

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 287**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07764767 .5**  
96 Fecha de presentación: **21.06.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2041576**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54 Título: **EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LA CITOCINA EN CÁNCER HUMANO.**

30 Prioridad:  
**21.06.2006 EP 06012754**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.12.2011**

73 Titular/es:  
**APOGENIX GMBH  
IM NEUENHEIMER FELD 584  
69120 HEIDELBERG, DE**

72 Inventor/es:  
**STASSI, Giorgio;  
GIEFFERS, Christian;  
HILL, Oliver;  
THIEMANN, Meinolf y  
TODARO, Matilde**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

**ES 2 371 287 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Expresión diferencial de la citocina en cáncer humano

La invención se refiere a un método para diagnosticar un tipo de cáncer, mediante el cual se determina la expresión de citocinas antiapoptóticas en las células tumorales. El diagnóstico diferencial de la presente invención se usa para clasificar trastornos tumorales y para recomendar el tratamiento requerido y monitorizar el progreso y respuesta al tratamiento.

El balance entre la supervivencia celular y la muerte celular está controlado por factores proapoptóticos y antiapoptóticos, cuya desregulación contribuye al desarrollo de varias afecciones patológicas, incluyendo cáncer. Habitualmente se encuentra una expresión elevada de factores antiapoptóticos en cánceres humanos, y contribuyen tanto a la expansión celular neoplásica como a la resistencia a la acción terapéutica de fármacos citotóxicos. Ya se ha dado a conocer que la producción autocrina de citocinas antiapoptóticas por células tumorales modula fuertemente la susceptibilidad a la apoptosis inducida por el receptor y por quimioterapia. En particular, se ha dado a conocer previamente que IL-4 e IL-10 actúan como factor de crecimiento autocrino en células cancerosas, induciendo aumento de proteínas antiapoptóticas, que protegen a las células tumorales de la muerte inducida por fármacos quimioterapéuticos (Stassi et al., *Cancer Res.* 63, 6784-90 (2003), Todaro et al., *Cancer Res.* 66, 1491-9 (2006)).

Los tumores están compuestos de una combinación heterogénea de células, con diferentes características terapéuticas y diferentes potenciales proliferativos. En particular, las células cancerosas pueden dar lugar a una progenie fenotípicamente diversa de células, ya sea dotadas con un potencial proliferativo definido o que tienen un potencial proliferativo limitado o no proliferativo.

A este respecto, pruebas recientes sugieren que la capacidad de crecimiento tumorigénico está confinada de hecho a un pequeño subconjunto de las denominadas células madre cancerosas (CSC). La Solicitud Internacional PCT/IT2005/000523 describe un método para aislar y cultivar células madre a partir de tumores sólidos. Esta subpoblación de células cancerosas se puede autorrenovar y puede dar lugar a una población de células heterogéneas que muestran diversos grados de diferenciación. Además, se ha encontrado recientemente que estas células madre cancerosas son significativamente resistentes a apoptosis inducida por fármacos, escapando así de las terapias antitumorales y siendo esto probablemente la razón subyacente para la ineficiencia quimioterapéutica.

Hassuneh et al. (*Blood*, vol. 89, p. 610-320, 1997) describen pruebas de la participación de IL-2 e IL-4 en la regulación de crecimiento autónomo y tumorigénesis de células transformadas de origen linfoide.

Alas et al. (*Clin. Canc. Res.* Vol. 7, p. 709-723, 2001) se refiere a la inhibición de IL-10 por Rituximab, dando como resultado la disminución de Bcl-2 y una sensibilización del linfoma no de Hodgkin de células B a la apoptosis.

Czarneski et al. (*Leukemia*, Vol. 18, p. 597-606, 2004) describe estudios en ratones NZB a los que se les ha inactivado el gen de IL-10 de la necesidad de IL-10 para la progresión de linfoma de células B.

La patente US nº 6.548.655 se refiere a los receptores de IL-4, IL-4R, y a la administración de IL-4R soluble, siendo las aplicaciones clínicas la terapia contra la alergia y la terapia para el trasplante, así como la supresión de hipersensibilidad de tipo retrasada o de contacto.

El documento WO 96/04388 se refiere a antagonistas de IL-4 y/o IL-13 humanas para el tratamiento de por ejemplo enfermedades alérgicas mediadas por IgE.

Kruse et al. (*Int. Immunol.*, vol. 11, p. 1965-1969, 1999) describe la caracterización de la forma unida a la membrana y de una forma soluble del receptor  $\alpha$  de IL-4 humano producido por corte y empalme alternativo.

Borish et al. (*Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 160, p. 1816-1823, 1999) se refiere a un ensayo clínico relacionado con el receptor de IL-4 en asma atópica moderada.

Ahora se ha demostrado que las CSC producen predominantemente IL-4 e IL-10, y son responsables de la alteración mencionada anteriormente de la sensibilidad a la muerte celular inducida por fármacos.

Ahora también se ha encontrado por los inventores de la presente invención que los tumores epiteliales se pueden diferenciar en cuanto al nivel y/o perfil de expresión de citocinas antiapoptóticas. La expresión de citocinas antiapoptóticas difiere entre tumores individuales del mismo órgano, e incluso en células o porciones de un único tumor. Estos resultados conducen a nuevas estrategias eficientes en el diagnóstico y/o terapia de tumores.

En particular, un objeto de la presente invención fue proporcionar un método que permite la identificación y diagnóstico de tipos de cáncer y células cancerosas que expresan citocinas antiapoptóticas.

La presente invención se define por el conjunto anejo de reivindicaciones.

En consecuencia, la presente invención proporciona un método para diagnosticar tipos de tumores epiteliales, usando como diana las citocinas antiapoptóticas IL-4 y/o IL-10. Particularmente, la invención se refiere a un método para diagnosticar un tipo de cáncer según la reivindicación 1.

5 Por tanto, la invención se refiere al diagnóstico diferencial de tipos de cáncer por medio de la determinación y/o cuantificación del perfil y/o nivel de expresión de citocinas antiapoptóticas en la muestra tumoral, en el que las citocinas antiapoptóticas son IL-4 y/o IL-10, particularmente IL-4. Si no se especifica adicionalmente, las citocinas antiapoptóticas aquí son IL-4 y/o IL-10.

10 El diagnóstico diferencial según la invención permite clasificar tipos tumorales e identificar aquellos que muestran expresión de citocinas antiapoptóticas y que son refractarios al tratamiento con agentes quimioterapéuticos. Por tanto, la expresión de citocinas antiapoptóticas es un marcador significativo para la clasificación tumoral, que permite una selección de estrategias terapéuticas buscadas como dianas.

Por ejemplo, el método de la invención puede ser útil para predecir si un paciente que sufre cierto tipo de cáncer sería resistente o susceptible a cierta terapia, y para proporcionar una estrategia de tratamiento optimizado.

15 Según la presente invención, se encontró que los tipos de cáncer se pueden clasificar como tumores que no expresan citocinas, o como tumores que expresan citocinas.

20 Cuando se determina la expresión de IL-4 y/o IL-10, más particularmente la expresión de IL-4, los tumores epiteliales se clasifican con relación a su expresión de sólo IL-4 o sólo IL-10, o tanto IL-4 como IL-10. Por lo tanto, el método según la presente invención permite la diferenciación entre tumor epitelial clasificado como tumores que expresan IL-4 o tumores que no expresan IL-4, tumor epitelial clasificado como tumores que expresan IL-10 o tumores que no expresan IL-10, y tumor epitelial clasificado como tumores que expresan IL-4 e IL-10 o tumores que no expresan IL-4 y no expresan IL-10.

25 El método de la presente invención se lleva a cabo preferiblemente sobre tumores epiteliales. Dichos tumores epiteliales se pueden escoger del grupo que consiste en cáncer de tiroides, de mama, de próstata, de vejiga, de colon, gástrico, de páncreas, de riñón, de hígado y de pulmón. Más preferiblemente, el tumor epitelial es un cáncer de colon, gástrico, de mama, de pulmón, de vejiga o de próstata.

30 El método diagnóstico de la presente invención se puede llevar a cabo sobre diversas muestras celulares procedentes de un tumor epitelial. La muestra de ensayo es preferiblemente una muestra celular procedente de tumor primario y/o del entorno tumoral aislado de un sujeto, por ejemplo un paciente humano. Por ejemplo, se puede ensayar el tejido celular tumoral obtenido mediante biopsia, resección u otras técnicas. La muestra tumoral comprende células tumorales. La expresión de citocina antiapoptótica en las células tumorales se determina preferiblemente sobre células tumorales primarias y/o células madre cancerosas.

35 Los métodos para la determinación de la expresión de citocinas antiapoptóticas en células tumorales son bien conocidos en la técnica. La determinación de la expresión, en particular de la sobreexpresión, de la citocina antiapoptótica en la célula tumoral se lleva a cabo mediante la detección de dicha citocina a nivel de proteínas y/o a nivel de ácidos nucleicos.

40 La determinación de proteínas citocínicas se puede llevar a cabo en células tumorales o en el microentorno tumoral. Los métodos para determinar la presencia y cantidad de proteínas citocínicas en una muestra dada son bien conocidos por la persona experta en la técnica, y pueden ser métodos inmunoquímicos tales como métodos de inmunohistoquímica, transferencia Western, inmunoprecipitación y ELISA. Se pueden usar otros métodos basados en espectrometría de masas, que comprende MALDI-MS, para determinar la presencia y cantidad de proteínas citocínicas.

45 Los ácidos nucleicos citocínicos se detectan y cuantifican aquí por cualquiera de los medios bien conocidos por los expertos en la técnica. Para detectar ácidos nucleicos, frecuentemente se usan técnicas de hibridación junto con métodos de amplificación opcionales. La expresión de ARNm citocínicos se puede detectar por ejemplo mediante análisis de transferencia Northern, o mediante transcripción inversa y amplificación subsiguiente mediante PCR.

El método según la invención puede comprender la etapa adicional de

50 (d) determinar la sensibilidad de las células de un tumor que expresa citocinas frente a al menos un agente quimioterapéutico o proapoptótico en presencia y/o en ausencia de un antagonista de dicha citocina expresada y/o su receptor.

A fin de investigar la sensibilidad de las células tumorales que expresan citocinas a agentes quimioterapéuticos y/o proapoptóticos, se puede medir la viabilidad de las células tumorales expuestas a dichos agentes quimioterapéuticos o proapoptóticos en ausencia y/o presencia de agentes neutralizantes de citocinas. Los métodos para determinar la

sensibilidad de las células tumorales a un agente dado son bien conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo como se describe en los Ejemplos).

Basándose en esta determinación, el método según la presente invención puede comprender además la etapa de

(e) seleccionar un tratamiento específico del tipo de cáncer.

5 Como ya se ha mencionado, la invención se basa en la observación de que los tumores epiteliales se pueden diferenciar por su expresión o grado de expresión de citocinas antiapoptóticas, y en particular citocinas IL-4 e IL-10. Puesto que la expresión de citocinas antiapoptóticas IL-4 e IL-10 en tumores o células tumorales es responsable de la capacidad refractaria al tratamiento, por ejemplo con agentes quimioterapéuticos y/o proapoptóticos, las citocinas antiapoptóticas se deberían de neutralizar a fin de incrementar la sensibilidad del tumor frente al tratamiento. De este modo, la invención también puede englobar un examen de la sensibilidad o resistencia a agentes quimioterapéuticos y/o proapoptóticos en combinación con antagonistas de una citocina expresada por el tumor.

En una realización preferida, el ensayo de sensibilidad llevado a cabo en la etapa (d) del método conduce a la determinación de un agente quimioterapéutico o proapoptótico frente al cual la célula de los tumores que expresan citocinas es particularmente sensible.

15 En consecuencia, según la etapa (e) de la presente invención, se puede seleccionar un tratamiento con éxito específico para el tipo tumoral, que comprende la administración de una combinación de un agente neutralizante de citocinas, a saber, un agente neutralizante de la citocina IL-4, y un agente quimioterapéutico o proapoptótico, que es TRAIL o CD95L.

20 Un agente neutralizante de citocinas puede ser cualquier compuesto que reduzca la cantidad y/o actividad de una citocina. Por ejemplo, el agente neutralizante de citocinas puede ser un agente que inhiba una ruta de transducción de señales accionada por la citocina expresada de forma autocrina por las células tumorales. Por tanto, se contempla cualquier agente que sea capaz de modular la expresión y/o función de una citocina directa y/o indirectamente, a saber, que afecte la expresión y/o la función de la proteína citocínica y/o receptor citocínico respectivo.

25 El agente neutralizante de citocinas es un agente neutralizante de IL-4, es decir, cualquier agente que sea capaz de inhibir la ruta de transducción de señales accionada por la expresión autocrina de IL-4.

El agente neutralizante de citocinas se selecciona de agentes que inhiben la actividad de proteína citocínica expresada. Los agentes que bloquean la actividad de citocina son, por ejemplo, antagonistas que bloquean los receptores de citocinas, por ejemplo péptidos, pequeñas moléculas, variantes muteínicas de las citocinas que muestran una actividad antagonista comparada con la señal original de la citocina. Los ejemplos para tales muteínas son en particular muteínas de IL-4, tales como Aerolast® de Aerovance, y Pittrakina® y BAY-36-1677 de Bayer. Se pueden usar otros anticuerpos frente al receptor de citocina, o anticuerpos frente a la proteína citocínica. El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo frente a IL-4 y/o IL-10, por ejemplo anticuerpos de Amgen e Immunex, o un anticuerpo frente al receptor de IL-4 y/o el receptor de IL-10, por ejemplo el anticuerpo Pascolizumab® de Glaxo.

35 El anticuerpo puede ser un anticuerpo completo, por ejemplo un anticuerpo IgG, o un fragmento del mismo de unión a antígenos. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado monoclonal que tiene dominios constantes humanos por ejemplo dominios IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 constantes humanos. Más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado que comprende adicionalmente regiones de marco humanas. También se prefieren fragmentos de anticuerpos, por ejemplo fragmentos de anticuerpos divalentes o monovalentes tales como fragmentos F(ab)<sub>2</sub>. Por otro lado, el anticuerpo puede ser un anticuerpo recombinante, por ejemplo un anticuerpo monocatenario o un fragmento del mismo, por ejemplo un fragmento scFv.

45 Los receptores citocínicos solubles, preferiblemente sin el dominio que se extiende por la membrana ni el dominio extracelular, también se pueden usar como agentes que bloquean la actividad citocínica. Estos receptores solubles son, por ejemplo, de Regeneron, en particular proteínas de fusión de IL-4R/IL-13R-Fc, y receptores solubles de Amgen e Immunex, en particular Nuvance® y Altrakinecept®. Los ejemplos específicos de receptores solubles comprenden el dominio extracelular (ECD) del receptor de IL-4 humano, por ejemplo procedente de un ECD acortado de aminoácido 24 a aminoácido 224, 225, 226, 227, 228, 229 ó 230 de IL-4R alfa humano, y opcionalmente otros dominios, por ejemplo el dominio extracelular de un receptor de IL-13 humano y/o un dominio de inmunoglobulina de Fc humano.

50 Como ejemplo preferido de agentes que degradan la proteína citocínica expresada, en el contexto de la presente invención se pueden mencionar proteasas diseñadoras. La producción de las proteínas citocínicas se puede inhibir, por otro lado, por ejemplo mediante agentes que actúan en los niveles nucleicos tales como ácidos nucleicos antisentido, moléculas ARNsi y/o ribozimas.

55 En la solicitud de patente internacional WO 2004/069274 se describen antagonistas de citocinas preferidos. Los anticuerpos dirigidos contra citocinas se usan preferiblemente como agentes neutralizantes de citocinas. Los

anticuerpos anti-IL-4 descritos en la solicitud de patente europea EP-A-0.730.609 son especialmente adecuados como agentes neutralizantes de citocinas del método de la presente invención. En una realización muy preferida, el anticuerpo derivado del anticuerpo monoclonal 6A1, producido por la estirpe celular de hibridoma ACC93100620, o un fragmento del mismo que se une a antígeno, se usa como agente neutralizante de citocinas.

5 El agente quimioterapéutico usado en las etapas (d) y/o (e) se selecciona de antimetabolitos, agentes que fragmentan el ADN, agentes que reticulan el ADN, agentes intercalantes, inhibidores de la síntesis de proteínas, inhibidores de topoisomerasas I y II, agentes dirigidos contra microtúbulos, inhibidores de cinasas, hormonas y antagonistas de hormonas. Particularmente, el agente quimioterapéutico se selecciona de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Los agentes proapoptóticos son TRAIL o el ligando CD95.

10 Basándose en los resultados obtenidos a partir de la administración combinada de antagonistas anticitocinas terapéuticas y agentes quimioterapéuticos y/o proapoptóticos a la célula tumoral, se puede desarrollar una estrategia terapéutica basándose en una combinación específica de fármacos que ha demostrado ser efectiva.

15 Un objeto adicional de la presente invención es por lo tanto el uso de una combinación de un agente neutralizante de citocinas y un agente quimioterapéutico o proapoptótico, y la fabricación de un medicamento para el tratamiento antitumoral, tal como un tratamiento antitumoral de primera línea o como tratamiento antitumoral de segunda o tercera línea, por ejemplo para el tratamiento de tumores refractarios, tales como tumores que se han hecho refractarios frente a uno o más agentes antitumorales.

De este modo, un aspecto adicional de la presente invención es el uso de una combinación de

(i) al menos un agente neutralizante de citocina IL-4, y

20 (ii) al menos un agente quimioterapéutico o proapoptótico que es TRAIL o CD95L

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tipo de cáncer clasificado como tumor epitelial que expresa citocinas.

25 Una de las causas principales de la resistencia a fármacos en células tumorales se basa en la observación de que una pequeña población superviviente de células tumorales, y en particular de células madre tumorales, después de una regresión aparentemente completa o extirpación quirúrgica del tumor primario, podría renovar el tumor y contribuir a la denominada enfermedad residual mínima (MRD).

A este respecto, la terapia de combinación es particularmente adecuada para incrementar la sensibilidad terapéutica de células madre tumorales. Un aspecto adicional de la presente invención es el uso de una combinación de

(iii) al menos un agente neutralizante de citocina IL-4, y

30 (iv) al menos un agente quimioterapéutico o proapoptótico, que es TRAIL o CD95L,

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumores epiteliales que se han hecho refractarios a agentes quimioterapéuticos.

35 Según una realización preferida de la presente invención, el uso de una terapia combinada de los agentes (i) y (ii) anteriores puede ser además en combinación con cirugía y/o terapia de irradiación. En particular, la combinación de medicamentos es para la terapia de combinación simultánea, separada o secuencial con cirugía y/o terapia de irradiación.

40 Según una realización preferida de la presente invención, la administración de agente (i) y agente (ii) se comienza simultáneamente. Como alternativa, la terapia de combinación se puede comenzar por etapas. Según esta realización preferida de la invención, el comienzo de la administración del agente neutralizante de citocinas (i) es  $\leq 1$  semana antes de la administración del agente quimioterapéutico o proapoptótico (ii). A su vez, la administración del agente quimioterapéutico o proapoptótico (ii) puede comenzar  $\geq 1$  semana antes de la administración del agente neutralizante de citocinas (i).

45 Todavía una realización adicional de la invención es un polipéptido del receptor de IL-4 humano soluble que deriva del receptor alfa de IL-4 humano (acceso NCBI NP\_000409), que termina terminalmente en C en el aminoácido 230, 229, 228, 227, 226, 225 ó 224, para uso en un método para el tratamiento de tumores epiteliales. Preferiblemente, el extremo C-terminal es el aminoácido 224. El polipéptido puede comprender al menos un dominio adicional, por ejemplo un péptido señal N-terminal, un dominio efector adicional, por ejemplo un dominio extracelular del receptor de IL-13, un dominio inmunoglobulínico de Fc, y/o un dominio de purificación. En el Ejemplo 4 se describe un ejemplo de un polipéptido de IL-4R acortado. El polipéptido de IL-4R acortado es adecuado para aplicaciones farmacéuticas, por ejemplo para el tratamiento de tumores, particularmente para el tratamiento de tumores asociados a IL-4 como se describe anteriormente. Para determinar la sensibilidad a apoptosis inducida por CD95 o TRAIL en células cancerosas, se usaron anti-CD95 (mAb CH-11, IgM; Upstate Biotechnology Inc.) o IgM de control

(Sigma) o TRAIL con cremallera de isoleucina (iz-TRAIL; 200 ng/ml). Además, tras la exposición a anti-IL-4 y anti-IL-10, las células cancerosas se trataron con oxaliplatino (100  $\mu$ M) o doxorubicina (5  $\mu$ M) o cisplatino (300 ng/ml) o taxol (5  $\mu$ M) (Sigma) o etopósido (1  $\mu$ M; Biomol, Plymouth Meeting, PA).

5 Ensayos de supervivencia y muerte. Para evaluar los sucesos apoptóticos, se llevaron a cabo la tinción de ADN y el análisis de citometría de flujo. El porcentaje de núcleos hipodiploides se evaluó como se describe en Stassi et al., Cancer Res. 2003, 63 (20):6784-90. Como alternativa, las células cancerosas purificadas humanas se colocaron en placas de 96 pocillos por triplicado a 15.000 células/pocillo, y se cultivaron. El número de células viables se detectó mediante el CellTiter Aqueous Assay Kit (Promega Corporation, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control positivo para la medida de la muerte celular, se usaron células HuT78 colocadas en placas a 2 x 10<sup>4</sup> células/ml y tratadas con anticuerpo CH11 activador de CD95 (200 ng/ml).

15 Análisis inmunohistoquímico. La inmunohistoquímica se llevó a cabo en secciones de muestras normales y tumorales de colon, gástricas, de próstata, de mama, de pulmón, de hígado, de páncreas, de riñón y de vejiga, embebidas en parafina, de 5  $\mu$ m de grosor. Las secciones desparafinadas se trataron durante 10 min. en un horno de microondas en tampón de citrato 0,1 M. Después, las secciones se incubaron durante 10 min. con disolución salina tamponada con Tris (TBS) que contiene 10% de suero humano AB para bloquear la tinción no específica. Tras eliminar el suero en exceso, las secciones se expusieron toda la noche a 4°C a anticuerpos específicos frente a IL-4 (IgG1 de ratón B-S4, Caltag Laboratories, Burlingame, CA), IL-10 (IgG<sub>2a</sub> de ratón B-N10, Caltag), IL-4R $\alpha$  (IgG de conejo C-20, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA), IL-10R (IgG de conejo C-20, Santa Cruz Biotechnology), TRAIL-R1 (IgG1 de ratón HS101, Alexis Biochemicals, Lausen, CH), TRAIL-R2 (IgG1 de ratón HS201, Alexis) o controles con isotipos emparejados, a diluciones apropiadas. Tras la exposición al anticuerpo primario, las células se trataron con inmunoglobulinas anti-conejo o antirratón biotiniladas, se lavaron en TBS y después se incubaron con estreptavidina peroxidasa (Dako LSAB 2 Kit, Dako Corporation Carpinteria CA, USA). La tinción se detectó usando 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) como sustrato colorimétrico. La contratinción de las células se llevó a cabo usando hematoxilina acuosa.

25 Análisis de RT-PCR. El ARN total se preparó a partir de células cultivadas usando el Rneasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Alemania), según las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa y la amplificación mediante PCR para cada preparación con 1  $\mu$ g de ARN total se llevó a cabo usando OneStep RT-PCR Kit (Qiagen). Para amplificar específicamente IL-4, se seleccionaron dos cebadores específicos para la secuencia codificante de IL-4 5'-CCA CGG ACA CAA GTG CGA TA nucleótidos 436-455 (exón 1) y 5'-CCT TGC AGA AGG TTT CCT TCT-3' complementaria a los nucleótidos 564-584 (exón 3) (número de acceso de GenBank NM 000589.2).

30 El gen de GAPD se amplificó a partir de las mismas preparaciones de ARN como control de mantenimiento (secuencia codificante 5' TGA CAT CAA GAA GGT GGT GA-3' nucleótidos 843-863 y 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' complementaria a los nucleótidos 1033-1053; número de acceso NM-002046). Se llevaron a cabo treinta y cinco ciclos, consistiendo cada uno en las siguientes condiciones: 94°C, 30 segundos; 58°C, 30 segundos; 72°C, 30 segundos.

40 Aislamiento proteico y análisis de transferencia western. Los peletes celulares se resuspendieron en tampón de lisis NP-40 enfriado en hielo (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de EGTA, 1% de NP-40) que contiene inhibidores de proteasas, como se describe en Stassi et al. Nature Immunology 2000, 1, 1-6. La inmunotransferencia de los anticuerpos (Abs) específicos para actina (Ab-1, IgM de ratón, Calbiochem, Darmstadt, Alemania), CD95L (G247-4, IgG1 de ratón, PharMingen, San Diego), CD95 (C-20, Santa Cruz Biotechnology), cFLIP (IgG1 de ratón NF6, Alexis Biochemicals, Suiza), PED/PEA-15 (IgG de conejo proporcionado amablemente por G. Condorelli), Bcl-2 (124, IgG1 de ratón, Upstate Biotechnology Inc.) y Bcl-X<sub>L</sub> (H-5, IgG1 de ratón, Santa Cruz Biotechnology) se detectó mediante Abs antirratón o anticonejo conjugados con HRP (Amersham Biosciences UK Limited, Inglaterra), y se visualizó con el sistema de detección mediante quimioluminiscencia (SuperSignal West Dura Extended duration Substrate, Pierce, Illinois, USA).

### Ejemplo 1

#### Producción autocrina de IL-4 en células cancerosas

50 A fin de investigar si el microentorno tumoral influye en el fenotipo y función de las células cancerosas, se evaluó la presencia de IL-4 e IL-10 que se encontró previamente que eran producidas de forma autocrina por tirocitos cancerosos. Los análisis de inmunohistoquímica demostraron que todos los histotipos de tumores sólidos investigados expresaron niveles elevados de IL-4, mientras que IL-10 fue menos detectable. En la Tabla 1 se muestran los resultados.

Tabla 1. Expresión citocínica en células cancerosas

Cáncer	IL-4	IL-10
PTC	++++	+++
FTC	++++	+++
UTC	++++	++++
De colon	++++	+
Gástrico	+++++	-
De pulmón	++++	+
De páncreas	+	+
Glioblastoma	+++	++
De próstata	++	+
De mama	++++	+
De vejiga	++++	+
De hígado	+	+
De riñón	++	++

De forma interesante, la reactividad frente a IL-4 se localizó para las células de cáncer de colon, de mama, de pulmón, gástrico, de hígado, de próstata, de páncreas, de riñón y de vejiga, sugiriendo que las células neoplásicas son la fuente de la producción elevada para IL-4 y menos para IL-10 (Tabla 1 y Fig. 1a). Para excluir la posibilidad de que la reactividad observada en células tumorales fue debida exclusivamente a la liberación de citocinas de tipo 2 por células T infiltrantes, se analizaron mediante RT-PCR células de cáncer de colon, de mama, gástrico y de pulmón recientemente purificadas. De acuerdo con los resultados de inmunohistoquímica, los niveles de expresión de ARNm de IL-4 de las células cancerosas purificadas se incrementaron mucho en comparación con las células normales relacionadas (Fig. 1b), demostrando que la producción autocrina de IL-4 no está restringida a las células de cáncer de tiroides, sino también tiene lugar en otras células malignas epiteliales procedentes de tumores sólidos que producen cantidades considerables de IL-4.

Células de cáncer epitelial expresan niveles elevados de proteínas antiapoptóticas. Las células de cáncer de colon, de mama, gástrico y de pulmón son resistentes a la muerte celular inducida por ligandos de la muerte y por quimioterapia. Para determinar el mecanismo responsable de esta capacidad refractaria, se investigó si la expresión aberrante de factores antiapoptóticos podría estar implicada en la ruta de señales apoptóticas "extrínsecas" e "intrínsecas" alterada generada por ligandos de la muerte o por quimioterapia. Se encontró mediante inmunohistoquímica y análisis de transferencia western que las células de carcinoma epitelial expresan CD95, TRAILR1 y TRAIL-R2 (Fig. 2a y b). Por lo tanto, los inventores de la presente invención evaluaron la presencia y midieron los niveles de expresión de cFLIP, PED/PEA-15, Bcl-xL y Bcl-2 en células normales y cancerosas de colon, de mama, gástricas y de pulmón. Mientras que los niveles de cFLIP y PED/PEA-15 fueron aproximadamente tres veces mayores en las células cancerosas recientemente purificadas, en comparación con las células normales de colon, de mama y de pulmón (Fig. 2a), los niveles de Bcl-xL fueron cuatro veces mayores. Los niveles de expresión de Bcl-2 fueron sólo dos veces mayores en todas las células cancerosas analizadas, en comparación con las células normales. De este modo, el aumento de genes antiapoptóticos en células de cáncer de colon, de mama, gástrico y de pulmón puede conferir resistencia a apoptosis inducida por CD95, TRAIL y quimioterapia.

IL-4 incrementa la supervivencia, crecimiento de células neoplásicas epiteliales.

Se evaluó la expresión del receptor de IL-4 tanto en células normales como neoplásicas. La inmunohistoquímica en secciones embebidas en parafina mostró que el receptor de IL-4 se expresó en todos los tejidos cancerosos analizados. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 2 y en la Fig. 3a.

Tabla 2. Expresión de IL-4R en células cancerosas

Cáncer	IL-4R
PTC	++++
FTC	++
UTC	+++
De colon	++
Gástrico	+++
De pulmón	+++++
De páncreas	+++
Glioblastoma	++
De próstata	++
De mama	+++
De vejiga	++++
De hígado	+++
De riñón	+++

5 A fin de investigar la posible implicación de IL-4 en la supervivencia de células tumorales, las células normales de colon, de mama, gástricas y de pulmón se expusieron a 20 ng/ml de IL-4, y se analizaron para determinar el crecimiento celular. IL-4 incrementó significativamente la tasa de crecimiento de células normales de colon, de mama y de pulmón (Fig. 3b).

10 Además, para determinar la implicación de IL-4 en la capacidad refractaria de las células cancerosas a CD95, TRAIL y agentes quimioterapéuticos, células normales de colon, de mama, gástricas y de pulmón se preincubaron con IL-4 y se analizaron después para determinar la expresión de aquellas proteínas antiapoptóticas implicadas en la resistencia a la muerte celular por ligandos de la muerte y por quimioterapia. IL-4 incrementó los niveles proteicos de cFLIP, PED/PEA-15, Bcl-xL y Bcl-2 en células normales de colon, de mama (Fig. 3c) y gástricas y de pulmón, sugiriendo que la producción autocrina de IL-4 puede proteger a las células cancerosas de la quimioterapia y de la estimulación por el receptor de la muerte, aumentando los factores antiapoptóticos.

15 La neutralización de IL-4 promueve la detención del crecimiento y la muerte celular inducida por CD95, TRAIL y quimioterapia en células cancerosas

20 Para demostrar directamente que la producción autocrina de IL-4 confiere protección frente a la muerte celular inducida por CD95, TRAIL y quimioterapia, se investigaron los efectos de la neutralización de IL-4 en células de cáncer de colon, de mama y de pulmón. La exposición de células de cáncer de colon, de mama, gástrico y de pulmón recientemente purificadas a anticuerpos neutralizantes frente a IL-4 durante 48 horas hizo sensible a las células cancerosas a la muerte celular inducida por quimioterapia y por el receptor de la muerte, confirmando el papel antiapoptótico de IL-4 en cáncer sólido. Los resultados se muestran en las Figuras 4a-c.

25 Además, la neutralización de IL-4 bloqueó el crecimiento de células tumorales de colon, de mama, gástricas y de pulmón hasta 15 días (Fig. 5) y moduló a la baja los niveles de expresión proteica de cFLIP, PED/PEA-15, Bcl-xL y Bcl-2. Estos datos indican que la producción autocrina de IL-4 puede desempeñar un papel importante en el control del crecimiento, y es necesaria específicamente para la supervivencia de células cancerosas.

30 Se identificaron muestras de tejido procedentes de pacientes con tumores recientemente operados para determinar la expresión de IL-4 e IL-10 mediante una variedad de métodos estándar tales como RT-PCR, transferencias western e inmunohistoquímica. Igualmente, la expresión de sus receptores respectivos se analizó mediante los mismos métodos. Las células cancerosas purificadas se ensayaron entonces para determinar su sensibilidad frente a agentes quimioterapéuticos tales como, por ejemplo, etopósido, doxorubicina, oxaliplatino e inductores de la apoptosis tales como TRAIL y el ligando CD95. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3. Sensibilización a la muerte celular inducida por receptores de la muerte y por quimioterapia

Muestras	Número	Expresión de IL-4	Expresión de IL-10	Tratamiento Anti-IL-4		
				Quimioterapia	TRAIL	CD95
Tiroides	75	75	75	2/20	N.D.	5/20
Colon	85	68	5	16/20	15/20	16/20
Gástrica	21	14	10 (baja)	9/10	10/10	7/10
Mama	25	16	11 (baja)	8/10.	6/10	9/10
Pulmón	9	5	1 (baja)	4/2	4/2	3/3
Próstata	12	10	1	4/5	N.D.	3/5
Páncreas	6	6 (baja)	6 (baja)	N.D.	N.D.	N.D.
Vejiga	12	12	10 (baja)	3/4	N.D.	2/4
Hígado	4	4 (baja)	4 (baja)	N.D.	N.D.	N.D.
Riñón	3	3 (baja)	3 (baja)	N.D.	N.D.	N.D.

5 Como se muestra a partir de los resultados en la Tabla 3, se encontró sorprendentemente que las células tumorales primarias normalmente resistentes que expresan IL-4 y/o IL-10 se volvieron sensibles frente a los agentes quimioterapéuticos ensayados y/o los agentes proapoptóticos cuando se incuban en presencia de un anticuerpo anti-IL-4, de manera que más del 90% de las células murió en un par de días. Se mostró una sensibilización significativa particular a la muerte celular inducida por receptores de la muerte y por quimioterapia para células de cáncer de colon, gástrico, de mama, de pulmón, de próstata y de vejiga.

## 10 Ejemplo 2

Los datos dados en este ejemplo revelan que las células madre de cáncer de colon purificadas producen niveles elevados de IL-4, y que la exposición de las células cancerosas a anticuerpos neutralizantes frente a IL-4 sensibilizó a las células a la apoptosis inducida por fármacos citotóxicos y por TRAIL. Además, los siguientes datos muestran que un tratamiento combinado de tumores de colon con agentes quimioterapéuticos y agentes anti-IL-4 reduce significativamente el crecimiento tumoral.

15 Para investigar la sensibilidad de CSC de colon a fármacos quimioterapéuticos, se midió la viabilidad de esferoides de CSC de colon expuestos a cisplatino (300 ng/ml) y oxaliplatino (100  $\mu$ M), dosis equivalentes a las alcanzadas durante el tratamiento del cáncer *in vivo*. Además, las CSC de colon se trataron con el ligando de la muerte inductor de apoptosis TRAIL (200 ng/ml). Las células primarias (adherentes) procedentes de muestras de cáncer de colon humano mostraron cierta sensibilidad *in vitro* a los tres fármacos ensayados, mientras que las CSC de colon fueron significativamente resistentes, confirmando que las CSC son relativamente inertes a la apoptosis inducida por fármacos (Fig. 6a). Esto sugiere que CSC pueden escapar a las terapias antitumorales, y podría ser la razón subyacente para la ineficiencia quimioterapéutica.

20 Para demostrar formalmente que la producción de IL-4 en CSC de colon es responsable del aumento de proteínas antiapoptóticas, y por lo tanto de la refracción a la terapia, se pretrataron CSC durante dos días, con anticuerpos neutralizantes anti-IL-4, y después se midió la muerte celular y la expresión antiapoptótica. Los niveles proteicos de cFLIP, Bcl-xL y PED, proteínas antiapoptóticas que demostraron previamente estar reguladas por IL-4 en cáncer, disminuyeron en dos veces en CSC expuestas a anti-IL-4 (Fig. 6b-c). Más importante, tras el bloqueo de IL-4, la muerte celular de CSC se incrementó significativamente mediante el tratamiento con fármacos quimioterapéuticos o TRAIL (Fig. 6d-e).

25 Para demostrar directamente que IL-4 protege el cáncer de colon generado por CSC de los fármacos quimioterapéuticos, se investigaron los efectos de la neutralización de IL-4 *in vivo*. Se dejó que los tumores crecieran durante 10 días (tamaño  $\sim 0,2 \text{ cm}^3$ ), y después se trataron intratumoralmente con anticuerpos neutralizantes frente a IL-4 o con IgG de control, dos veces a la semana durante 3 semanas. Aunque el tratamiento intraperitoneal (i.p.) con

oxaliplatino, una vez a la semana durante 4 semanas, combinado con IgG de control redujo el tamaño tumoral en los ratones, la eficacia del tratamiento quimioterapéutico se potenció significativamente por el anticuerpo neutralizante anti-IL-4 (Fig. 7a y 7b).

**Ejemplo 3**

5 Construcción de un polipéptido de fusión IL4RIL13R-Fc

El péptido señal y el dominio extracelular del receptor alfa de IL-4 (aa1-aa231 de acceso de NCBI NP\_000409) se fusionó N-terminalmente al dominio extracelular del receptor alfa de IL-13 (aa27-aa343 de acceso de NCBI NP\_001551). Se introdujeron dos mutaciones de punto en la secuencia de IL4R-alfa1 (Gly2->Val2 y Cys207->Ser207), y se introdujo una única mutación de punto en la secuencia de IL13R-alfa1 (Cys46->Ala46). La enumeración de las mutaciones de punto también se refiere a las entradas de la base de datos de NCBI NP\_000409 para IL4R-alfa1 y NP\_001551 para IL13R-alfa1.

15 Esta secuencia proteica de IL4RIL13R se fusionó a la parte de Fc de IGHG1 humana (aa254-aa479 de acceso de NCBI AAH69020). Adicionalmente se añadió C-terminalmente un elemento ligador flexible y un motivo Flexstreptag-II (SSSSSSAWSHPQFEK). La secuencia de aminoácidos del constructo resultante IL4RIL13R-Fc como se muestra más abajo se volvió a traducir en una secuencia de ADN sintético, y su uso de codones se optimizó para la expresión a base de células de mamífero. La síntesis génica se realizó mediante ENTELECHON GmbH (Regensburg, Alemania). El casete de expresión final se subclonó en el esqueleto principal pCDNA4-HisMax, usando los sitios únicos Hind-III y Not-I del plásmido.

SEC ID nº: 1

20 SEC IL4RIL13R-FC.PRO

PALABRA CLAVE PROTEÍNA

ORIGEN

```

1      MWLCSGLLF PVSCLVLLQV ASSGNMKVLQ EPTCVSDYMS ISTCEWKMG
PTNCSTELRL
61     LYQLVFLLE AHTCIPENNG GAGCVCHLLM DDVVSADNYT LDLWAGQQLL
WKGSEFKPSEH
121    VKPRAPGNLT VHTNVSDTLL LTWSNPYPPD NYLYNHLTYA VNIWSENDPA
DFRIYNVTYL
181    EPSLRIAAST LKSGISYRAR VRAWAQSYNT TWSEWSPSTK WHNSYREPFE
QAPTETQPPV
241    TNLSVSVENL ATVIWTWNPP EGASSNCSLW YFSHFGDKQD KKIAPETRRS
IEVPLNERIC
301    LQVGSQCSTN ESEKPSILVE KCISPPEGDP ESAVTELQCI WHNLSYMKCS
WLPGRNTSPD
361    TNYTLYYWHR SLEKIHQCEN IFREGQYFGC SFDLTKVKDS SFEQHSVQIM
VKDNAGKIKP
421    SFNIVPLTSR VKPDPPHIKN LSFHNDLLYV QWENPQNFIS RCLFYEVEVN
NSQTETHNVF
481    YVQEAKCENP EFERNVENTS CFMVPGLVLPD TLNTVRIRVK TNKLCYEDDK
LWSNWSQEMS
541    IGKKNRSTGD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC
VVVDVSHEDP
601    EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
KVYNKALPAP
661    IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW
ESNGQPENNY
721    KTTPLVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCVMHEA LHNHYTQKSL
SLSPGSSSSS
781    SAWSHPQFEK
    
```

aa1-aa23: péptido señal

25 aa24-aa231: ECD de IL4R-alfa1

aa232-aa548: ECD de IL13R-alfa1

aa549-aa775: parte de Fc de IGHG1

aa786-aa790: Flexstreptag-II

Las modificaciones del polipéptido de fusión IL4R-IL13R-Fc pueden ser las siguientes:

- 5 - ausencia del péptido señal, o presencia de un péptido señal heterólogo;
- presencia de una ECD de IL4R diferente, por ejemplo ECD de IL4R acortada, por ejemplo sin o con mutaciones diferentes, particularmente mutaciones de punto,
- presencia de un dominio efector diferente,
- presencia de un dominio de Fc diferente, y/o
- 10 - ausencia del dominio de purificación C-terminal (particularmente para aplicaciones farmacéuticas).

**Ejemplo 4**

Construcción de un polipéptido de fusión IL4R-Fc

15 El péptido señal y un dominio extracelular acortado del receptor alfa de IL-4 (aa1-aa224 de acceso de NCBI NP\_000409) se fusionó N-terminalmente a la parte de Fc de IGHG1 humana (aa250-aa479 de acceso de NCBI AAH69020). Se introdujeron dos mutaciones de punto en la secuencia de IL4R-alfa1 (Gly2->Val2 y Cys207->Ser207). Se insertó una única glicina entremedias de los dos dominios, y Lys251 de IGHG1 humana en la región bisagra se mutó a arginina. La enumeración de las mutaciones descritas también se refiere a las entradas de la base de datos de NCBI NP\_000409 para IL4R-alfa1 y acceso de NCBI AAH69020 para IGHG1).

20 Adicionalmente, se añadió C-terminalmente un elemento ligador flexible y un motivo Flexstreptag-II (SSSSSAWSHPQFEK). La secuencia de aminoácidos del constructo IL4R-Fc resultante como se muestra a continuación se volvió a traducir en una secuencia de ADN sintético, y su uso de codones se optimizó para la expresión a base de células de mamífero. La síntesis génica se realizó mediante ENTELECHON GmbH (Regensburg, Alemania). El casete de expresión final se subclonó en el esqueleto principal pCDNA4-HisMax, usando los sitios únicos de Hind-III y Not-I del plásmido.

25 SEC ID nº:2

SEC IL4RA-FC.PRO

PALABRA CLAVE PROTEÍNA

COLORES

secuencia = 1

30 características = 0

ORIGEN

1           MVWLCGGLLF PVSCLVLLQV ASSGNMKVLQ EPTCVSDYMS ISTCEWKMG  
 PTNCSTELRL  
 61           LYQLVFLLE AHTCIPENNG GAGCVCHLLM DDVVSADNYT LDLWAGQQLL  
 WKGSFKPSEH  
 121          VKPRAPGNLT VHTNVSDTLL LTWSNPYPPD NYLYNHLTYA VNIWSENDPA  
 DFRIYNVTYL  
 181          EPSLRIAAST LKSGISYRAR VRAWAQSNT TWSEWSPSTK WHNSGSRSCD  
 KTHTCPPCPA  
 241          PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG  
 VEVHNAKTKP  
 301          REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG  
 QPREPQVYTL  
 361          PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTPPVLDSD  
 GSFFLYSKLT  
 421          VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGSSSSS SAWSHPQFEK

aa1-aa23: péptido señal de IL4R-alfa1

aa24-aa224: ECD de IL4R-alfa1

aa225-aa455: parte de Fc de IGHG1

5 aa456-aa470: Flexstreptag-II

Las modificaciones del polipéptido de fusión de IL-4R acortado pueden ser según lo siguiente:

- ausencia de un péptido señal, o presencia de un péptido señal heterólogo;
- presencia de una ECD de IL4R diferente, por ejemplo ECD de IL4R acortada, por ejemplo sin o con mutaciones diferentes, particularmente mutaciones de punto,
- 10 - presencia de un dominio de Fc diferente,
- una región de fusión diferente entre la ECD de IL-4R y el dominio de Fc, por ejemplo supresión de uno o más aminoácidos de la secuencia RSC (posiciones 227-229), y/o
- ausencia del dominio de purificación C-terminal (particularmente para aplicaciones farmacéuticas).

### Ejemplo 5

15 Expresión y purificación de proteínas de unión a IL-4, IL4R-Fc e IL4R-IL13R-Fc

Células Hek 293T, que se hicieron crecer en DMEM + GlutaMAX (GibCo) suplementado con 10% de FBS, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, se transflectaron transitoriamente con plásmidos que codifican IL4R-Fc e IL4R-IL13R-Fc, respectivamente. Los sobrenadantes del cultivo celular que contienen proteínas recombinantes se cosecharon tres días después de la transfección, y se aclararon mediante centrifugación a 300 g,

20 seguido de la filtración a través de un filtro estéril de 0,22 µm. Para la purificación por afinidad, se empaquetó estreptactina sefarosa en una columna (lecho de gel 1 ml), equilibrada con 15 ml de tampón W (100 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, pH 8,0), y se aplicó a la columna el sobrenadante de cultivo celular respectivo con un caudal de 4 ml/min. Subsiguientemente, la columna se lavó con tampón W, y la IL4R-Fc o IL4R-IL13R-Fc unidas se eluyeron por etapas mediante adición de 6 x 1 ml de tampón E (100 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 2,5 mM de destiobiotina,

25 pH 8,0). Se cuantificó la cantidad de proteína de las fracciones del eluato, y las fracciones de los picos se concentraron mediante ultracentrifugación y se purificaron posteriormente mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC). En la Figura 8A se muestra un SDS-PAGE de la purificación por afinidad por estreptactina de IL4R-IL13R-Fc, seguido de la tinción con plata.

La SEC se llevó a cabo en una columna Superdex 200 usando un sistema de cromatografía Akta (GE-Healthcare).

30 La columna se equilibró con disolución salina tamponada con fosfato, y la IL4R-Fc o IL4R-IL13R-Fc, respectivamente, concentradas, purificadas mediante estreptactina, se cargaron en la columna de SEC a un caudal de 0,5 ml/min. El perfil de elución monitorizado mediante absorbancia a 280 nm mostró un pico proteico prominente a 10,31 ml para IL4R-IL13R-Fc (Figura 8B) y 12,97 ml para IL4R-Fc (Figura 9A). Las fracciones de SEC para IL4R-Fc se analizaron adicionalmente en condiciones desnaturizantes mediante SDS-PAGE y tinción con plata (Figura

35 9B).

Para la determinación del peso molecular aparente en condiciones nativas, se cargó una columna Superdex 200 con proteínas estándar de peso molecular conocido. Basándose en el volumen de elución de las proteínas estándar, se calculó una curva de calibración, y se determinó que el peso molecular aparente de la IL4R-Fc purificada era 137 KDa, que se ajusta bastante bien al peso molecular observado mediante SDS-PAGE. El peso molecular teórico basado en la secuencia de aminoácidos de IL4R-Fc es 52,8 Kda para la proteína monómera. Basándose en el análisis bioquímico, IL4R-Fc es expresada muy probablemente como un dímero proteico.

Para IL4R-IL13R-Fc, se calculó que el peso molecular aparente basado en SEC fue alrededor de 600 KDa. Basándose en el análisis de SDS-PAGE, la proteína sale como una única banda con alrededor de 250 Kda. El peso molecular teórico basado en la secuencia de aminoácidos de IL4R-IL13R-Fc es 87,7 KDa. En principio, la construcción de la molécula debería dar como resultado una proteína dímera estable, con un peso molecular teórico de alrededor de 180 Kda. El peso molecular aparente elevado observado mediante SEC indica por lo tanto un comportamiento inusual en SEC, o una oligomerización posterior de la proteína.

#### Ensayo de extracción de IL4

Para ensayar la unión específica a IL4 de IL4R-Fc e IL4R-IL13R-Fc, se inmovilizaron 4 µg de ambas proteínas, respectivamente, a estreptactina sefarosa vía su marcador de Strep. Las proteínas inmovilizadas se incubaron subsiguientemente durante 60 minutos con 400 ng de interleucina 4 (IL4) humana expresada recombinantemente, en un volumen total de 400 µl de disolución salina tamponada con fosfato. Subsiguientemente, las perlas se lavaron, y las proteínas unidas se eluyeron específicamente con destiobiotina en un volumen total de 40 µl de tampón de elución. Las proteínas eluidas se analizaron finalmente vía SDS-PAGE y tinción con plata. Como se muestra en la Figura 10, tanto IL4R-Fc como IL4R-IL13R-Fc muestran unión específica de IL4 humana, indicada por la presencia de la proteína IL4 (12 Kda) que no se pudo observar en los experimentos del control.

#### Ejemplo 6

##### Eficacia in vitro sobre células madre cancerosas y células tumorales primarias

Para ensayar la capacidad de IL4R-Fc e IL4R-IL13R-Fc para inducir apoptosis, ambas proteínas se añadieron al medio de crecimiento de células madre de cáncer de mama, ya sea solo o en combinación con doxorubicina. La Figura 11A muestra el análisis de inmunofluorescencia de las esferas de cáncer de mama pretratadas con PBS (w/o) o 10 µg de IL4R-Fc, IL4R-IL13R-Fc o anticuerpo anti-IL4 durante 24 horas, y expuestas sucesivamente durante otras 24 horas a 5 µM de doxorubicina. Las células se tiñeron con naranja de acridina/bromuro de etidio (rojo: células muertas; verde: células viables). En comparación con el tratamiento individual (doxorubicina sola), la combinación de doxorubicina con IL4R-Fc o IL4R-IL13R-Fc, respectivamente, incrementó claramente la cantidad de células madre de cáncer de mama apoptóticas. Un recuento celular que discrimina células apoptóticas y células vivas, representado gráficamente después para el porcentaje de viabilidad celular, también demuestra la eficacia del tratamiento de combinación para la inducción de apoptosis (Figura 11B). De forma importante, tanto IL4R-Fc como IL4R-IL13R-Fc son capaces de sensibilizar a las células madre de cáncer de mama para la apoptosis inducida por doxorubicina en el mismo intervalo como se muestra para un anticuerpo específico de IL4, que se usó como un control positivo en este experimento.

En las células de cáncer de colon primarias, los constructos de IL4R-Fc e IL4R-IL13R-Fc se ensayaron en combinación con tratamiento con oxaliplatino. Las células de cáncer de colon primarias se pretrataron con PBS (w/o) o 10 µg de IL4R-Fc, IL4R-IL13R-Fc o anticuerpo anti-IL4 durante 24 horas, y se expusieron sucesivamente durante otras 24 horas a 100 µM de oxaliplatino. Las gráficas muestran el porcentaje de viabilidad celular medido mediante análisis de MTS (CellTiter 96, Aquos, Promega). Como se muestra en la Figura 11C, ambos constructos son capaces de sensibilizar a las células de cáncer de colon primarias para la apoptosis inducida por oxaliplatino, indicado mediante una viabilidad celular reducida en comparación con el tratamiento con oxaliplatino solo.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método in vitro para diagnosticar un tipo de cáncer, que comprende las etapas:
    - (a) proporcionar una muestra procedente de un tumor epitelial que comprende células tumorales,
    - (b) determinar la expresión de al menos una citocina antiapoptótica en dichas células tumorales, y
    - 5 (c) clasificar el tumor epitelial como un tumor que no expresa citocinas o como un tumor que expresa citocinas,

en el que la citocina antiapoptótica es IL-4 y/o IL-10,

en el que el tumor epitelial se clasifica como un tumor que expresa IL-4, un tumor que no expresa IL-4, un tumor que expresa IL-10, un tumor que no expresa IL-10, un tumor que expresa IL-4 e IL-10, o como un tumor
  - 10 que no expresa IL-4 y no expresa IL-10.
2. El método in vitro según la reivindicación 1, en el que el tumor epitelial se selecciona del grupo de cáncer de tiroides, de mama, de próstata, de vejiga, de colon, gástrico, de páncreas, de riñón, de hígado y de pulmón.
  3. El método in vitro según la reivindicación 2, en el que el tumor es preferiblemente un cáncer de colon, gástrico, de mama, de pulmón, de vejiga, o de próstata.
  - 15 4. El método in vitro según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células tumorales son células tumorales primarias y/o células madre cancerosas.
  5. El método in vitro según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección de la expresión de citocinas antiapoptóticas en las células tumorales comprende una detección a nivel de proteínas y/o a nivel de ácidos nucleicos, preferiblemente:
    - 20 (a) una detección a nivel de proteínas, que comprende la detección de la citocina antiapoptótica, preferiblemente con métodos inmunoquímicos y/o espectrométricos de masas, o
    - (b) una determinación a nivel de ácidos nucleicos, que comprende la determinación de los niveles de expresión de ARNm de la citocina antiapoptótica con métodos de hibridación de ácidos nucleicos y opcionalmente amplificación, preferiblemente con métodos de RT-PCR.
  - 25 6. El método in vitro según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además las etapas de
    - (d) determinar la sensibilidad de las células de un tumor que expresa citocinas frente a al menos un agente quimioterapéutico o proapoptótico en presencia y/o en ausencia de un antagonista de dicha citocina expresada, y/o su receptor, preferiblemente determinando un agente quimioterapéutico o proapoptótico frente al cual son sensibles las células del tumor que expresa citocinas, y
    - 30 (e) opcionalmente seleccionar un tratamiento específico para el tipo de cáncer, preferiblemente seleccionar un tratamiento que comprende la administración de una combinación de un agente neutralizante de citocinas y un agente quimioterapéutico o apoptótico, en el que el agente neutralizante de citocinas es un agente neutralizante de IL-4 y/o IL-10, en el que el agente neutralizante de citocinas es un agente neutralizante de IL-4 o IL-4 e IL-10.
  - 35 7. El método in vitro según la reivindicación 6, en el que el agente quimioterapéutico se selecciona de antimetabolitos, agentes que fragmentan el ADN, agentes de reticulación del ADN, agentes intercalantes, inhibidores de la síntesis proteica, inhibidores de las topoisomerasas I y II, agentes dirigidos contra los microtúbulos, inhibidores de cinasas, hormonas y antagonistas de hormonas, o en el que el agente proapoptótico se selecciona de TRAIL y el ligando CD95.
  - 40 8. El método in vitro según la reivindicación 7, en el que el agente quimioterapéutico se selecciona de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.
  9. El método in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el agente neutralizante de citocinas es un anticuerpo anti-IL-4 y/o un anticuerpo anti-IL-10, o un fragmento de unión a antígenos del mismo.
  - 45 10. El método in vitro según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo anti-IL-4 es un anticuerpo derivado de la célula de hibridoma ECACC 93100620, o un fragmento de unión a antígenos de la misma.
  11. El método in vitro según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el agente neutralizante de citocinas es un polipéptido del receptor soluble de IL-4 o un polipéptido de fusión.

12. Una combinación de

(i) al menos un agente neutralizante de citocinas, y

5 (ii) al menos un agente quimioterapéutico o proapoptótico, agente proapoptótico el cual se selecciona de TRAIL o CD95L, para uso en un método para el tratamiento de tumores epiteliales que se han hecho refractarios a agentes quimioterapéuticos, en la que el agente neutralizante de citocinas es un agente neutralizante de IL-4 que inhibe la actividad de la proteína citocínica expresada.

13. Una combinación de

(i) al menos un agente neutralizante de citocinas, y

10 (ii) al menos un agente quimioterapéutico o proapoptótico, agente proapoptótico el cual se selecciona de TRAIL o CD95L, para uso en un método para el tratamiento de un tumor epitelial que expresa citocinas, en la que el agente neutralizante de citocinas es un agente neutralizante de IL-4 que inhibe la actividad de la proteína citocínica expresada.

14. La combinación de la reivindicación 13, para uso en un método como se define en la reivindicación 13, en combinación con cirugía y/o terapia de irradiación.

15 15. Una combinación de

(i) al menos un agente neutralizante de citocinas, y

20 (ii) al menos un agente quimioterapéutico o proapoptótico, agente proapoptótico el cual se selecciona de TRAIL o CD95L, para uso en un método para el tratamiento de un tumor epitelial que expresa citocinas, en la que la administración de (i) y (ii) se comienza simultáneamente; o en la que la administración de (i) y (ii) se comienza por etapas, en la que el agente neutralizante de citocinas es un agente neutralizante de IL-4 que inhibe la actividad de la proteína citocínica expresada.

16. La combinación según la reivindicación 15, para uso en un método como se define en la reivindicación 15, en la que el comienzo de la administración de (i) es  $\geq 1$  semana antes de (ii), o en la que el comienzo de la administración de (ii) es  $\geq 1$  semana antes de (i).

25 17. Un receptor alfa de IL-4 soluble humano (número de acceso de NCBI NP\_000409), que termina C-terminalmente en el aminoácido 230, 229, 228, 227, 226, 225 ó 224, para uso en un método para el tratamiento de tumores epiteliales.

30 18. Un polipéptido del receptor de IL-4 soluble, que comprende un dominio del receptor de IL-4 extracelular acortado C-terminalmente que comprende al menos un dominio adicional, en el que el dominio adicional es un dominio extracelular del receptor de IL-13, para uso en un método para el tratamiento de tumores epiteliales.

Figura 1a

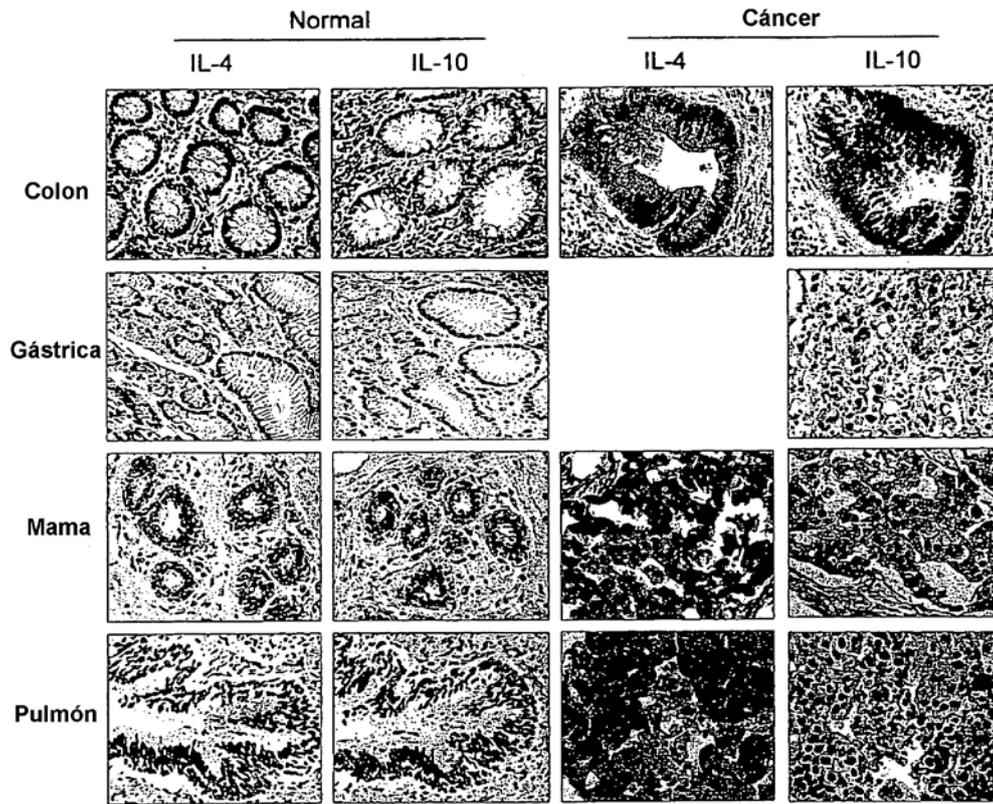


Figura 1b

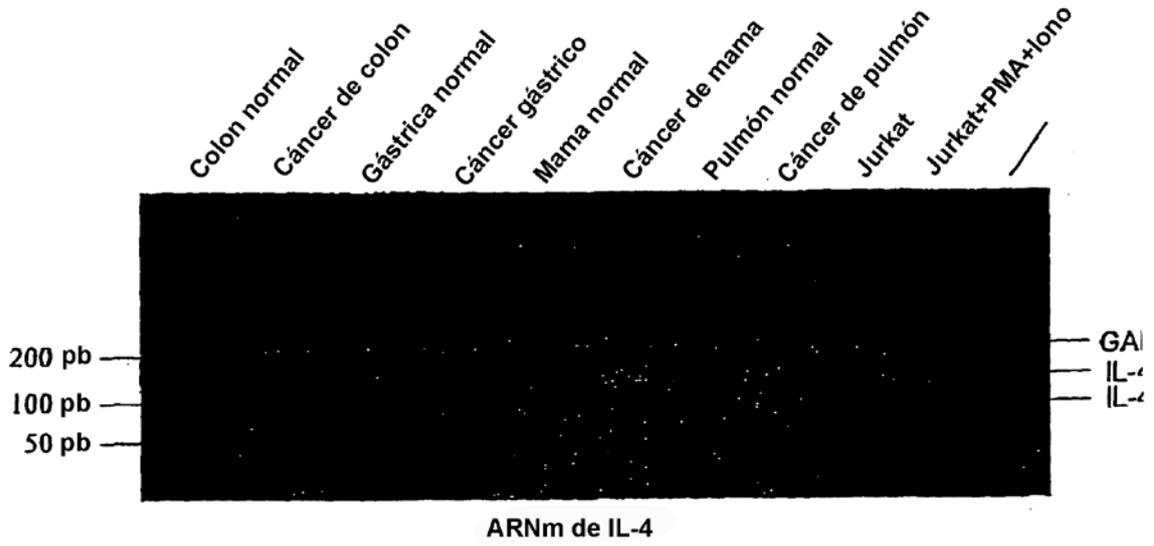


Figura 2a

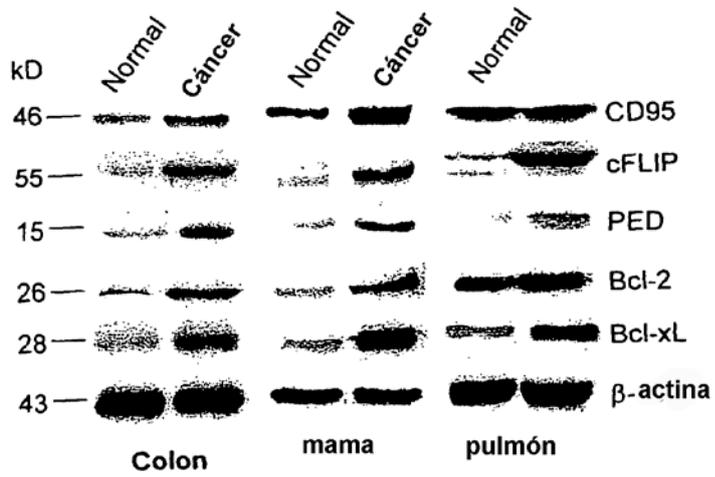


Figura 2b

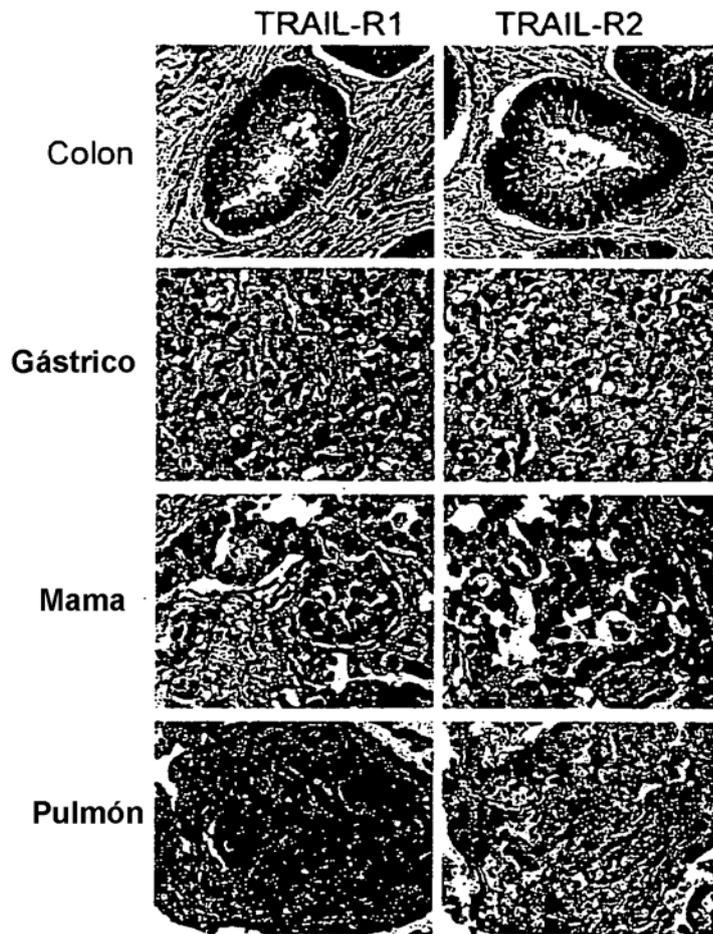


Figura 3a

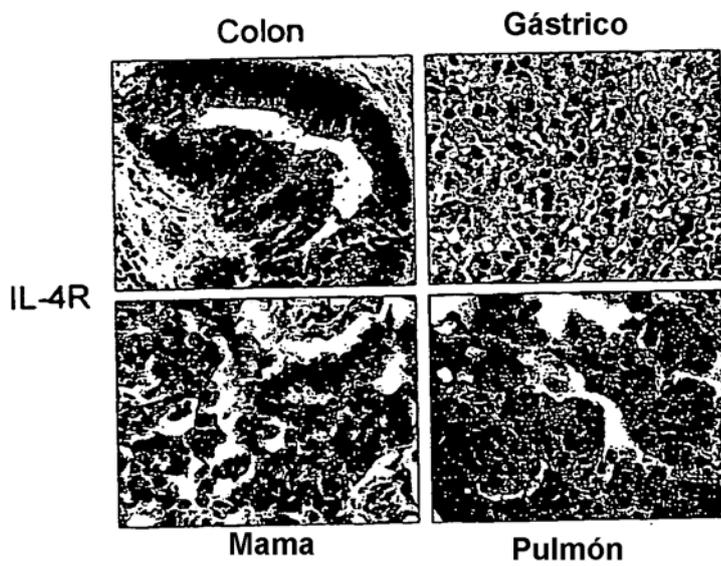
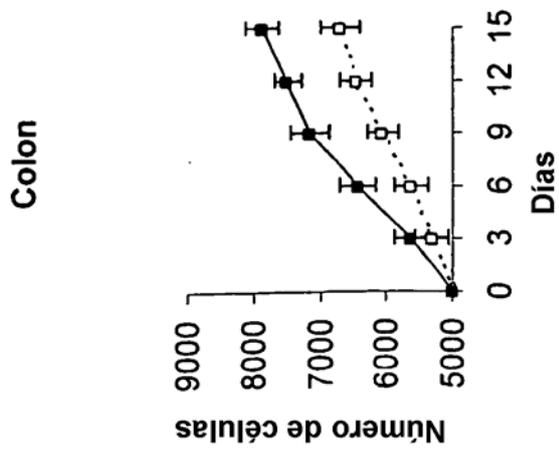
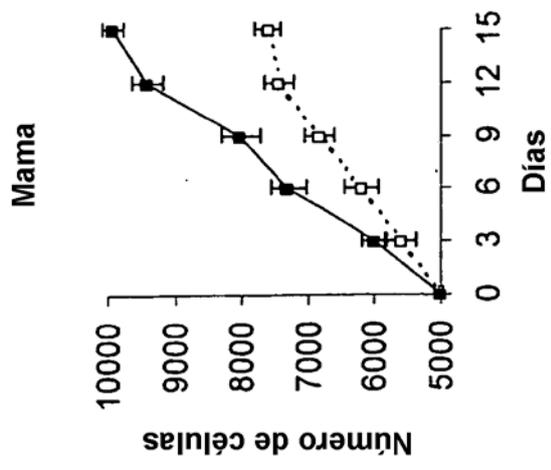
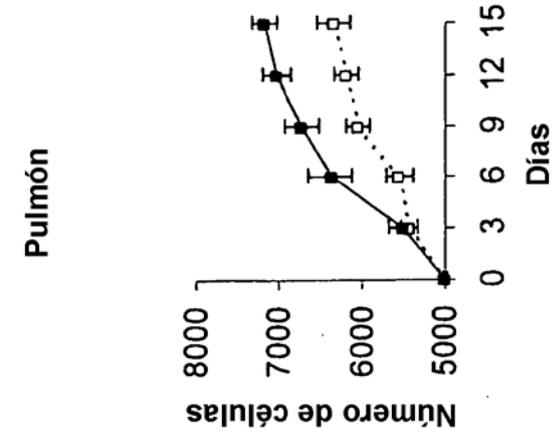


Figura 3b



.....sin    —■— IL-4

Figura 3c

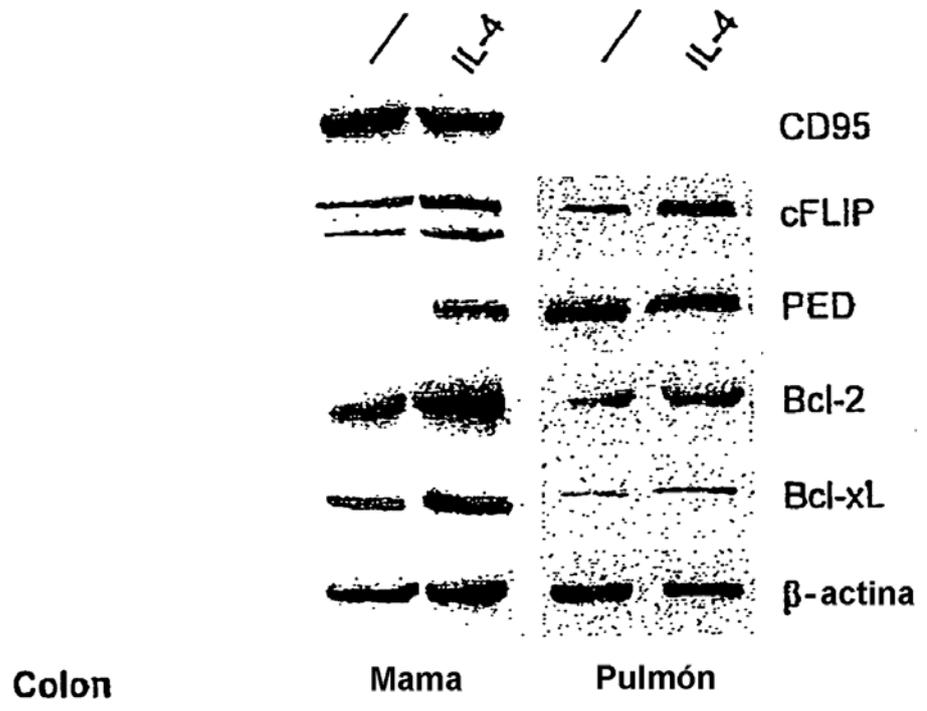


Figura 4a

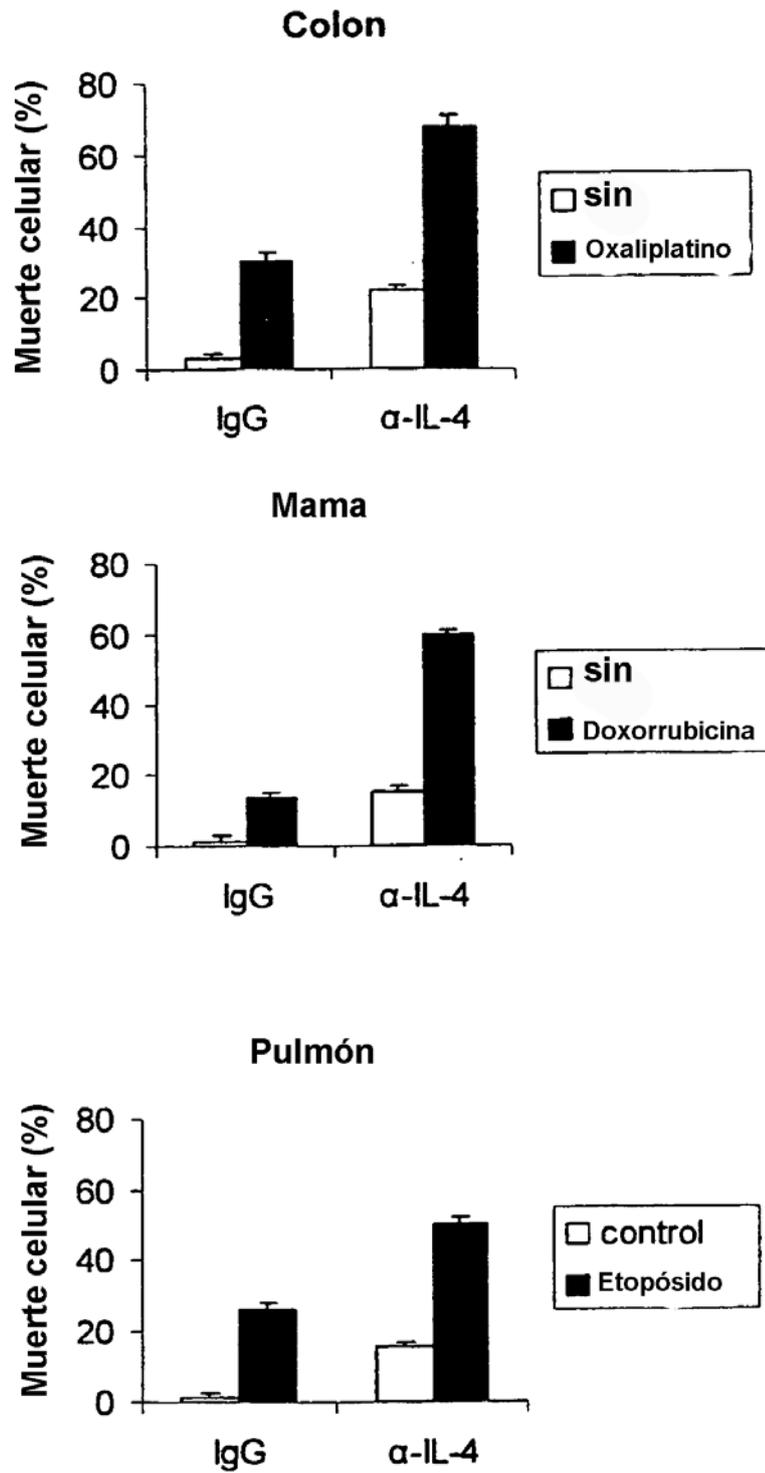


Figura 4b

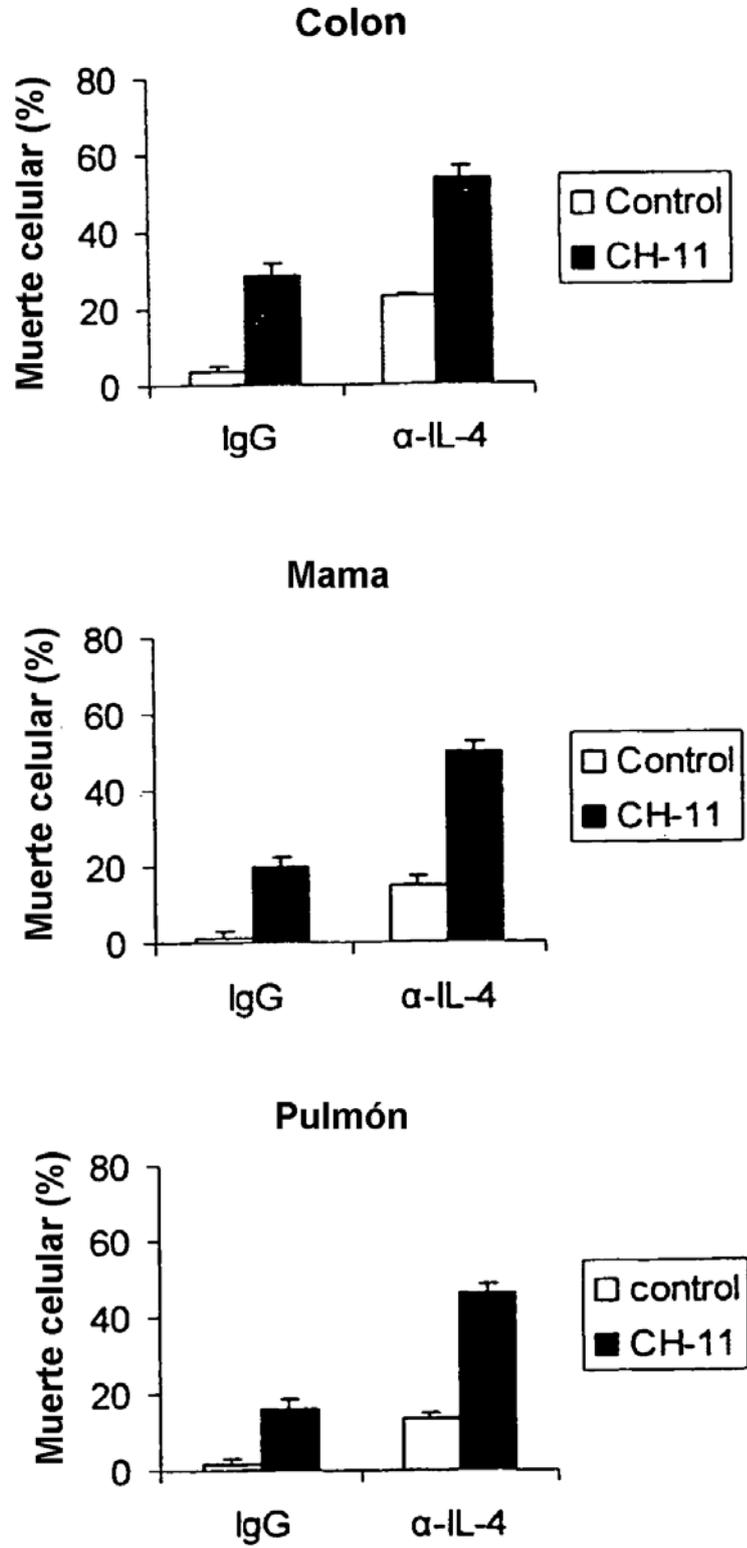


Figura 4c

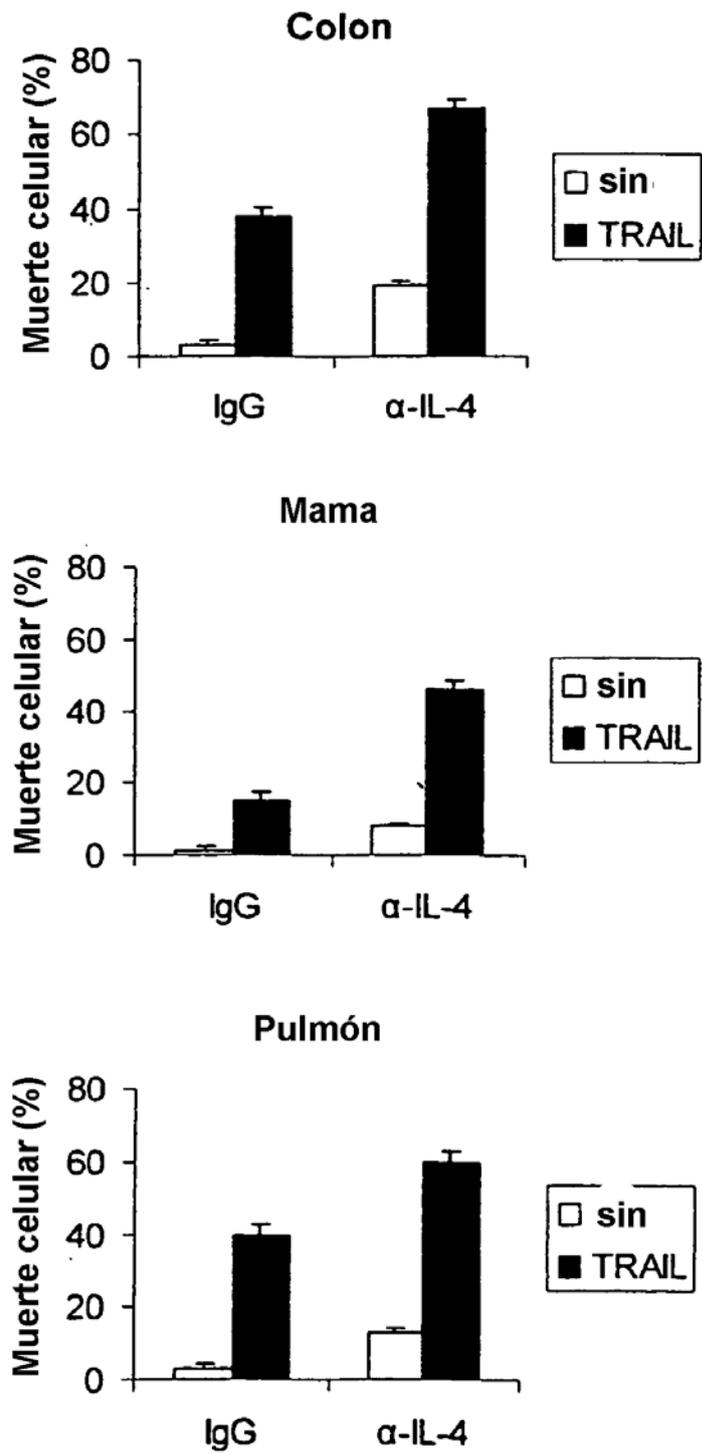


Figura 5a

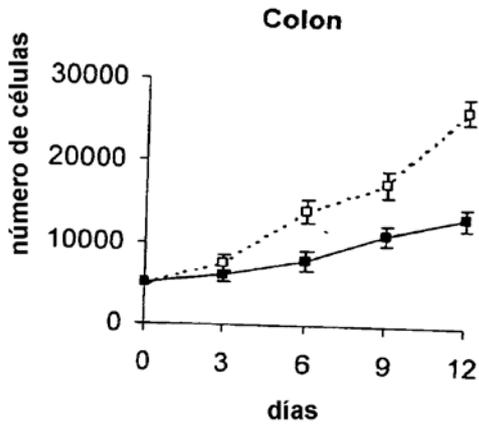


Figura 5b

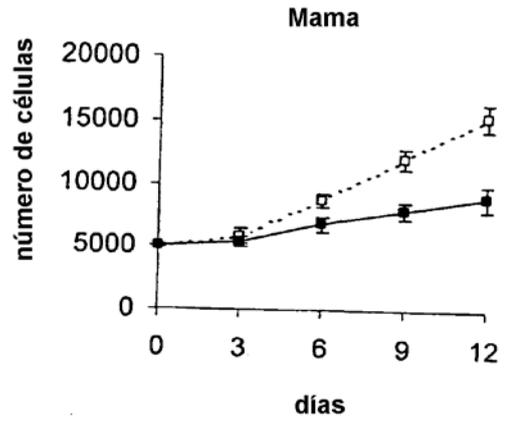


Figura 5c

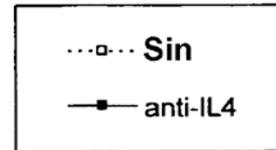
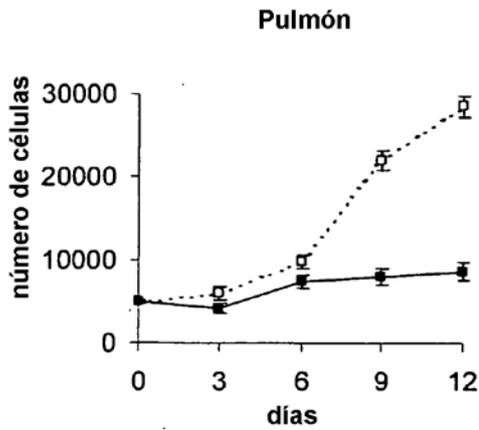


Figura 6a

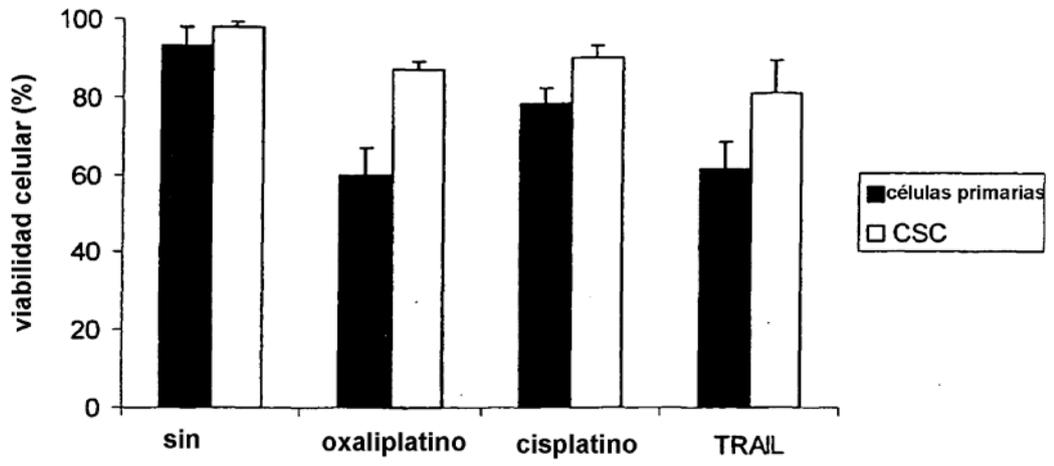


Figura 6b

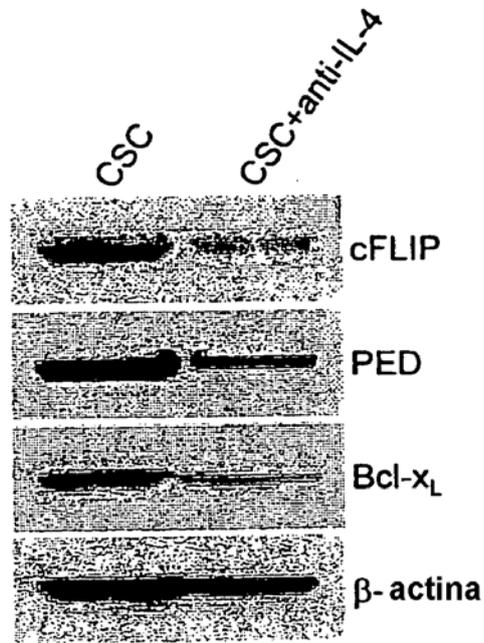


Figura 6c

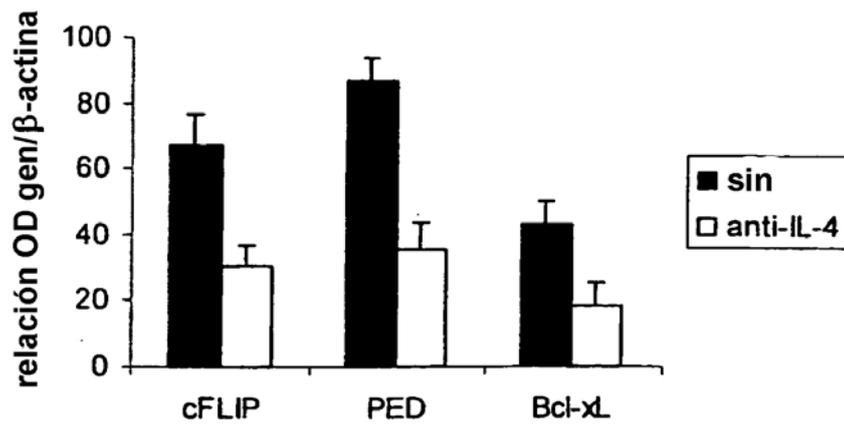


Figura 6d

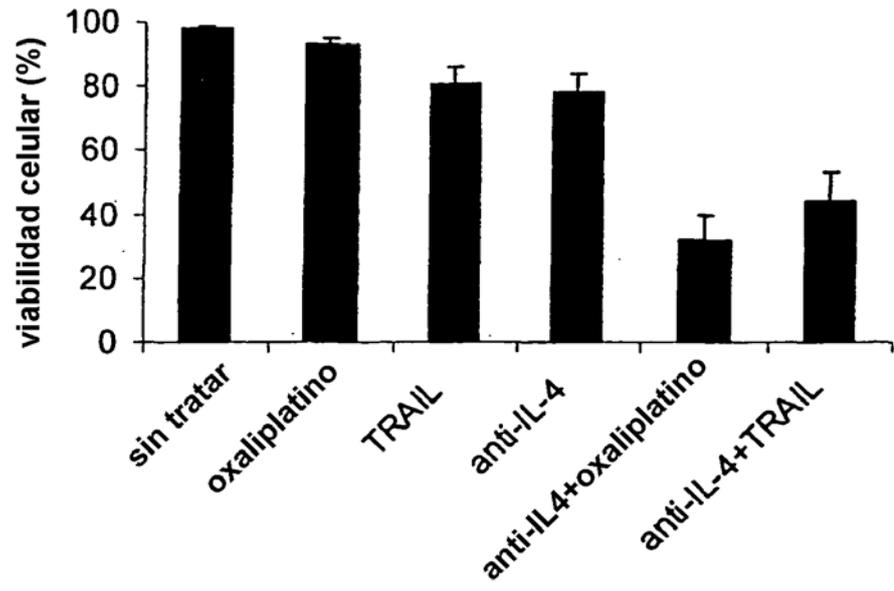


Figura 6e

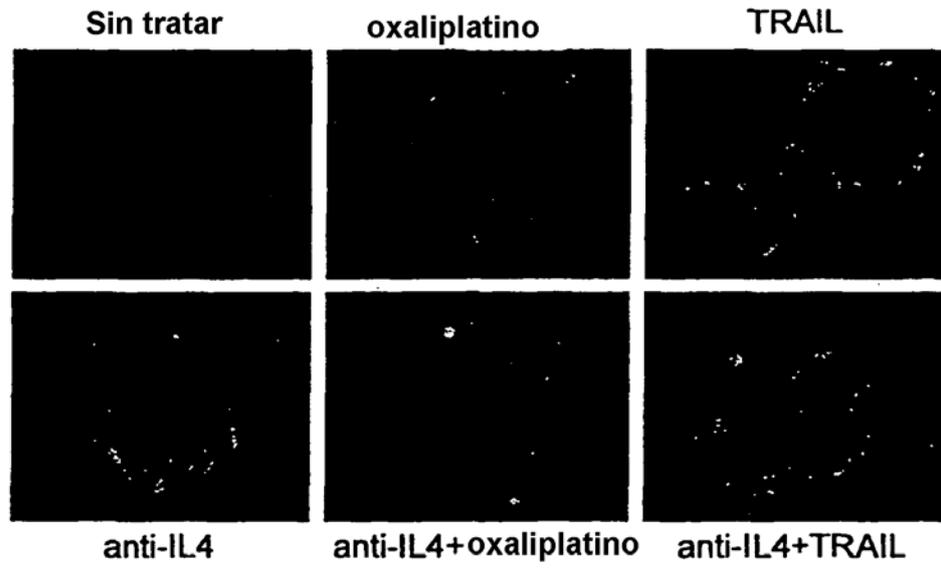


Figura 7a

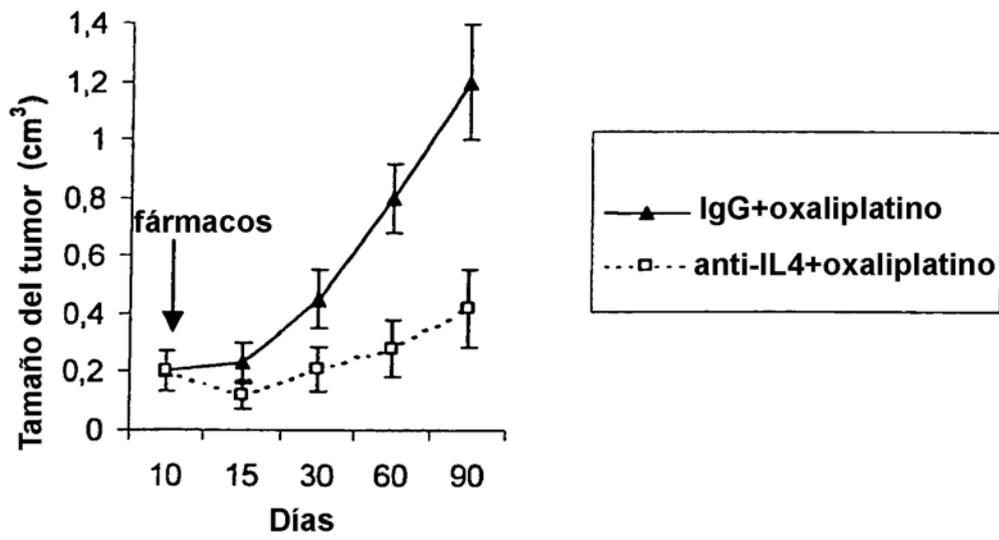


Figura 7b

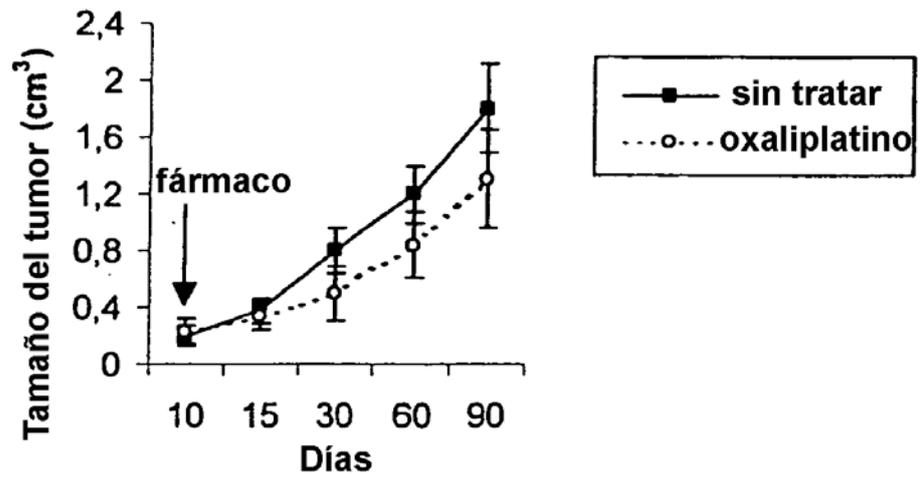


Figura 8a

Tinción con plata en SDS-PAGE de fracciones purificadas mediante afinidad por estreptactina de IL4R-IL13R-Fc

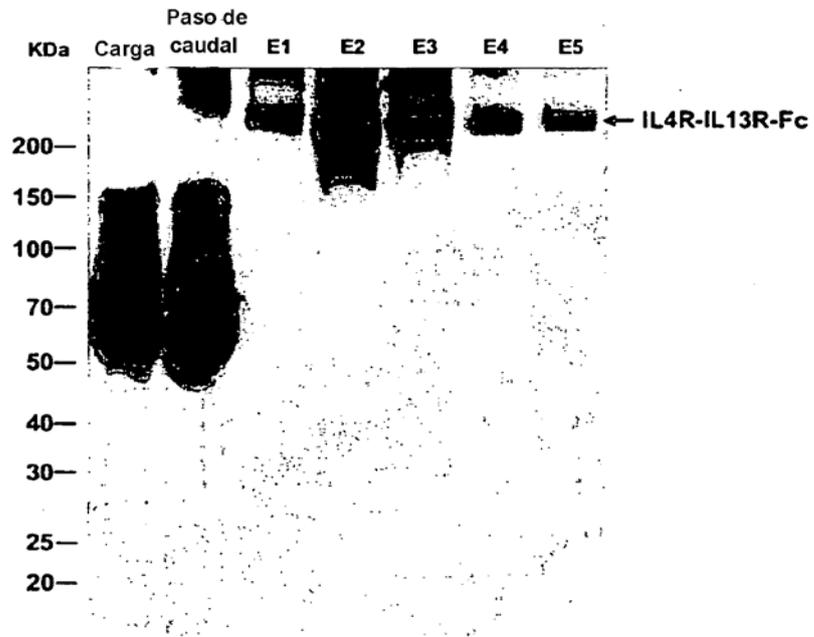


Figura 8b

Perfil de elución de SEC de IL4R-IL13R-Fc en Superdex 200

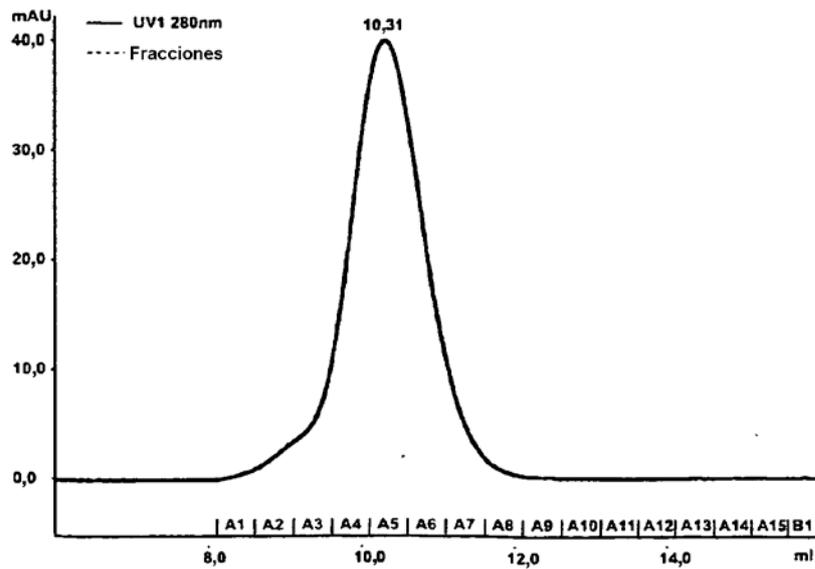


Figura 9a

Perfil de elución de SEC de IL4R-Fc en Superdex 200

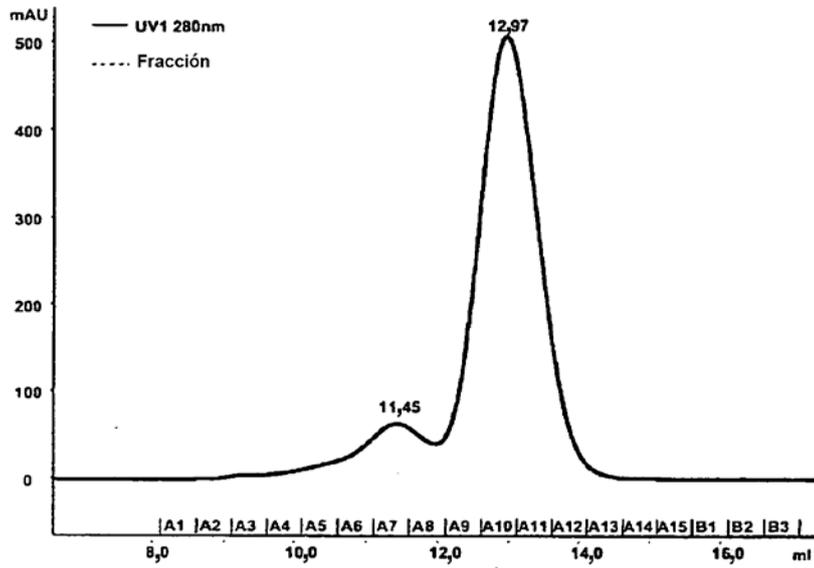


Figura 9b

Tinción con plata en SDS-PAGE de fracciones de SEC de IL4R-Fc

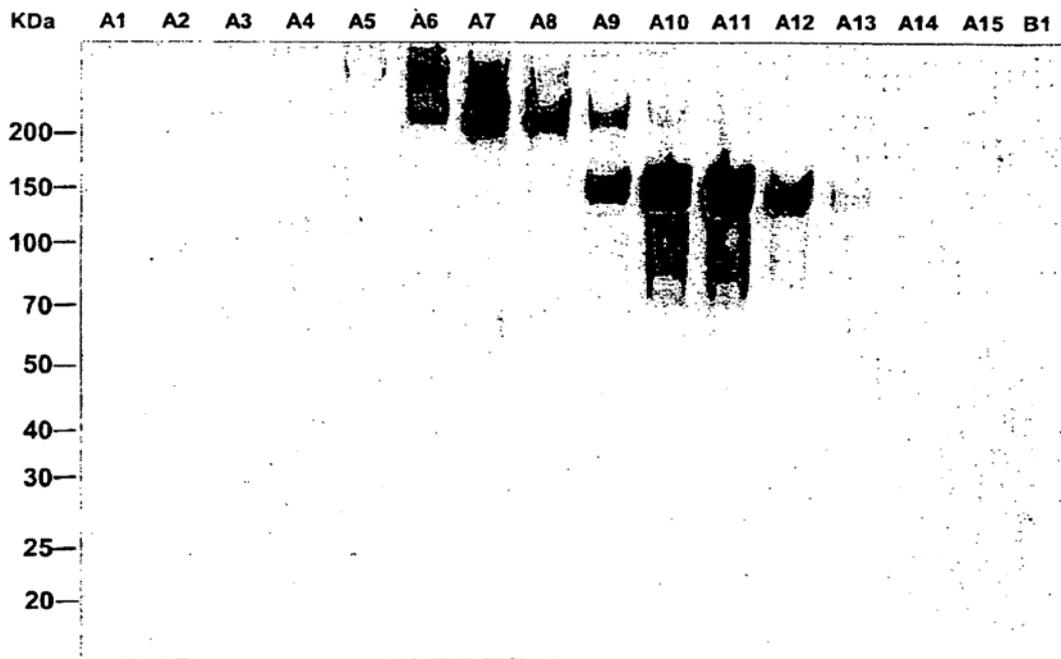


Figura 10

Unión específica de IL4 tanto a IL4R-Fc como a IL4R-IL13R-Fc.

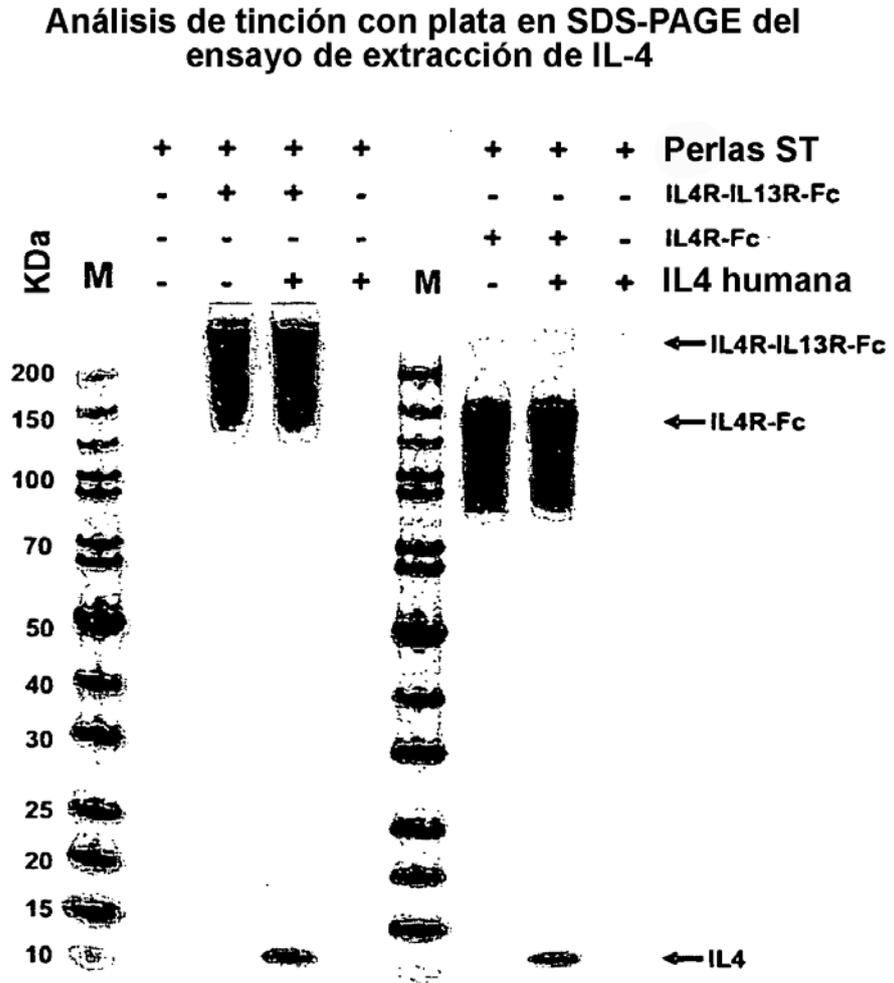
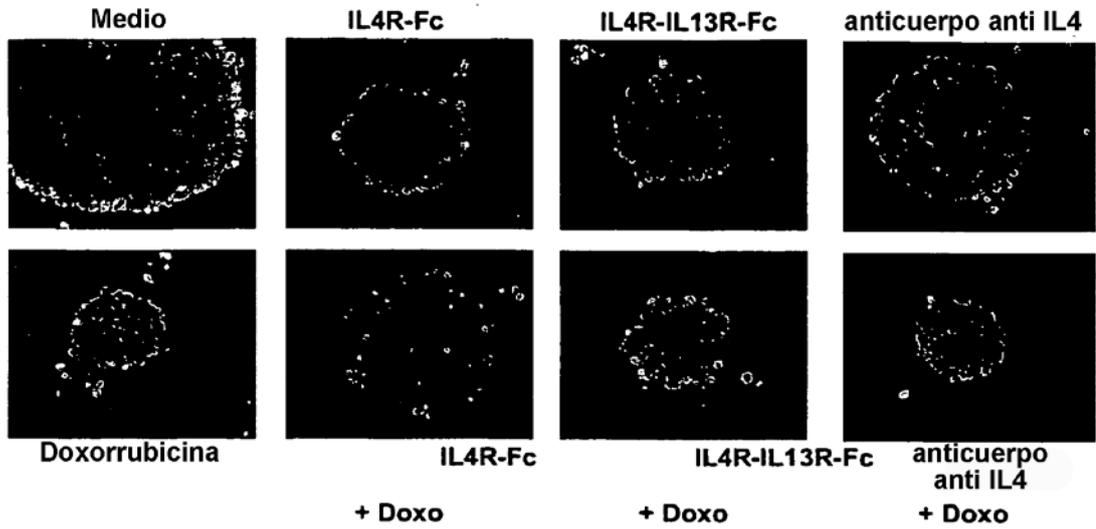
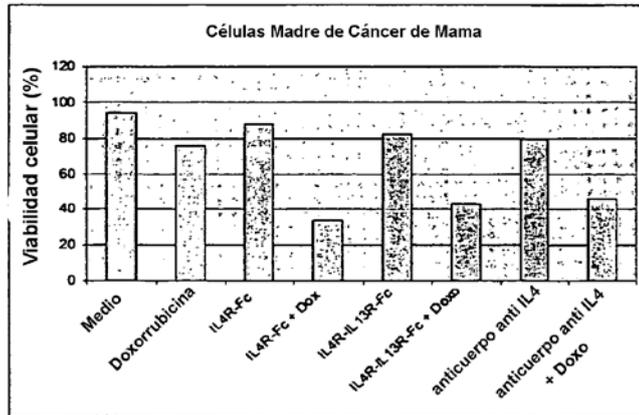


Figura 11

A) Células Madre de Cáncer de Mama



B)



C)

