38, 1.00) | 0.0488 | 17 | 28 | 0.82 (0.44, 1.53) | 0.5400 | 8 | 41 | 0.33 (0.15, 0.71) | 0.0029 | 0.0384 |
| 75 | 3.8 | 30 | 19 | 2.00 (0.71, 5.62) | 0.1796 | 89 | 75 | 0.67 (0.42, 1.06) | 0.0898 | 14 | 31 | 0.77 (0.40, 1.49) | 0.4392 | 5 | 44 | 0.29 (0.11, 0.73) | 0.0054 | 0.0528 |
| 80 | 4.29 | 24 | 16 | 2.85 (0.89, 9.20) | 0.0667 | 95 | 78 | 0.59 (0.37, 0.92) | 0.0198 | 11 | 34 | 1.40 (0.70, 2.80) | 0.3428 | 5 | 44 | 0.33 (0.13, 0.84) | 0.0146 | 0.0119 |
| 85 | 5.25 | 18 | 13 | 2.53 (0.67, 9.50) | 0.1473 | 101 | 81 | 0.62 (0.40, 0.96) | 0.0324 | 9 | 36 | 1.25 (0.60, 2.62) | 0.5534 | 4 | 45 | 0.32 (0.11, 0.92) | 0.0264 | 0.0262 |
| 90 | 6.64 | 12 | 9 | 4.73 (0.93, 24.13) | 0.0416 | 107 | 85 | 0.59 (0.38, 0.91) | 0.0151 | 6 | 39 | 2.58 (1.06, 6.23) | 0.0290 | 3 | 46 | 0.26 (0.08, 0.86) | 0.0185 | 0.0020 |
| 95 | 6.4 | 6 | 5 | 3.35 (0.34, 33.36) | 0.2769 | 113 | 89 | 0.74 (0.49, 1.13) | 0.1582 | 3 | 42 | 2.57 (0.77, 8.56) | 0.1052 | 2 | 47 | 0.95 (0.23, 3.94) | 0.9478 | 0.3840 |

**Nota: Los valores p de log-rango y HR, no fueron ajustados por comparación múltiple**

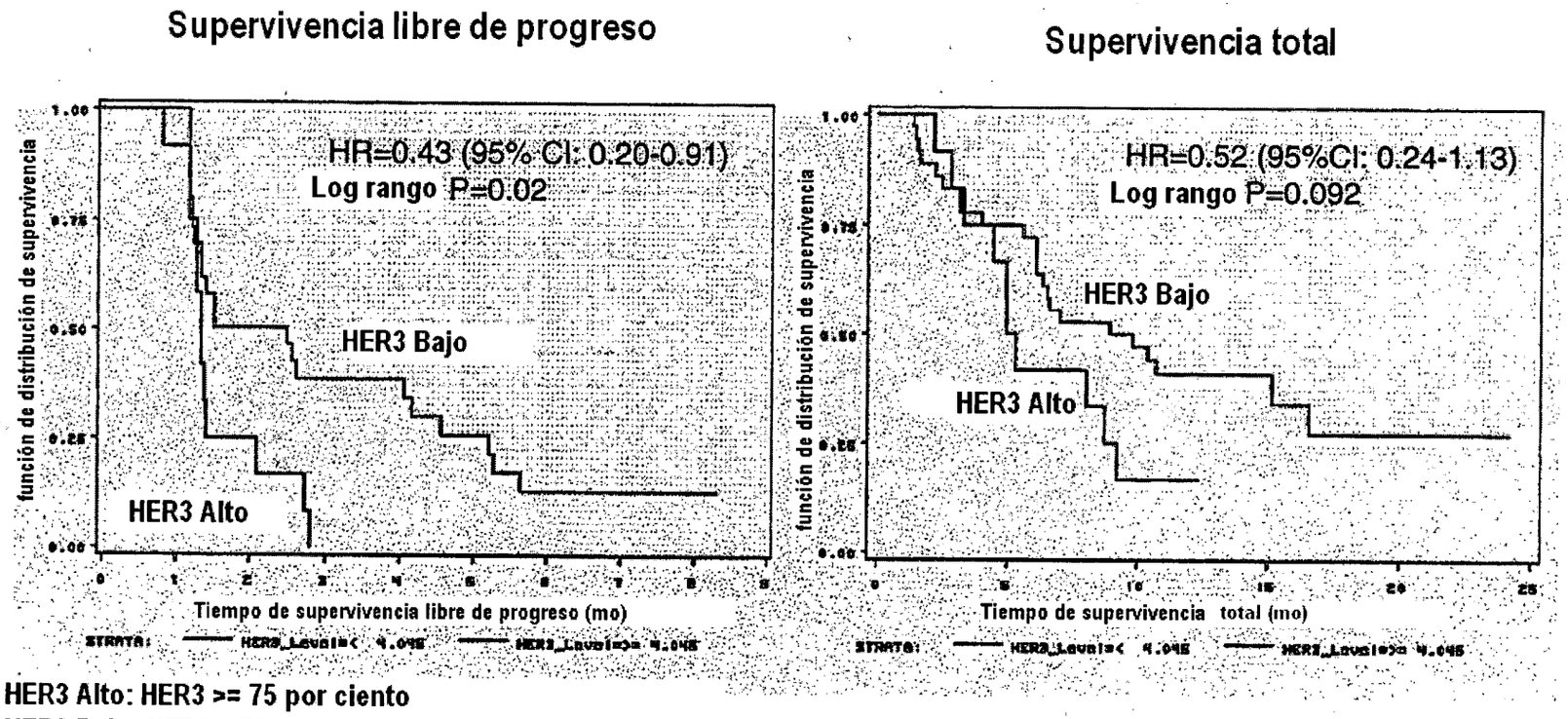
FIG. 24B

# Cáncer de Ovario Resistente a Platino de Pertuzumab:PFS por HER3 en qRT-PCR

| Valor de corte | | Grupo Dx(Alto) | | | | Grupo Dx(Bajo) | | | # de eventos en Dx(alto) | Gem + Pertuzumab (n=63) # de eventos en Dx(bajo) | HR (95%CI) | Log-rango valor P | # de eventos en Dx(alto) | # de eventos en Dx(alto) | Gem solo (n=59) HR (95%CI) | Log-rango valor P | interacción valor P |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % en placa | Valor abs. | N | # Eventos | HR (95%CI) | Log-rango valor P | # Eventos | HR (95%CI) | Log-rango valor P | | | | | | | | | |
| 20 | 0.99 | 98 | 80 | 1.09 (0.70, 1.70) | 0.6973 | 24 | 17 | 0.08 (0.02, 0.37) | <.0001 | 42 | 5 | 3.20 (1.25, 8.23) | 0.0109 | 38 | 12 | 0.47 (0.24, 0.93) | 0.0272 | 0.0007 |
| 25 | 1.19 | 92 | 74 | 1.16 (0.73, 1.84) | 0.5222 | 30 | 23 | 0.13 (0.04, 0.41) | <.0001 | 40 | 7 | 2.34 (1.03, 5.30) | 0.0360 | 34 | 16 | 0.38 (0.20, 0.72) | 0.0020 | 0.0003 |
| 30 | 1.39 | 86 | 68 | 1.20 (0.74, 1.94) | 0.4674 | 36 | 29 | 0.22 (0.09, 0.56) | 0.0005 | 39 | 8 | 2.03 (0.93, 4.39) | 0.0683 | 29 | 21 | 0.44 (0.24, 0.79) | 0.0046 | 0.0014 |
| 35 | 1.56 | 80 | 64 | 1.37 (0.83, 2.26) | 0.2230 | 42 | 33 | 0.20 (0.09, 0.48) | <.0001 | 38 | 9 | 2.19 (1.05, 4.56) | 0.0330 | 26 | 24 | 0.37 (0.21, 0.67) | 0.0007 | 0.0001 |
| 40 | 1.70 | 74 | 59 | 1.50 (0.88, 2.55) | 0.1381 | 48 | 38 | 0.22 (0.10, 0.50) | <.0001 | 37 | 10 | 2.14 (1.06, 4.34) | 0.0312 | 22 | 28 | 0.35 (0.19, 0.63) | 0.0004 | <.0001 |
| 45 | 1.87 | 68 | 55 | 1.50 (0.87, 2.61) | 0.1468 | 54 | 42 | 0.29 (0.14, 0.58) | 0.0002 | 34 | 13 | 1.84 (0.97, 3.51) | 0.0617 | 21 | 29 | 0.35 (0.19, 0.65) | 0.0005 | 0.0002 |
| 50 | 2.24 | 61 | 49 | 1.48 (0.83, 2.63) | 0.1809 | 61 | 48 | 0.34 (0.18, 0.63) | 0.0004 | 29 | 18 | 1.45 (0.80, 2.62) | 0.2230 | 20 | 30 | 0.33 (0.18, 0.62) | 0.0003 | 0.0005 |
| 55 | 2.38 | 56 | 44 | 1.74 (0.93, 3.27) | 0.0816 | 66 | 53 | 0.36 (0.20, 0.65) | 0.0005 | 29 | 18 | 1.45 (0.80, 2.62) | 0.2230 | 15 | 35 | 0.31 (0.16, 0.60) | 0.0002 | 0.0004 |
| 60 | 2.75 | 49 | 38 | 1.81 (0.90, 3.67) | 0.0945 | 73 | 59 | 0.48 (0.28, 0.84) | 0.0080 | 27 | 20 | 1.33 (0.74, 2.38) | 0.3459 | 11 | 39 | 0.37 (0.19, 0.73) | 0.0030 | 0.0030 |
| 65 | 3.08 | 43 | 32 | 1.78 (0.82, 3.86) | 0.1382 | 79 | 65 | 0.56 (0.34, 0.94) | 0.0255 | 23 | 24 | 1.14 (0.64, 2.04) | 0.6516 | 9 | 41 | 0.36 (0.18, 0.76) | 0.0050 | 0.0112 |
| 70 | 3.56 | 37 | 26 | 1.73 (0.75, 3.99) | 0.1943 | 85 | 71 | 0.62 (0.38, 1.00) | 0.0459 | 18 | 29 | 0.89 (0.49, 1.62) | 0.6916 | 8 | 42 | 0.33 (0.15, 0.71) | 0.0028 | 0.0295 |
| 75 | 3.77 | 31 | 21 | 1.90 (0.73, 4.93) | 0.1804 | 91 | 76 | 0.65 (0.41, 1.03) | 0.0650 | 15 | 32 | 0.89 (0.47, 1.66) | 0.6992 | 6 | 44 | 0.33 (0.14, 0.79) | 0.0086 | 0.0427 |
| 80 | 4.05 | 25 | 18 | 2.33 (0.82, 6.64) | 0.1053 | 97 | 79 | 0.64 (0.41, 1.00) | 0.0493 | 13 | 34 | 1.04 (0.54, 2.03) | 0.9069 | 5 | 45 | 0.32 (0.13, 0.83) | 0.0136 | 0.0291 |

**Nota: Los HR y valores p log-rango, no fueron ajustados por comparación múltiple**

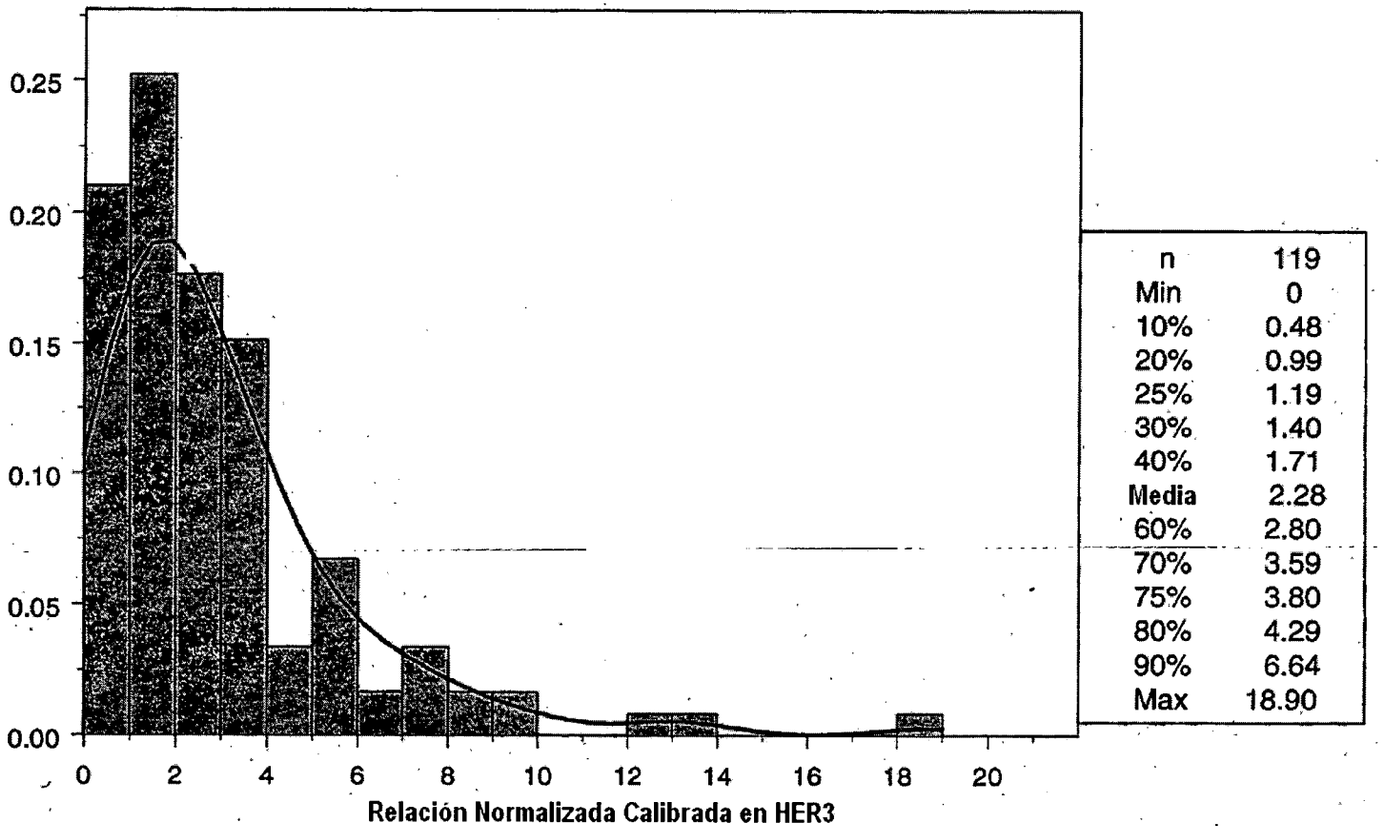
FIG. 25




HER3 Alto: HER3 >= 75 por ciento
HER3 Bajo: HER3 < 75 por ciento
75 por ciento = 4.045

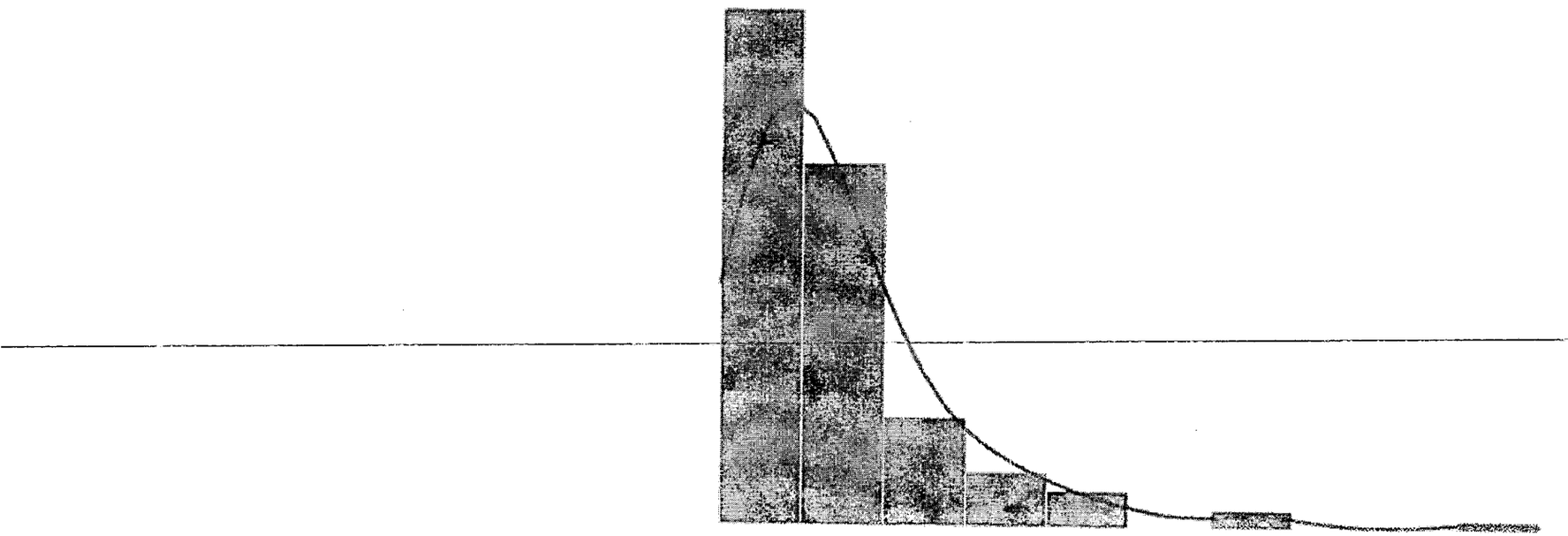
FIG. 26A

*Relación Normalizada Calibrada de HER3*
*El intervalo de expresión es ~20-80 veces*




Los CSP están entre ~23 y 30 por la mayoría de las muestras

# Relación Normalizada Calibrada de HER3
# El intervalo de expresión es ~20-80 veces



| | |
|---|---|
| n | 122 |
| Min | 0 |
| 10% | 0.50 |
| 20% | 0.99 |
| 25% | 1.19 |
| 30% | 1.39 |
| 40% | 1.70 |
| Media | 2.24 |
| 60% | 2.75 |
| 70% | 3.56 |
| 75% | 3.77 |
| 80% | 4.05 |
| 90% | 6.56 |
| Max | 18.90 |

Los CPS están entre ~23 y 30 para la mayoría de las muestras

FIG. 26B

FIG. 27

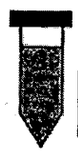
*Ensayos IVD en qRT-PCR de Pertuzumab* ***LIGHTCYCLER® 2.0***



Material de muestra FFPET (3 laminillas) → GNE

- •Inspección patológica
- •Macrodisección

← Kit de ARN de Pertuzumab LIGHTCYCLER® (LC) *(aislamiento total de ARN)*



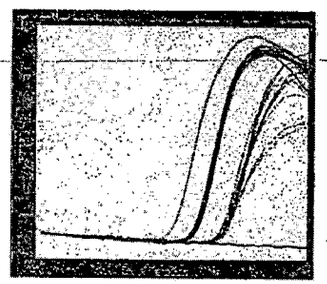
ARN Aislado

Kit de RT-PCR de Pertuzumab LC

← *(Transcripción inversa y PCR LIGHTCYCLER®*

*Cuantificación relativa*

TARGOS

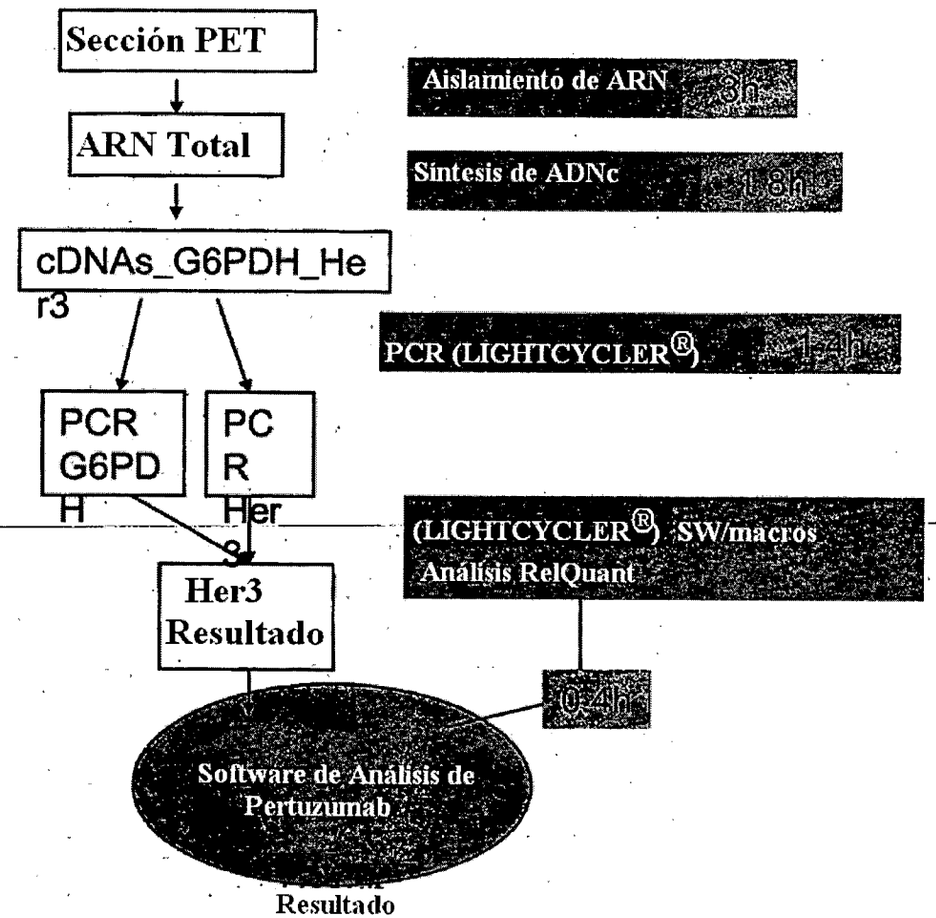


← Control de calidad de Datos → RMD

Análisis de Datos Clínicos → GNE

*Ensayo IVD de Pertuzumab*
*Flujo de trabajo y Análisis*
*1 marcador + referencia*

FIG. 28




HOJA SUBSTITUTA (REGLA 26)

HOJA SUBSTITUTA (REGLA 26)

FIG. 29A

PFS por HER2/HER3 en qRT-PCR

| Valor de corte | | Grupo Dx(Alto) | | | | Grupo Dx(Bajo) | | | | Gem + Omnitarg (n=60) | | | | Gem solo (n=58) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % de placa | Valor abs. | N | # Eventos | HR (95%CI) | Valor P log-rango | N | # Eventos | HR (95%CI) | valor P log rango | # Eventos en Dx(alto) | # de Eventos en Dx(bajo) | HR (95%CI) | Valor P log-rango | # Eventos en Dx(alto) | # de Eventos en Dx(bajo) | HR (95%CI) | Valor P log-rango | Interacción valor P |
| 20 | 0.74 | 96 | 72 | 0.63 (0.39, 1.02) | 0.0616 | 23 | 21 | 2.04 (0.58, 7.13) | 0.2475 | 26 | 18 | 0.57 (0.31, 1.06) | 0.0734 | 46 | 3 | 1.39 (0.43, 4.55) | 0.5881 | 0.1823 |
| 25 | 0.82 | 89 | 67 | 0.46 (0.27, 0.76) | 0.0021 | 29 | 26 | 2.65 (1.10, 7.37) | 0.0249 | 24 | 20 | 0.53 (0.29, 0.97) | 0.0370 | 43 | 6 | 4.07 (1.41, 11.74) | 0.0055 | 0.0005 |
| 30 | 0.90 | 83 | 62 | 0.41 (0.24, 0.69) | 0.0007 | 35 | 31 | 2.52 (1.13, 5.62) | 0.0197 | 22 | 22 | 0.46 (0.25, 0.84) | 0.0104 | 40 | 9 | 3.04 (1.33, 6.94) | 0.0056 | 0.0002 |
| 35 | 1.06 | 77 | 60 | 0.39 (0.22, 0.68) | 0.0005 | 41 | 33 | 2.51 (1.14, 5.54) | 0.0189 | 20 | 24 | 0.49 (0.26, 0.90) | 0.0192 | 40 | 9 | 3.41 (1.50, 7.73) | 0.0019 | 0.0001 |
| 40 | 1.13 | 71 | 55 | 0.39 (0.22, 0.69) | 0.0009 | 47 | 38 | 1.91 (0.95, 3.83) | 0.0640 | 18 | 26 | 0.52 (0.28, 0.96) | 0.0340 | 37 | 12 | 2.76 (1.36, 5.59) | 0.0034 | 0.0004 |
| 45 | 1.26 | 65 | 50 | 0.31 (0.16, 0.61) | 0.0003 | 53 | 43 | 1.93 (0.99, 3.77) | 0.0492 | 14 | 30 | 0.54 (0.28, 1.03) | 0.0584 | 36 | 13 | 3.21 (1.57, 6.56) | 0.0007 | 0.0001 |
| 50 | 1.53 | 59 | 47 | 0.31 (0.15, 0.61) | 0.0004 | 59 | 46 | 1.71 (0.91, 3.21) | 0.0937 | 13 | 31 | 0.57 (0.30, 1.10) | 0.0926 | 34 | 15 | 2.94 (1.50, 5.77) | 0.0010 | 0.0003 |
| 55 | 1.70 | 54 | 45 | 0.34 (0.17, 0.68) | 0.0015 | 64 | 48 | 1.44 (0.78, 2.65) | 0.2293 | 13 | 31 | 0.68 (0.34, 1.28) | 0.2161 | 32 | 17 | 2.55 (1.34, 4.83) | 0.0028 | 0.0022 |
| 60 | 1.86 | 48 | 40 | 0.27 (0.12, 0.57) | 0.0003 | 70 | 53 | 1.35 (0.77, 2.37) | 0.2885 | 12 | 32 | 0.60 (0.31, 1.18) | 0.1348 | 28 | 21 | 2.60 (1.41, 4.81) | 0.0015 | 0.0009 |
| 65 | 2.15 | 42 | 34 | 0.27 (0.12, 0.62) | 0.0010 | 76 | 59 | 1.10 (0.65, 1.86) | 0.7119 | 11 | 33 | 0.56 (0.28, 1.12) | 0.0974 | 23 | 26 | 1.81 (1.00, 3.27) | 0.0447 | 0.0084 |
| 70 | 2.49 | 36 | 29 | 0.21 (0.08, 0.54) | 0.0004 | 82 | 64 | 1.13 (0.69, 1.87) | 0.6280 | 8 | 36 | 0.52 (0.24, 1.12) | 0.0895 | 21 | 28 | 2.07 (1.14, 3.76) | 0.0145 | 0.0032 |
| 75 | 2.62 | 30 | 24 | 0.13 (0.04, 0.46) | 0.0003 | 88 | 69 | 1.08 (0.67, 1.75) | 0.7534 | 6 | 38 | 0.46 (0.19, 1.10) | 0.0766 | 18 | 31 | 2.11 (1.12, 3.96) | 0.0167 | 0.0035 |
| 80 | 2.92 | 24 | 20 | 0.10 (0.02, 0.43) | 0.0002 | 94 | 73 | 1.06 (0.67, 1.70) | 0.7886 | 4 | 40 | 0.42 (0.15, 1.19) | 0.0949 | 16 | 33 | 2.60 (1.36, 4.97) | 0.0026 | 0.0022 |

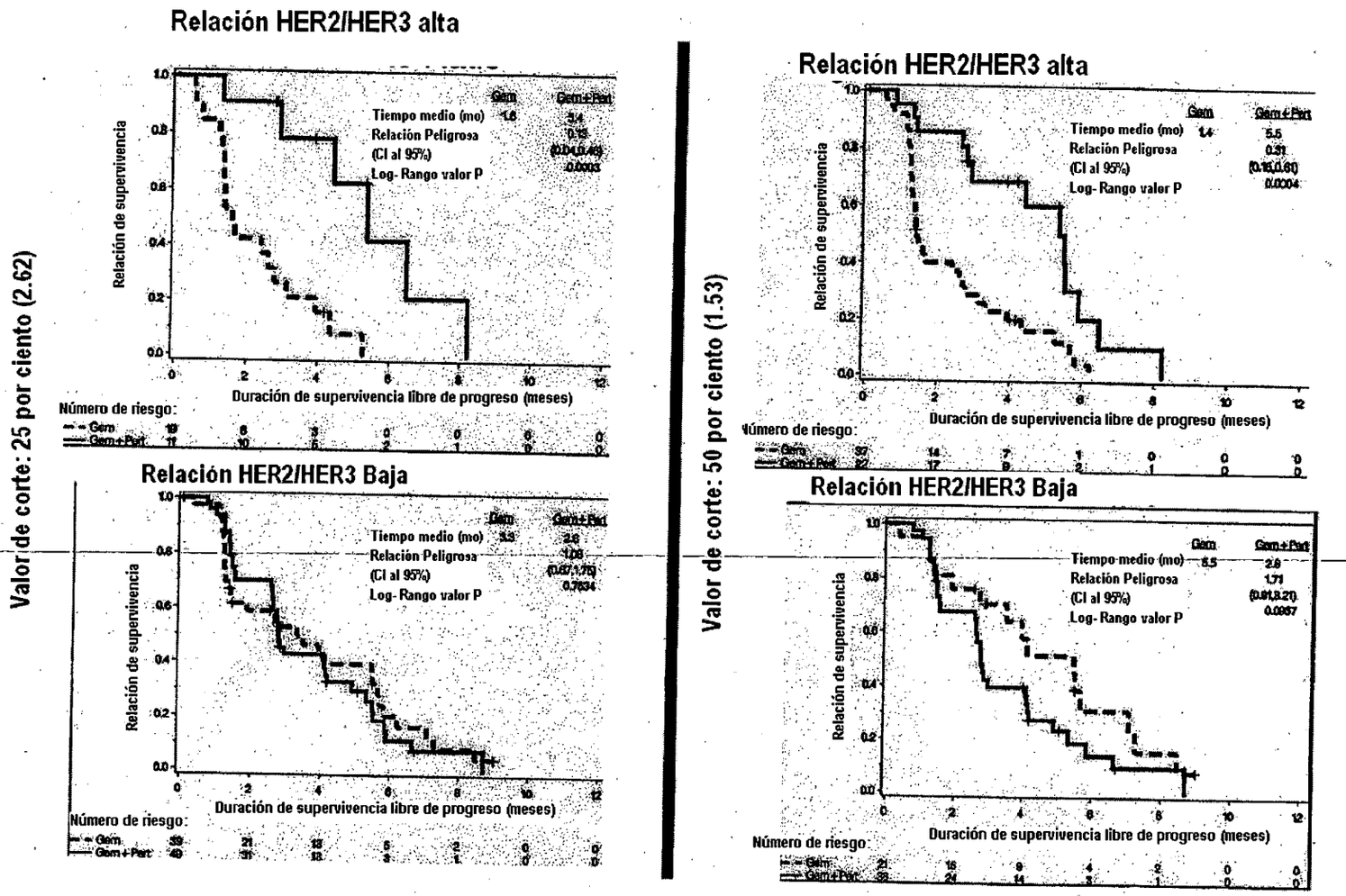
FIG. 29B

# Cáncer de Ovario Resistente a Platino: PFS por relación HER2/HER3 en qRT-PCR

| Valor de corte | | Grupo Dx(Alto) | | | | Grupo Dx(Bajo) | | | | Gem + Omnitarg (n=60) | | | | Gem solo (n=58) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % de placa | Valor abs. | N | # Eventos | HR (95%CI) | Valor P log-rango | N | # Eventos | HR (95%CI) | valor P log rango | # Eventos en Dx(alto) | # de Eventos en Dx(bajo) | HR (95%CI) | Valor P log-rango | # Eventos en Dx(alto) | # de Eventos en Dx(bajo) | HR (95%CI) | Valor P log-rango | Interacción valor P |
| 20 | 0.76 | 97 | 75 | 0.67 (0.42, 1.06) | 0.0884 | 24 | 21 | 1.70 (0.56, 5.19) | 0.3418 | 29 | 17 | 0.74 (0.40, 1.37) | 0.3323 | 46 | 4 | 1.73 (0.62, 4.87) | 0.2958 | 0.1685 |
| 25 | 0.83 | 91 | 71 | 0.50 (0.31, 0.82) | 0.0050 | 30 | 25 | 2.53 (0.99, 6.49) | 0.0452 | 27 | 19 | 0.68 (0.37, 1.24) | 0.2026 | 44 | 6 | 4.34 (1.51, 12.43) | 0.0033 | 0.0022 |
| 30 | 0.91 | 85 | 66 | 0.48 (0.29, 0.80) | 0.0042 | 36 | 30 | 1.98 (0.89, 4.40) | 0.0876 | 25 | 21 | 0.65 (0.36, 1.17) | 0.1529 | 41 | 9 | 2.92 (1.28, 6.66) | 0.0075 | 0.0030 |
| 35 | 1.06 | 79 | 63 | 0.45 (0.26, 0.77) | 0.0026 | 42 | 33 | 1.99 (0.94, 4.24) | 0.0691 | 23 | 23 | 0.63 (0.35, 1.13) | 0.1204 | 40 | 10 | 2.96 (1.37, 6.42) | 0.0039 | 0.0015 |
| 40 | 1.13 | 73 | 58 | 0.40 (0.23, 0.71) | 0.0011 | 48 | 38 | 1.76 (0.89, 3.47) | 0.0979 | 21 | 25 | 0.65 (0.36, 1.17) | 0.1512 | 37 | 13 | 2.87 (1.44, 5.71) | 0.0017 | 0.0011 |
| 45 | 1.26 | 67 | 53 | 0.35 (0.19, 0.65) | 0.0006 | 54 | 43 | 1.78 (0.93, 3.41) | 0.0780 | 17 | 29 | 0.66 (0.36, 1.21) | 0.1782 | 36 | 14 | 3.49 (1.70, 7.14) | 0.0003 | 0.0004 |
| 50 | 1.54 | 61 | 49 | 0.32 (0.17, 0.63) | 0.0005 | 60 | 47 | 1.63 (0.88, 3.02) | 0.1154 | 15 | 31 | 0.64 (0.34, 1.19) | 0.1566 | 34 | 16 | 3.15 (1.60, 6.19) | 0.0005 | 0.0005 |
| 55 | 1.73 | 55 | 46 | 0.36 (0.18, 0.70) | 0.0018 | 66 | 50 | 1.37 (0.77, 2.45) | 0.2828 | 15 | 31 | 0.72 (0.39, 1.35) | 0.3116 | 31 | 19 | 2.64 (1.41, 4.94) | 0.0016 | 0.0033 |
| 60 | 2.04 | 49 | 41 | 0.29 (0.14, 0.60) | 0.0005 | 72 | 55 | 1.35 (0.78, 2.34) | 0.2830 | 13 | 33 | 0.62 (0.33, 1.20) | 0.1585 | 28 | 22 | 2.69 (1.47, 4.93) | 0.0009 | 0.0010 |
| 65 | 2.17 | 43 | 35 | 0.28 (0.12, 0.61) | 0.0007 | 78 | 61 | 1.13 (0.68, 1.88) | 0.6512 | 13 | 33 | 0.62 (0.33, 1.20) | 0.1585 | 22 | 28 | 2.16 (1.18, 3.96) | 0.0104 | 0.0053 |
| 70 | 2.50 | 37 | 30 | 0.19 (0.07, 0.48) | 0.0001 | 84 | 66 | 1.16 (0.71, 1.90) | 0.5512 | 10 | 36 | 0.58 (0.28, 1.18) | 0.1290 | 20 | 30 | 2.64 (1.40, 4.96) | 0.0018 | 0.0010 |
| 75 | 2.65 | 31 | 25 | 0.10 (0.03, 0.37) | <.0001 | 90 | 71 | 1.12 (0.70, 1.80) | 0.6370 | 7 | 39 | 0.42 (0.18, 0.94) | 0.0314 | 18 | 32 | 2.23 (1.19, 4.21) | 0.0100 | 0.0010 |
| 80 | 2.99 | 25 | 21 | 0.11 (0.03, 0.40) | <.0001 | 96 | 75 | 1.06 (0.67, 1.67) | 0.8088 | 6 | 40 | 0.45 (0.19, 1.08) | 0.0694 | 15 | 35 | 2.46 (1.28, 4.74) | 0.0055 | 0.0015 |

**Nota: Los valores p log rango y HR, no fueron ajustados por comparación múltiple.**

FIG. 30A




HOJA SUBSTITUTA (REGLA 26)

FIG. 30B

# TOC3258g: PFS por Relación HER2/HER3

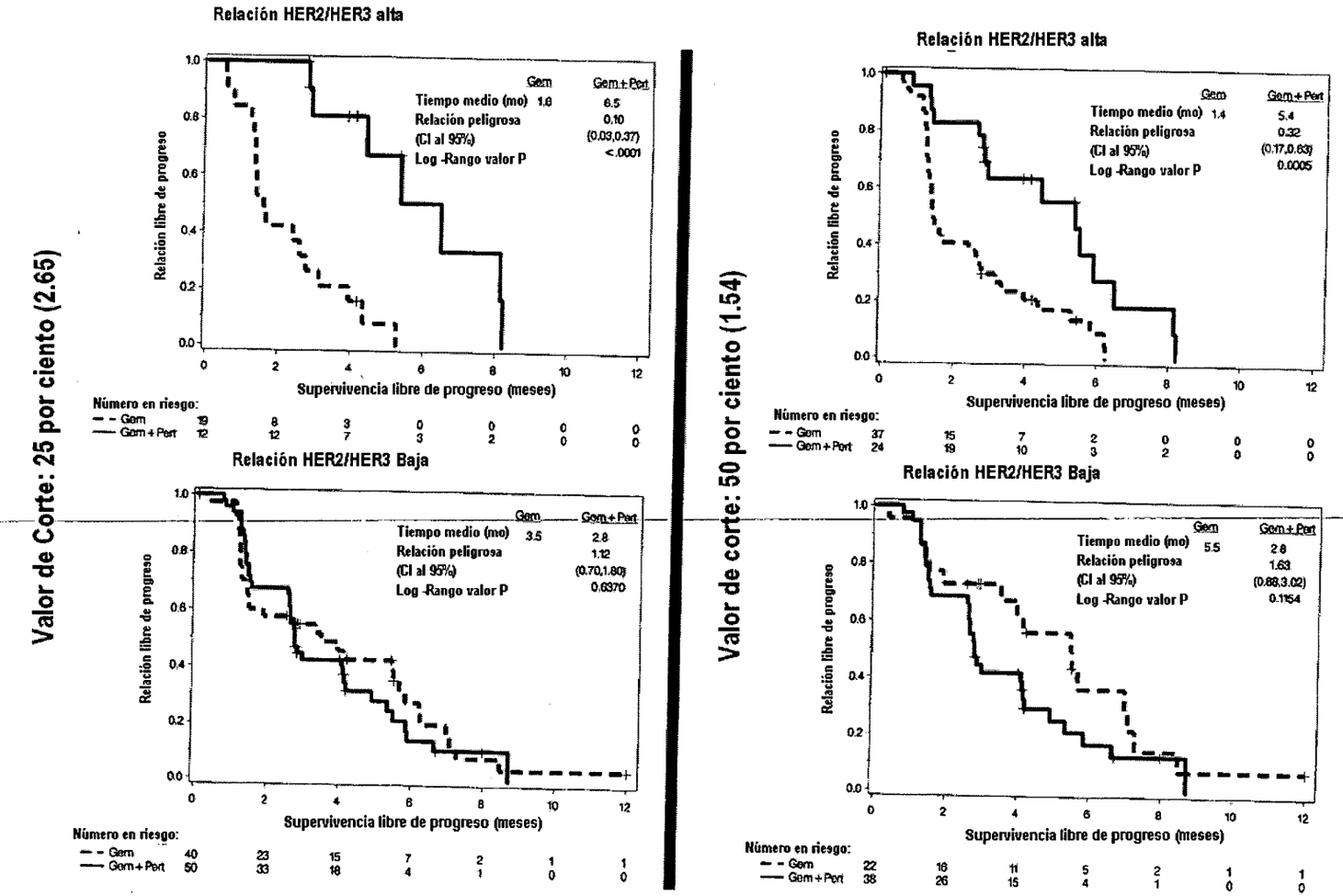


FIG. 31A

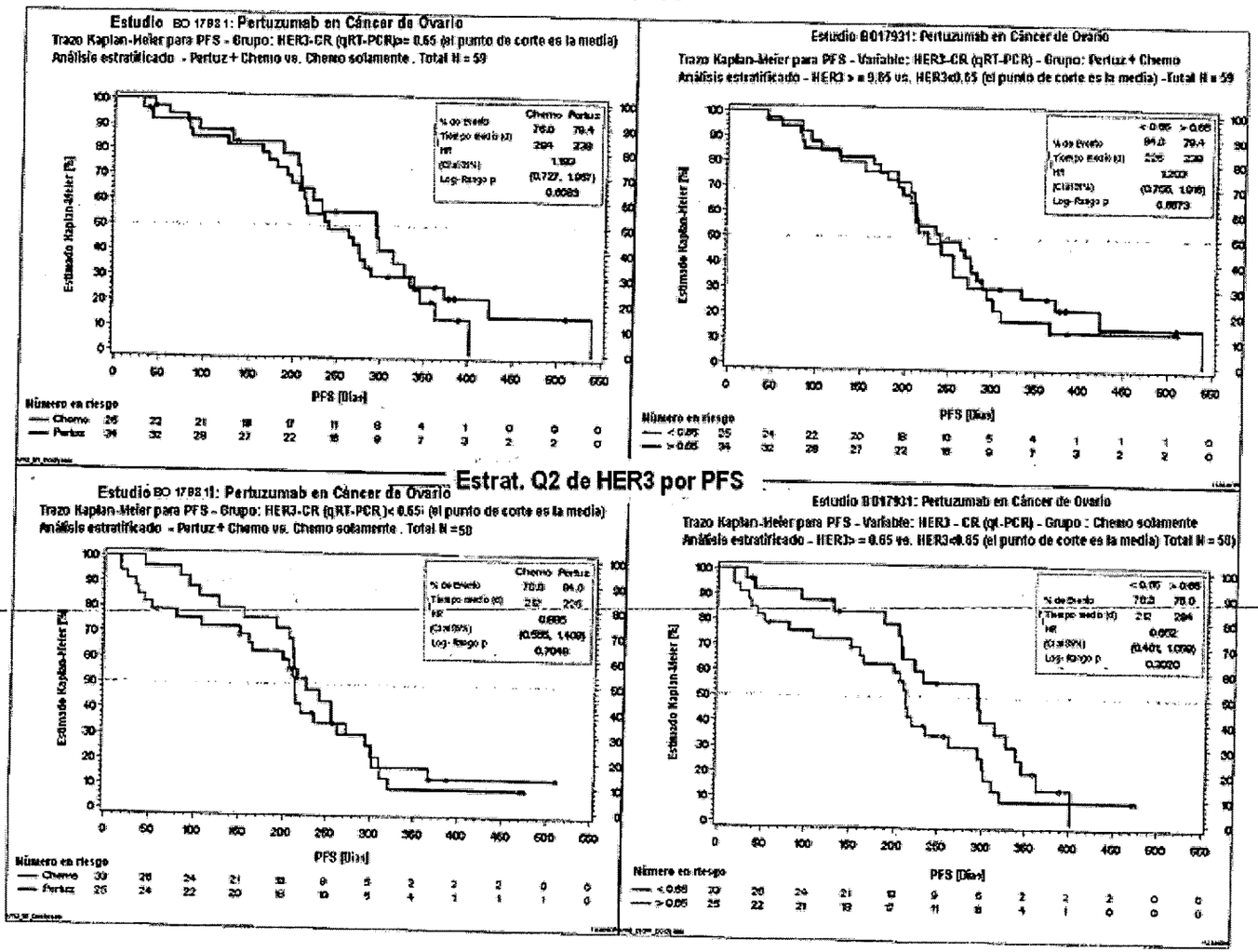
| | Total | | Gem Solo | | | Gem + Omnitarg | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Relación HER2/HER3 en qRT-PCR | N | # de Eventos | N | # de Eventos | Media (mo) | N | # de Eventos | Media (mo) | HR (95%CI) | Valor P logrango |
| 0 – < 25 por ciento | 29 | 26 | 7 | 6 | 5.5 | 22 | 20 | 2.6 | 2.85 (1.10, 7.37) | 0.0249 |
| 25 – < 50 por ciento | 30 | 20 | 14 | 9 | 3.7 | 16 | 11 | 4.2 | 1.02 (0.41, 2.54) | 0.9649 |
| 50 – < 75 por ciento | 29 | 23 | 18 | 16 | 1.3 | 11 | 7 | 5.5 | 0.61 (0.25, 1.52) | 0.2978 |
| 75 – 100 por ciento | 30 | 24 | 19 | 18 | 1.6 | 11 | 6 | 5.4 | 0.13 (0.04, 0.46) | 0.0003 |

FIG. 31B

# Análissi de Supervivencia libre de Progreso (PFS) por Cuartos de HER2/HER3

| HER2/HER3 en qRT-PCR | N | # de Eventos | HR (95%CI) | Valor P Log rango |
|---|---|---|---|---|
| 0 – < 25 por ciento | 30 | 25 | 2.53 (0.99, 6.49) | 0.0452 |
| 25 – < 50 por ciento | 30 | 22 | 1.28 (0.52, 3.15) | 0.5952 |
| 50 – < 75 por ciento | 30 | 24 | 0.76 (0.32, 1.83) | 0.5618 |
| 75 – 100 por ciento | 31 | 25 | 0.10 (0.03, 0.37) | <.0001 |

FIG. 32


Estudio BO 17931: Pertuzumab en Cáncer de Ovario
Trazo Kaplan-Meier para PFS - Grupo: HER3-CR (qRT-PCR)>= 0.65 (el punto de corte es la media)
Análisis estratificado - Pertuz+ Chemo vs. Chemo solamente . Total N = 59
Estimado Kaplan-Meier [%]
PFS [Días]
Número en riesgo
Chemo 26 22 21 18 17 11 8 4 1 0 0 0
Pertuz 34 32 28 27 22 16 9 7 3 2 2 0
Estudio BO17931: Pertuzumab en Cáncer de Ovario
Trazo Kaplan-Meier para PFS - Variable: HER3-CR (qRT-PCR) - Grupo: Pertuz+ Chemo
Análisis estratificado - HER3 > = 0.65 vs. HER3<0.65 (el punto de corte es la media) -Total N = 59
Estimado Kaplan-Meier [%]
PFS [Días]
Número en riesgo
< 0.65 25 24 22 20 16 10 5 4 1 1 1 0
> 0.65 34 32 28 27 22 16 9 7 3 2 2 0
Estrat. Q2 de HER3 por PFS
Estudio BO 17931: Pertuzumab en Cáncer de Ovario
Trazo Kaplan-Meier para PFS - Grupo: HER3-CR (qRT-PCR)< 0.65 (el punto de corte es la media)
Análisis estratificado - Pertuz+ Chemo vs. Chemo solamente . Total N =50
Estimado Kaplan-Meier [%]
PFS [Días]
Número en riesgo
Chemo 30 26 24 21 18 9 5 2 2 2 0 0
Pertuz 26 24 22 20 16 10 5 4 1 1 1 0
Estudio BO17931: Pertuzumab en Cáncer de Ovario
Trazo Kaplan-Meier para PFS - Variable: HER3 - CR (qt-PCR) - Grupo : Chemo solamente
Análisis estratificado - HER3> = 0.65 vs. HER3<0.65 (el punto de corte es la media) Total N = 50
Estimado Kaplan-Meier [%]
PFS [Días]
Número en riesgo
< 0.65 30 26 24 21 18 9 5 2 2 2 0 0
> 0.65 26 22 20 19 17 11 8 4 1 0 0 0

394

FIG. 33

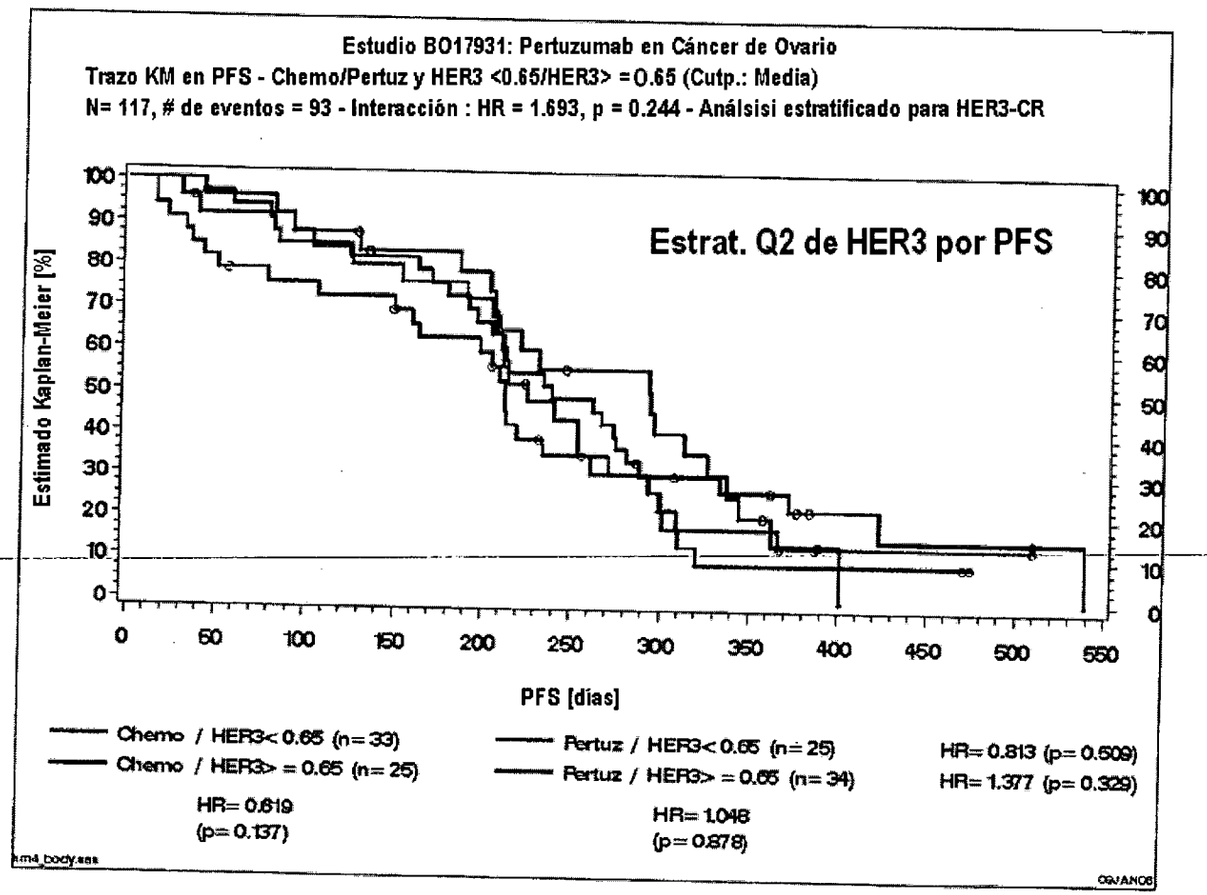

Estudio BO17931: Pertuzumab en Cáncer de Ovario
Trazo KM en PFS - Chemo/Pertuz y HER3 <0.65/HER3> =0.65 (Cutp.: Media)
N= 117, # de eventos = 93 - Interacción : HR = 1.693, p = 0.244 - Análsisi estratificado para HER3-CR
Estrat. Q2 de HER3 por PFS
Estimado Kaplan-Meier [%]
PFS [días]
Chemo / HER3< 0.65 (n= 33)
Chemo / HER3> = 0.65 (n= 25)
HR= 0.619
(p= 0.137)
Pertuz / HER3< 0.65 (n= 25)
Pertuz / HER3> = 0.65 (n= 34)
HR= 1.048
(p= 0.878)
HR= 0.813 (p= 0.509)
HR= 1.377 (p= 0.329)

FIG. 34

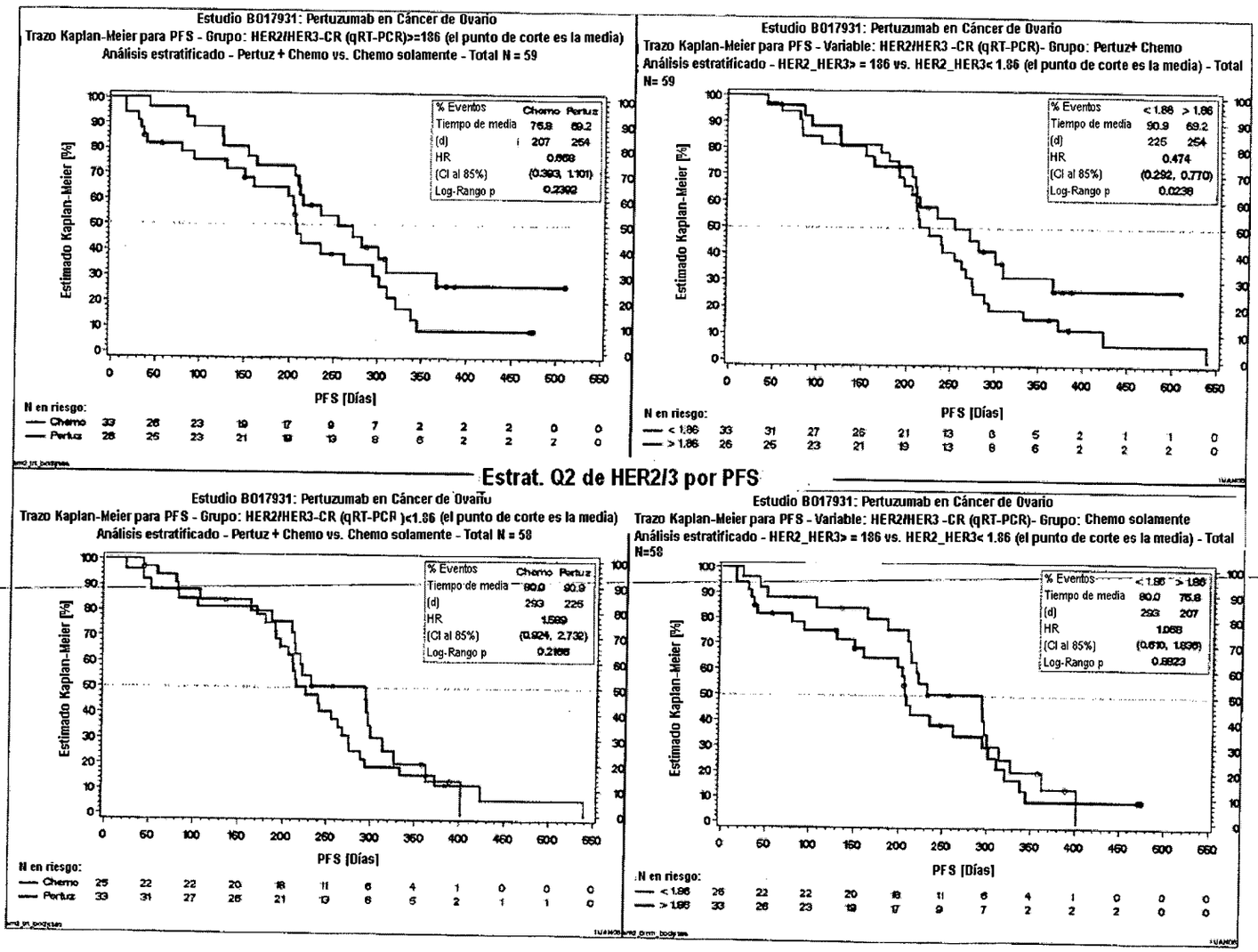
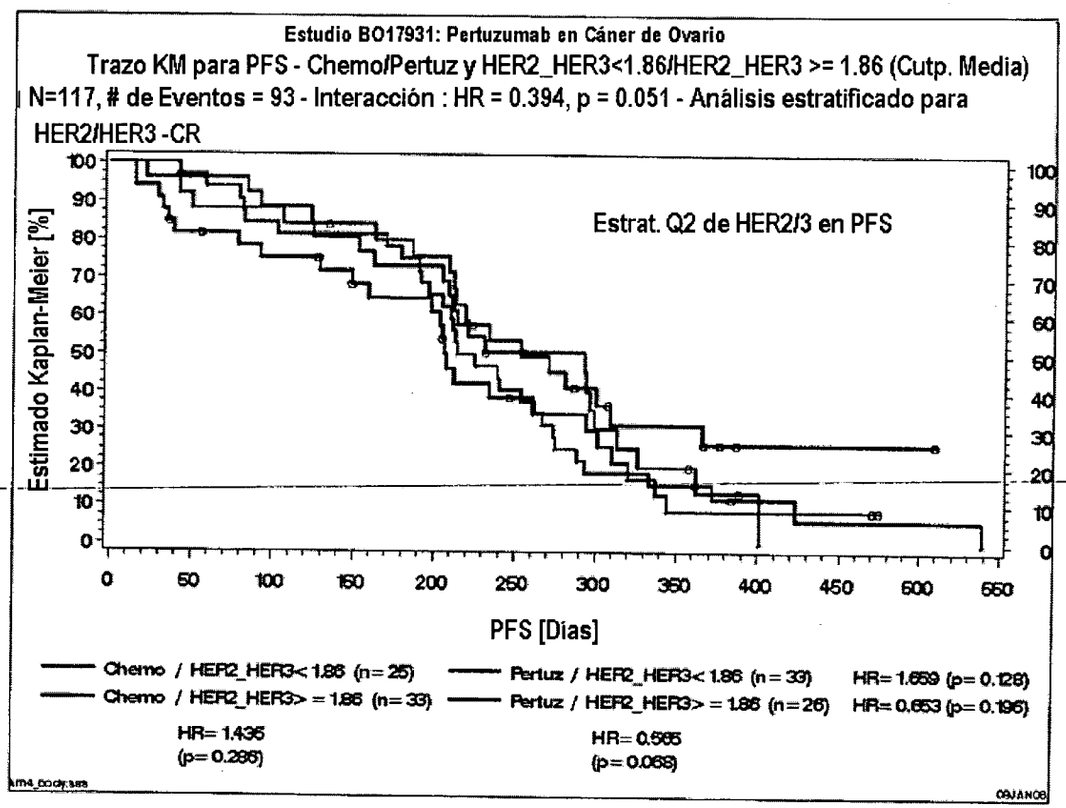

Estudio B017931: Pertuzumab en Cáncer de Ovario
Trazo Kaplan-Meier para PFS - Grupo: HER2/HER3-CR (qRT-PCR)>=186 (el punto de corte es la media)
Análisis estratificado - Pertuz + Chemo vs. Chemo solamente - Total N = 59
% Eventos Chemo Pertuz
Tiempo de media 76.8 89.2
(d) 207 254
HR 0.668
(CI al 85%) (0.393, 1.101)
Log-Rango p 0.2392
Estimado Kaplan-Meier [%]
PFS [Días]
N en riesgo:
Chemo 33 26 23 19 17 9 7 2 2 2 0 0
Pertuz 28 25 23 21 18 19 8 6 2 2 2 0
Estudio B017931: Pertuzumab en Cáncer de Ovario
Trazo Kaplan-Meier para PFS - Variable: HER2/HER3 -CR (qRT-PCR)- Grupo: Pertuz+ Chemo
Análisis estratificado - HER2_HER3> = 186 vs. HER2_HER3< 1.86 (el punto de corte es la media) - Total N= 59
% Eventos < 1.86 > 1.86
Tiempo de media 90.9 69.2
(d) 225 254
HR 0.474
(CI al 85%) (0.292, 0.770)
Log-Rango p 0.0238
Estimado Kaplan-Meier [%]
PFS [Días]
N en riesgo:
< 1.86 33 31 27 26 21 13 8 5 2 1 1 0
> 1.86 26 25 23 21 19 13 8 6 2 2 2 0
Estrat. Q2 de HER2/3 por PFS
Estudio B017931: Pertuzumab en Cáncer de Ovario
Trazo Kaplan-Meier para PFS - Grupo: HER2/HER3-CR (qRT-PCR )<1.86 (el punto de corte es la media)
Análisis estratificado - Pertuz + Chemo vs. Chemo solamente - Total N = 58
% Eventos Chemo Pertuz
Tiempo de media 80.0 90.9
(d) 293 225
HR 1.589
(CI al 85%) (0.924, 2.732)
Log-Rango p 0.2186
Estimado Kaplan-Meier [%]
PFS [Días]
N en riesgo:
Chemo 25 22 22 20 18 11 6 4 1 0 0 0
Pertuz 33 31 27 25 21 13 8 5 2 1 1 0
Estudio B017931: Pertuzumab en Cáncer de Ovario
Trazo Kaplan-Meier para PFS - Variable: HER2/HER3 -CR (qRT-PCR)- Grupo: Chemo solamente
Análisis estratificado - HER2_HER3> = 186 vs. HER2_HER3< 1.86 (el punto de corte es la media) - Total N=58
% Eventos < 1.86 > 1.86
Tiempo de media 80.0 75.8
(d) 293 207
HR 1.058
(CI al 85%) (0.610, 1.836)
Log-Rango p 0.8823
Estimado Kaplan-Meier [%]
PFS [Días]
N en riesgo:
< 1.86 26 22 22 20 18 11 6 4 1 0 0 0
> 1.86 33 26 23 19 17 9 7 2 2 2 0 0

FIG. 35


Estudio BO17931: Pertuzumab en Cáner de Ovario
Trazo KM para PFS - Chemo/Pertuz y HER2_HER3<1.86/HER2_HER3 >= 1.86 (Cutp. Media)
N=117, # de Eventos = 93 - Interacción : HR = 0.394, p = 0.051 - Análisis estratificado para HER2/HER3 -CR
Estrat. Q2 de HER2/3 en PFS
Estimado Kaplan-Meier [%]
PFS [Dias]
Chemo / HER2_HER3< 1.86 (n= 25)
Chemo / HER2_HER3> = 1.86 (n= 33)
Pertuz / HER2_HER3< 1.86 (n= 39)
Pertuz / HER2_HER3> = 1.86 (n= 26)
HR= 1.659 (p= 0.128)
HR= 0.653 (p= 0.196)
HR= 1.435
(p= 0.286)
HR= 0.565
(p= 0.068)

# LISTADO DE SECUENCIA

<110> Genentech, Inc.

<120> PREDICCIÓN DE RESPUESTA A UN INHIBIDOR HER

<130> 39766-0300

<140> Aún no asignado
<141> Aún no asignado

<150> 60/892,640
<151> 2007-03-02

<150> 60/912,053
<151> 2007-04-16

<150> 61/029,748
<151> 2008-02-19

<160> 52

<170> FastSEQ parar Windows Versión 4.0

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

<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 Thr
 1               5                  10                  15
```

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

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

<220>
<223> la Secuencia es sintetizada

<400> 3

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

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

<220>
<223> la Secuencia es sintetizada

<400> 4

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30
```

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

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

<220>
<223> la Secuencia es sintetizada

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

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

<220>
<223> la Secuencia es sintetizada

```
<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
```

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

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

<220>
<223> Secuencia de Anticuerpo Humanizado

<221> VARIANTE
<222> 10
<223> Xaa = preferiblemente Asp o Ser

<221> VARIANTE
<222> 10
<223> Xaa = cualquier Amino ácido

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

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

<220>
<223> Secuencia de Anticuerpo Humanizado

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

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

<220>
<223> Secuencia de Anticuerpo Humanizado

<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> Secuencia de Anticuerpo Humanizado

<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> Secuencia de Anticuerpo Humanizado

<221> VARIANTE
<222> 5
<223> Xaa es preferiblemente Arg o Leu

<221> VARIANTE
<222> 6
<223> Xaa es preferiblemente Tyr o Glu

<221> VARIANTE
<222> 7
<223> Xaa es preferiblemente Thr o Ser

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

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

<220>
<223> Secuencia de Anticuerpo Humanizado

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

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

<220>
<223> la Secuencia es sintetizada

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

<210> 14
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> la Secuencia es sintetizada

<400> 14
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30
Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

```
Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445
```

<210> 15
<211> 214
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> la Secuencia es sintetizada

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

<210> 16
<211> 449
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> la Secuencia es sintetizada

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
            20                  25                  30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

```
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240
Pro 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 Glu
            260                 265                 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
Gly
```

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

<220>
<223> la Secuencia es sintetizada

<400> 17
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 1               5                  10                  15
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val
            20                  25                  30
Ser 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 Arg
    50                  55                  60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
65                  70                  75                  80
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile
                85                  90                  95
Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105                 110
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
        115                 120                 125
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
    130                 135                 140
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145                 150                 155                 160
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
                165                 170                 175
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
            180                 185                 190
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
        195                 200                 205
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215

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

<220>
<223> la Secuencia es sintetizada

<400> 18
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30
Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

```
Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445
Lys
```

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

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

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

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

<210> 23

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 23
tgcggatgtc agccactgtg 20

<210> 24
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 24
gggtgcatcg ggtgacctg 19

<210> 25
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 25
agccactgtg aggcggga 18

<210> 26
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 26
ggtgttttcg ggcagaaggc catcc 25

<210> 27
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 27
aacagccacc agatggtggg gtagatctt 29

<210> 28

<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 28
ccgtcaatgt agtgggcaca c 21

<210> 29
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 29
gggtgagcca agggagtttg 20

<210> 30
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 30
gcacactgga tacagttgtc tggtc 25

<210> 31
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 31
tgtgcaggtg atgttcatgg cctgagg 27

<210> 32
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 32
cactctgggt ggcactgtat gcactc 26

<210> 33

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 33
ggacctgcct cacttggttg 20

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 34
caggtggtgc agggaaacct 20

<210> 35
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 35
ctgcctcact tggttgtgag c 21

<210> 36
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 36
caatgccagc ctgtccttcc tgcag 25

<210> 37
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 37
tatccaggag gtgcagggct acgtgc 26

<210> 38

<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 38
gtgtccatgt gacaaagctt atcg 24

<210> 39
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 39
gatgggaagt ttgccatctt cg 22

<210> 40
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 40
tctcaatata aacacccccct gacag 25

<210> 41
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 41
aacaccaact ccagccacgc tctg 24

<210> 42
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 42
agctccgctt gactcagctc accg 24

<210> 43

<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 43
cttgtcgaag tttc 14

<210> 44
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 44
ccatagctgc ctttatgtct gc 22

<210> 45
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 45
ctttcgttcc tcagcttctc cttc 24

<210> 46
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 46
tgatcctcac agctgttgct gtta 24

<210> 47
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 47
tacagtccag cttagaagac aatacgtcag gaa 33

<210> 48

<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 48
gtcaactctc tcacac 16

<210> 49
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 49
tctaggtgcc ccaagc 16

<210> 50
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 50
tagccttcat cacagacaca g 21

<210> 51
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 51
gcattactgc atcaaaggga gatgccg 27

<210> 52
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

<400> 52
tcgtggtggc cgagcagacg 20

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

# REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [ x ] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [ x ]1
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ x ]1
- Descripción de la invención [ x ]9
- Dibujos de ser estos pertinentes [X]3
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ x ]1

COMPLETA [ x ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

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

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-079621- -00000-0000
Fecha: 2009-07-30 16:56:27 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 416

arrera 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