

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 938**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61P 19/10** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08750480 .9**

96 Fecha de presentación: **23.04.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2152753**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.02.2010**

54 Título: **Anticuerpos contra ramp3**

30 Prioridad:

**25.04.2007 GB 0708002**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**02.01.2013**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**02.01.2013**

73 Titular/es:

**MEDELLA THERAPEUTICS LTD (100.0%)  
SHEFFIELD BIOINCUBATOR 40 LEAVYGREAVE  
ROAD  
SHEFFIELD SOUTH YORKSHIRE S3 7RD, GB**

72 Inventor/es:

**SKERRY, TIMOTHY MICHAEL y  
RICHARDS, GARETH OWEN**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

ES 2 393 938 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**

Anticuerpos contra RAMP3

**5 Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a una proteína modificadora de la actividad del receptor (RAMP) asociada con el receptor similar al receptor de calcitonina.

**10 Antecedentes de la invención**

La familia calcitonina de péptidos actúa a través de los receptores de membrana acoplados a la proteína G (GPCR). Los genes de los receptores de calcitonina se clonaron. Es homólogo a los GPCR en la familia "B" que típicamente reconoce péptidos reguladores (secretina, glucagones, VIP). Se identificó un homólogo del receptor de calcitonina, el Receptor Similar al Receptor de Calcitonina (CRLR, además conocido como CL) (461 aa humanos; 463 aa de rata/ratón) y tiene 55% de homología con el receptor de calcitonina (Njuki y otros, Clin. Sci. 85, 385-388 (1993); Chang y otros, Neuron 11, 1187-1195 (1993); Fluhmann y otros, Biochem.Biophys. Res. Comun. 206, 341-347 (1995); Kapas y otros, J. Biol. Chem. 270, 25344-25347 (1995)).

El CRLR solo no es capaz de transducir una señal en respuesta a la adrenomedulina (AM), ya que la presencia de una RAMP (Proteína Modificadora de la Actividad del Receptor de calcitonina) se necesita para inducir la especificidad de ligando, unión y activación del CRLR. Las RAMP son una familia de proteínas pequeñas de membrana intrínsecas, con un tamaño previsto de 14,000-17,000 Kd. Las RAMP consisten de aproximadamente 120 aminoácidos con dominios grandes extracelulares de alrededor de 100 aminoácidos; un dominio de extensión único y una región intracelular corta de aproximadamente 10 aminoácidos.

Se demostró que el CRLR puede funcionar ya sea como un receptor CGRP o un receptor AM, dependiendo de qué miembros se expresan de la familia RAMP, las RAMP1-3. Los tres miembros de la familia RAMP, RAMP1, 2 y 3, generan especificidades de ligando diferentes del CRLR de manera que:

**30 RAMP1 + CRLR = CGRP receptor**

**RAMP2 + CRLR = AM receptor**

**RAMP3 + CRLR = AM receptor**

Las secuencias RAMP 1, 2 y 3 están disponibles como sigue:

RAMP 1 - Núm. de acceso al GenBank NM\_005855

RAMP 2 - Núm. de acceso al GenBank NM\_005854; UniGene ID Hs.155106

RAMP 3 - Núm. de acceso al GenBank NM\_005856; UniGene ID Hs.25691.

Keleg, S. y otros (2007, Int.J.Cancer:121, 21-32) describe que la adrenomedulina que se une al CRLR se induce por hipoxia y aumenta la invasión celular en el cáncer pancreático.

Los anticuerpos policlonales que se unen a RAMP2 y son útiles en el tratamiento del cáncer se describen en WO2004/060834. Los anticuerpos se produjeron para una región del dominio extracelular RAMP2 que se cree crítica para la unión del CRLR al RAMP2.

WO 2007/045927 se relaciona con agentes que modulan el efecto de una RAMP.

Debido a la alta utilidad potencial que podrían tener en la terapia y el diagnóstico dichos anticuerpos anti-RAMP existe una necesidad además de anticuerpos anti-RAMP.

Los presentes inventores aislaron y caracterizaron además anticuerpos anti-RAMP. Estos anticuerpos demostraron, *entre otros*, inhibir la proliferación celular del cáncer y son útiles en la prevención del cáncer.

**55 Declaraciones de intención**

Se apreciará que la presente invención se proporciona de acuerdo con lo que se define en las reivindicaciones.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona en la presente un anticuerpo aislado capaz de unirse a la proteína 3 modificadora de la actividad del receptor (RAMP3) del CRLR cuyo anticuerpo comprende:

- 5 i) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1a; y
- ii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2a.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona en la presente un anticuerpo aislado capaz de unirse a la proteína 3 modificadora de la actividad del receptor (RAMP3) del CRLR cuyo anticuerpo comprende:

- 10 ii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1b; y
- ii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2b.

15 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona en la presente un anticuerpo aislado capaz de unirse a una proteína modificadora de la actividad del receptor (RAMP) del receptor CRLR cuyo anticuerpo es de IgG. Isotipo IgA o IgM.

20 En una modalidad el anticuerpo del primer aspecto de la invención es del isotipo IgG. El anticuerpo puede ser de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Preferentemente el anticuerpo es del isotipo IgG1.

En otra modalidad el anticuerpo del primer aspecto de la invención es del isotipo IgA. El anticuerpo puede ser de las subclases IgA1 o IgA2.

25 En otra modalidad el anticuerpo del primer aspecto de la invención es del isotipo IgM.

El anticuerpo del primer aspecto de la invención puede ser un polipéptido monomérico, dimérico, trimérico, tetramérico o pentamérico.

30 El anticuerpo puede ser capaz de unirse a RAMP1, RAMP2 o RAMP3. Preferentemente los anticuerpos de la invención son capaces de unirse a RAMP3.

El anticuerpo de la invención puede ser un antagonista o agonista RAMP o potenciador de la actividad de los ligandos naturales o artificiales del receptor.

35 El anticuerpo de la invención puede funcionar como un antagonista RAMP. Los datos descritos en la presente pueden indicar que el anticuerpo puede inhibir ya sea la interacción entre RAMP y CRLR por un lado o inhibir la interacción entre un complejo RAMP/CRLR asociado y un ligando tal como la adrenomedulina. En una modalidad el anticuerpo es un anticuerpo anti-RAMP3 del isotipo IgM y es un antagonista RAMP. En otra modalidad el anticuerpo es un anticuerpo anti-RAMP3 del isotipo IgG1 y es un antagonista RAMP.

40 En una modalidad, el anticuerpo de la invención funciona como un agonista RAMP. Los datos descritos en la presente pueden indicar que el anticuerpo puede en una modalidad el anticuerpo es un anticuerpo anti-RAMP3 de isotipo IgG1 y es un agonista RAMP o potenciador RAMP de acción AM.

45 Un segundo aspecto de la invención proporciona un anticuerpo aislado capaz de unirse a una proteína modificadora de la actividad del receptor (RAMP) del receptor CRLR cuyo anticuerpo comprende un dominio de unión seleccionado del grupo que consiste de:

- 50 i) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1a;
- ii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1b;
- 55 iii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1c;
- iv) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1d;
- 60 v) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una molécula de ácido nucleico como la definida anteriormente en (i), (ii), (iii) o (iv);

vi) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que se degenera como resultado del código genético hasta la secuencia de ácido nucleico definida en (i), (ii), (iii), (iv) o (v).

- 5 En un tercer aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado capaz de unirse a una proteína modificadora de la actividad del receptor (RAMP) del receptor CRLR cuyo anticuerpo comprende un dominio de unión seleccionado del grupo que consiste de:
- 10 i) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2a;
- ii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2b;
- 15 iii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2c;
- iv) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2d;
- 20 v) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una molécula de ácido nucleico como la definida anteriormente en (i), (ii), (iii) o (iv); y
- vi) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que se degenera como resultado del código genético hasta la secuencia de ácido nucleico definida en (i), (ii), (iii), (iv) o (v).
- 25

En un aspecto preferido de la invención se proporciona un anticuerpo aislado capaz de unirse a la proteína modificadora de la actividad del receptor de CRLR cuyo anticuerpo comprende uno o ambos de los siguientes dominios de unión:

- 30 i) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1a; y/o
- ii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2a.
- 35

En un aspecto preferido adicional de la invención se proporciona un anticuerpo aislado capaz de unirse a la proteína modificadora de la actividad del receptor de CRLR cuyo anticuerpo comprende uno o ambos de los siguientes dominios de unión:

- 40 i) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1b; y/o
- ii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2b.
- 45

La molécula de ácido nucleico puede aparearse bajo condiciones rigurosas de hibridación a la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 1a a d o a su cadena complementaria. Las condiciones rigurosas de hibridación/lavado se conocen bien en la materia. Por ejemplo, los híbridos de ácido nucleico que son estables después del lavado en 0.1xSSC, 0.1% SDS a 60°C. Se conocen bien en la materia que las condiciones de hibridación óptimas pueden calcularse si se conocen las secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, las condiciones de hibridación pueden determinarse por el contenido de GC del ácido nucleico sujeto a hibridación. Por favor ver Sambrook y otros (1989) Molecular Cloning; A Laboratory Approach. Una fórmula común para calcular las condiciones de rigurosidad requeridas para lograr la hibridación entre las moléculas de ácido nucleico de una homología especificada es:

50

55

$$T_m = 81.5^{\circ} \text{C} + 16.6 \text{ Log} [\text{Na}^+] + 0.41 [\% \text{ G} + \text{C}] - 0.63 (\% \text{ formamida}).$$

60 Un aspecto adicional de la invención proporciona un anticuerpo aislado capaz de unirse a una proteína modificadora de la actividad del receptor (RAMP) del receptor CRLR cuyo anticuerpo comprende un dominio de unión seleccionado del grupo que consiste de:

- 5 i) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1a;  
 ii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1b;  
 iii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1c; y  
 iv) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1d.
- 10 En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo aislado capaz de unirse a una proteína modificadora de la actividad del receptor (RAMP) del receptor CRLR cuyo anticuerpo comprende un dominio de unión seleccionado del grupo que consiste de:
- 15 i) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2a;  
 ii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2b;  
 iii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2c; y  
 20 iv) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2d.
- En un aspecto preferido de la invención se proporciona un anticuerpo aislado capaz de unirse a la proteína modificadora activadora del receptor CRLR cuyo anticuerpo comprende uno o ambos de los siguientes dominios de unión:
- 25 i) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1a; y/o  
 ii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2a.
- 30 En un aspecto preferido de la invención se proporciona un anticuerpo aislado capaz de unirse a la proteína modificadora activadora del receptor CRLR cuyo anticuerpo comprende uno o ambos de los siguientes dominios de unión:
- 35 i) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1b; y/o  
 ii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2b.
- En una modalidad el anticuerpo de la invención comprende un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se expone en una secuencia de aminoácido seleccionada de aquellas representadas en la Figura 3.
- 40 En una modalidad el anticuerpo de la invención comprende un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se expone en una secuencia de aminoácido seleccionada de aquellas representadas en la Figura 4.
- 45 En una modalidad el anticuerpo de la invención comprende un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se expone en una secuencia de aminoácido seleccionada de aquellas representadas en la Figura 5.
- 50 En una modalidad el anticuerpo de la invención comprende un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se expone en una secuencia de aminoácido seleccionada de aquellas representadas en la Figura 6.
- 55 En una modalidad el anticuerpo de la invención comprende un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se expone en la secuencia de aminoácido seleccionada de aquellas representadas en la Figura 7.
- 60 En una modalidad el anticuerpo de la invención comprende un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se expone en la secuencia de aminoácido seleccionada de aquellas representadas en la Figura 8.  
 En una modalidad el anticuerpo de la invención comprende un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se expone en la secuencia de aminoácido seleccionada de aquellas representadas en la Figura 9.

En una modalidad el anticuerpo de la invención comprende un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido sustancialmente como se expone en la secuencia de aminoácido seleccionada de aquellas representadas en la Figura 10.

5 Los anticuerpos que comprenden una pluralidad de dominios de unión de la misma secuencia o secuencia diferente, o combinaciones de los mismas, se incluyen dentro de la presente invención. El o cada polipéptido puede ser portado en un marco de anticuerpo humano. Por ejemplo, una o más regiones de unión pueden sustituirse por las CDR de un anticuerpo humano completo o de la región variable de los mismos.

10 En un cuarto aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende un anticuerpo del segundo aspecto en combinación o asociación con un anticuerpo del tercer aspecto. Tal anticuerpo puede estar en la forma de un Fv, (Fab')<sub>2</sub>, o fragmento de anticuerpo scFV.

Los anticuerpos de la invención pueden portar una etiqueta detectable o funcional.

15 En otros aspectos, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo del primer, segundo, tercer o cuarto aspectos de la invención, y los métodos para preparar los anticuerpos de la invención que comprende expresar dichos ácidos nucleicos bajo condiciones para provocar la expresión de dicho anticuerpo, y recuperar el anticuerpo.

20 Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden usarse en un método de tratamiento, prevención o diagnóstico del cuerpo animal o humano, tal como un método de tratamiento de un trastorno proliferativo tal como un tumor en un paciente (preferentemente un humano) que comprende administrar a dicho paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención. La invención proporciona además un anticuerpo de la presente invención para su uso en medicina, así como el uso de un anticuerpo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el diagnóstico o tratamiento de un trastorno proliferativo tal como un tumor.

25 Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden usarse además en un método de tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo en un paciente (preferentemente un humano) que comprende administrar a dicho paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo de la invención. La invención además proporciona el uso de un anticuerpo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio.

30 El término "anticuerpo" como se utiliza en la presente se refiere a las moléculas de inmunoglobulinas y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que específicamente unen un antígeno, ya sea natural o producido sintéticamente en parte o completamente. El término cubre también cualquier polipéptido o proteína que tiene un dominio de unión que es, o es homólogo a, un dominio de unión de anticuerpo. Estos se pueden derivar de fuentes naturales, o pueden producirse sintéticamente en parte o completamente. Los ejemplos de anticuerpos son los fragmentos que comprenden un dominio de unión al antígeno tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; y diacuerpos.

35 Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Preferentemente el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y puede referirse en la presente descripción como "mab".

40 Es posible aceptar anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que conservan la especificidad del anticuerpo original. Estas técnicas pueden implicar introducir ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las regiones de determinación de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo a las regiones constantes, o regiones constantes más regiones de marco, de una inmunoglobulina diferente. Ver, por ejemplo, EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo puede estar sujeta a mutación genética u otros cambios, que pueden o no alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

45 Como los anticuerpos pueden modificarse en un número de formas, el término "anticuerpo" se debe interpretar como que cubre cualquier anticuerpo o sustancia que tiene un dominio de unión con la especificidad requerida. Así, este término cubre los fragmentos de anticuerpo, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, anticuerpos humanizados, que incluyen cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión de inmunoglobulina, natural o sintético completamente o en parte. Las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido se incluyen por lo tanto. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en EP-A-0120694 y EP-A-0125023. Un anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo modificado que tiene las regiones variables de un anticuerpo no humano, por ejemplo murino, y la región constante de un anticuerpo humano. Los métodos para preparar anticuerpos humanizados se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5225539 Se demostró que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unir los antígenos. Los ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste

5 en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. y otros, Nature 341: 544-546 (1989)) que consiste de un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) F (ab')<sub>2</sub> un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv de cadena simple (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL se unen por un enlazador péptido que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird y otros, Science 242: 423-426 (1988); Huston y otros, PNAS USA 85: 5879-5883 (1988)); (viii) dímeros Fv biespecíficos de cadena simple (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por la fusión de genes (W094/13804; P. Hollinger y otros, Proc. Natl Acad Sci., Estado Unidos 90: 6444-644848 (1993)).

10 Los diacuerpos son multímeros de polipéptidos, cada polipéptido comprende un primer dominio que comprende una región de unión de una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, los dos dominios se enlazan (por ejemplo por un enlazador peptídico) pero son incapaces de asociarse entre sí para formar un sitio de unión al antígeno: los sitios de unión al antígeno se forman por la asociación del primer dominio de un polipéptido dentro del multímero con el segundo dominio de otro polipéptido dentro del multímero (W094/13804).

15 Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos multiespecíficos que tienen especificidad por al menos dos antígenos diferentes. Mientras que dicha molécula se une generalmente a dos antígenos (es decir, anticuerpo biespecífico), el término "anticuerpo multiespecífico" en la presente invención incluye un anticuerpo que tiene especificidad por dos o más (tal como tres) antígenos. El anticuerpo multiespecífico puede ser un anticuerpo completo o un fragmento de dicho anticuerpo (por ejemplo anticuerpo biespecífico F(ab')<sub>2</sub>). Donde los anticuerpos biespecíficos deben ser usados, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden fabricarse de diversas maneras (Hollinger & Winter, Current Opinion Biotechnol. 4: 446-449 (1993)), por ejemplo preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o puede ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecífico mencionado anteriormente. Puede ser preferible usar dímeros scFv o diacuerpos en lugar de anticuerpos completos. Los diacuerpos y los scFv se pueden construir sin región Fc, usando sólo dominios variables, lo que podría reducir los efectos de la reacción anti-idiotipo. Otras formas de anticuerpos biespecíficos incluyen los "Janusins" de simple cadena descritos en Traunecker y otros, EMBO Journal 10: 3655-3659 (1991). El anticuerpo biespecífico además incluye un anticuerpo heteroconjugado en el cual un anticuerpo se acopla a avidina y el otro se acopla a biotina (patente de los Estados Unidos núm. 4,676,980, WO 91/00360.WO 92/200373yEP 03089). Un agente de entrecruzamiento, que se usa en la producción de dicho anticuerpo heteroconjugado se conoce bien, y se describe en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 4,676,980.

20 Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos completos biespecíficos, también pueden ser útiles, ya que se pueden construir fácilmente y expresar en E. coli. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpos) de especificidades de unión adecuadas, se pueden seleccionar fácilmente mediante el uso de una exposición en fagos(W094/13804) a partir de genotecas. Si uno de los brazos del diacuerpo se mantiene constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el antígeno X, entonces, se puede hacer una genoteca donde el otro brazo es muy variado y se selecciona un anticuerpo de apropiada especificidad.

25 Un "dominio de unión al antígeno" o "dominio de unión" es la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria a parte o todo de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo sólo se puede unir a una parte específica del antígeno, cuya parte se denomina epítipo. Un dominio de unión al antígeno puede ser proporcionado por uno o más dominios variables de anticuerpos. Un dominio de unión de antígeno puede comprender una región variable de la cadena ligera del anticuerpo (VL) y una región variable de la cadena pesada del anticuerpo (VH).

30 "Aislado" se refiere al estado en el cual los anticuerpos de la invención o el ácido nucleico que codifica tales anticuerpos estarán preferentemente, de acuerdo con la presente invención. Los anticuerpos y el ácido nucleico generalmente estarán libres o sustancialmente libres del material con que se asocia naturalmente tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su ambiente natural, o el medio ambiente en el que se preparan (por ejemplo cultivos de células) cuando la preparación se realice por la tecnología del ADN recombinante que se practica in vitro o in vivo. Los anticuerpos y el ácido nucleico se pueden formular con diluyentes o adyuvantes y todavía, a efectos prácticos aislar, por ejemplo, los anticuerpos normalmente se mezclan con la gelatina u otros portadores si se usan para cubrir las placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclan con diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables cuando se usan en el diagnóstico o tratamiento. Los anticuerpos pueden estar glicosilados, ya sea naturalmente o por sistemas de células eucarióticas heterólogas, o pueden estar (por ejemplo si se producen por la expresión en una célula procariótica) sin glicosilar.

35 Por "sustancialmente como se representa" se entiende que la secuencia de aminoácido del dominio de unión será idéntica o altamente homóloga a la secuencia de aminoácido representada en la secuencia de aminoácido mostrada en la Figura 1 a d, Figura 2a a d o Figura 3 a 10.

Por "altamente homólogo" se contempla que la secuencia de aminoácido tenga al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácido representada en la Figura 1 a a d, Figura 2a a d o Figura 3 a 10. Preferentemente la secuencia de aminoácido tendrá al menos 80% de identidad, con mayor preferencia 80% de identidad a y con mayor preferencia al menos 90% de identidad a y aún con mayor preferencia al menos 95% de identidad por ejemplo 98% de identidad a la secuencia de aminoácido representada en la Figura 1a a d, Figura 2a a d o Figura 3 a 10.

Como se usa en la presente, "tratamiento" incluye cualquier régimen que pueda beneficiar a un humano o animal no humano, preferentemente un mamífero. Los mamíferos, aves y otros animales pueden tratarse incluyendo perros, gatos y ganado, tales como caballos, vacas y ovejas. El tratamiento puede ser con respecto a una afección existente o puede ser profiláctico (tratamiento preventivo).

Como se usa en la presente, un "tumor" es un crecimiento anormal de tejido. Se puede localizar (benigno) o invadir tejidos cercanos (malignos) o tejidos distantes (metastásicos). Los tumores incluyen crecimientos neoplásicos que causan cáncer e incluyen tumores de esófago, colorrectal, gástrico, mama y endometrial; así como tejidos cancerosos o líneas celulares que incluyen, pero no se limita a, células de leucemia. Como se usa en la presente, "tumor" incluye además dentro de su alcance la endometriosis. Los ejemplos de tumores que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen tumores de la piel, pulmón, mediastino, pericardio, próstata, mama, colon y recto, hígado, páncreas, cerebro, estructuras intracraniales, ojo, testículo, ovario, útero, cuello uterino, riñón, tiroide, vejiga, tracto gastrointestinal, tejido hematológico, hueso, articulaciones o colon.

Como se usa en la presente, un "trastorno inflamatorio" incluye trastornos seleccionados del grupo que consiste de aterosclerosis, artritis reumatoide, osteoartritis gotosa; lupus eritematoso, escleroderma, síndrome de Sjorgen, poli- y dermatomiositis, vasculitis, tendonitis, sinovitis, endocarditis bacteriana, osteomielitis, psoriasis, pneumonia, alveolitis fibrosante, bronquitis crónica, bronquiectasis, efisema, silicosis, pneumoconiosis, tuberculosis, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, esclerosis múltiple, síndrome Guillán-Barre y miastemia gravis, mastitis, laminitis, laringitis, coticistitis crónica, tiroiditis de Hashimoto, síndrome del túnel carpiano y enfermedad inflamatoria de las mamas. En una modalidad, el trastorno inflamatorio puede ser el resultado de rechazo del tejido u órgano después del trasplante. En modalidades particulares el trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste de aterosclerosis, artritis reumatoide, osteoartritis, sepsis y poliartritis.

La invención incluye además dentro de su alcance los polipéptidos con una secuencia de aminoácido como se expone en la Figura 1a-d o 2a-d, los polipeptidos con una secuencia de aminoácido como se expone en la Figura 1a-d o 2a-d y secuencias que tienen identidad sustancial a estas, por ejemplo, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad a estas. El por ciento de identidad de dos secuencias de aminoácido se determina generalmente mediante la alineación de las secuencias para propósitos de comparación óptimos (por ejemplo pueden introducirse interrupciones en la primera secuencia para la mejor alineación con la segunda secuencia) y comparando los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las correspondientes posiciones. La "mejor alineación" es una alineación de dos secuencias que resulta en el más alto por ciento de identidad. El por ciento de identidad se determina comparando el número de residuos de aminoácidos o nucleótidos idénticos dentro de la secuencia (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/total del número de posiciones x 100).

La determinación del por ciento de identidad entre dos secuencias puede realizarse usando un algoritmo matemático conocido por aquellas personas con experiencia en la materia. Un ejemplo de un algoritmo matemático para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl Acad Sci., Estados Unidos 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl Acad Sci., Estados Unidos 90: 5873-5877. Los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, y otros (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 han incorporado dicho algoritmo. Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótido homólogas a unas moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteína BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a unas moléculas de proteína de la invención. Para obtener las alineaciones de interrupción para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul y otros (1997) (Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Como alternativa, PSI-Blast puede usarse para realizar una búsqueda repetida que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de las secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). El programa ALIGN versión 2.0) que es parte del paquete de programa de alineación de secuencia GCG tiene incorporado dicho algoritmo.

Otros algoritmos para el análisis de secuencias conocidos en la materia incluyen ADVANCE y ADAM como se describen en Torellis y Robotti (1994) Comput. Appl. Biosci., 10 :3-5; y FASTA descritos en Pearson y Lipman (1988)

Proc. Natl Acad Sci., 85: 2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y velocidad de la búsqueda.

5 La invención incluye además dentro de su alcance un anticuerpo que comprende un dominio de unión cuyo dominio de unión comprende una secuencia de aminoácido seleccionada de las secuencias de aminoácidos representadas por la Figura 1a a d o 2a a d, o una variante de las mismas en donde dicha variante de secuencia se alteró por la adición, sustitución o delección de al menos un residuo de aminoácido sin afectar sustancialmente la función biológica del anticuerpo.

10 La(s) "variante(s)" de polipéptidos como se usa en la presente incluyen polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de referencia. Generalmente, las diferencias se limitan de manera que las secuencias de la referencia y la variante son estrechamente similares y, en muchas regiones, idénticas. Una variante de polipéptido puede diferir en la secuencia de aminoácidos por una o más sustituciones, adiciones, delecciones, truncamientos que pueden estar presentes en cualquier combinación. Entre las variantes preferidas están aquellas que varían por sustituciones conservativas de los aminoácidos de un polipéptido de referencia. Tales sustituciones son aquellas que sustituyen un aminoácido dado por otro aminoácido de características similares. La siguiente lista no limitativa de aminoácidos se consideran reemplazos conservadores (similares): a) alanina, serina, y treonina; b) ácido glutámico y ácido aspártico; c) asparagina y glutamina d) arginina y lisina; e) isoleucina, leucina, metionina y valina y f) fenilalanina, tirosina y triptófano.

20 Una modalidad de la invención proporciona anticuerpos que comprenden un par de dominios de unión basados en las secuencias de aminoácidos para las regiones VH y VL sustancialmente como se expone en las Figuras 1a-d y 2a-d respectivamente. Los dominios de unión simples basados en cualquiera de estas secuencias forman aspectos adicionales de la invención. En el caso de los dominios de unión basados en la secuencia de aminoácidos de la región VH sustancialmente expuesta en la Figura 1a-d, dichos dominios de unión pueden usarse como agentes dirigidos puesto que se conoce que los dominios VH de inmunoglobulina son capaces de unir antígenos objetivos en una manera específica.

25 En el caso de cualquiera de los dominios de unión específicos de simple cadena, estos dominios pueden usarse para detectar los dominios complementarios capaces de formar un anticuerpo de dos dominios que tiene propiedades in vivo tan buenas como igual a los anticuerpos monoclonales descritos en la presente.

30 Esto se puede lograr por métodos de detección de fagos expuestos mediante el uso del llamado doble enfoque combinatorio jerárquico como se describe en W092/01047 en el cual una colonia individual que contiene ya sea un clon de cadena H o L se usa para infectar una genoteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el anticuerpo de dos cadenas resultante se selecciona de acuerdo con las técnicas de exposición de fagos tales como aquellas que se describen en esa referencia. Esta técnica también se describe en Marks y otros. *ibid*.

35 Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender además regiones constantes de anticuerpos o partes de los mismos. Por ejemplo, los anticuerpos basados en la región VL mostrada en la Figura 2a-d puede unirse en su extremo C-terminal a los dominios constantes de la cadena ligera del anticuerpo incluyendo las cadenas Ck o C#. De forma similar, los anticuerpos basados en la región VH mostrada en la Figura 1a-e pueden unirse en su extremo C-terminal a toda o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada a partir de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las sub-clases de isotipos.

40 Aunque los anticuerpos de la invención en sí mismos demostraron ser efectivos en la prevención de la proliferación celular del cáncer, pueden ser marcadas adicionalmente con una etiqueta funcional. Las etiquetas funcionales incluyen sustancias que se diseñan para ser dirigidas al sitio del cáncer para causar la destrucción del mismo. Dichas etiquetas funcionales incluyen toxinas tales como ricina y enzimas tales como carboxipeptidasa y nitrorreductasa bacteriana, que son capaces de convertir los profármacos en fármacos activos. Adicionalmente, los anticuerpos pueden unirse o de cualquier otra forma asociarse con agentes quimioterapéuticos o citotóxicos, tales como la caliqueamicina, o radiomarcadores, tal como 90 Y o 11.

45 En una modalidad, el anticuerpo de la invención es capaz de inhibir la proliferación de una célula de adenocarcinoma humana (SW-13) en al menos 10%, en donde dicha inhibición se mide usando el ensayo de Proliferación Celular MTT. Preferentemente, el anticuerpo es capaz de modular por ejemplo interferir con, la interacción de RAMP-3 y CRLP.

50 Típicamente, el anticuerpo es capaz de inhibir la proliferación en al menos 12%. En algunas modalidades, el anticuerpo puede ser capaz de inhibir la proliferación en al menos 20% y opcionalmente al menos 25%. En una modalidad adicional, el anticuerpo puede ser capaz de inhibir la proliferación en al menos 30% y más aún opcionalmente al menos 40%.

55 En una modalidad, el anticuerpo es capaz de reducir o inhibir la producción de cAMP en una célula de osteosarcoma

humana MG63, cuando se estimula por adrenomedulina, en al menos aproximadamente 15%, por ejemplo al menos 15%, 16%, 17%, 18% y 19%. En algunas modalidades, el anticuerpo puede ser capaz de inhibir la producción de cAMP en al menos aproximadamente 20% por ejemplo 21%, 22% o 25%. Típicamente, el anticuerpo es capaz de modular una interacción de RAMP-3 y CRLP.

5 Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse completamente o parcialmente por síntesis química. Los anticuerpos pueden prepararse fácilmente de acuerdo con métodos de síntesis de péptidos preferentemente en fase sólida, o líquida estándar bien establecidos, cuyas descripciones generales se encuentran ampliamente disponibles (ver, por ejemplo, en J. M. Stewart y J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2da edición, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (1984), en M. Bodanzsky y A. Bodanzsky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Nueva York (1984); y *Applied Biosystems 430A Users Manual*, ABI Inc., Foster City, California), o pueden prepararse en solución, por el método de la fase líquida o por cualquier combinación de fase sólida, fase líquida y química de las soluciones, por ejemplo completando primero la respectiva porción de v y después, si se desea y es adecuado, después de eliminar cualquier grupo protector que esté presente, por la introducción del residuo X por reacción del ácido carbónico o sulfónico respectivo o un derivado reactivo de este.

Otra manera conveniente de producir un anticuerpo de acuerdo con la presente invención es expresar el ácido nucleico que lo codifica, mediante el uso del ácido nucleico en un sistema de expresión.

20 La presente invención proporciona, además, un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de la presente invención. El ácido nucleico incluye ADN y ARN. Otra manera conveniente de producir un anticuerpo de acuerdo con la presente invención es expresar el ácido nucleico que lo codifica, mediante el uso del ácido nucleico en un sistema de expresión. Ejemplos de dichos ácidos anticuerpos son mostrados en las Figuras 1a-d y 2a-d. La persona con experiencia será capaz de determinar las sustituciones, deleciones y/o adiciones a dichos ácidos nucleicos que aún proporcionarán un anticuerpo de la presente invención.

La presente invención proporciona también los constructos en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o de expresión que comprenden al menos un ácido nucleico como el descrito anteriormente. La presente invención proporciona además una célula hospedera recombinante que comprende uno más constructos tal como se describió anteriormente. Como se mencionó, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención forma un aspecto de la presente invención, como lo hace un método de producción del anticuerpo cuyo método comprende por lo tanto la expresión a partir del ácido nucleico que lo codifica. La expresión se puede lograr convenientemente mediante el cultivo en condiciones adecuadas de células hospederas recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión, un anticuerpo se pueden aislar y/o purificar mediante cualquier técnica adecuada, que se usa según corresponda.

Se conocen bien los sistemas de clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células hospederas diferentes. Las células huésped incluyen bacteria, células de mamífero, levadura y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamíferos disponibles en la materia para la expresión de polipéptidos heterólogos incluyen las células de ovario de hámster Chino, células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido, células de melanoma de ratón NSO y muchas otras. Un huésped bacteriano preferido, común es *E. coli*. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariontas, tal como *E. coli*, está bien establecida en la materia. Para una revisión, ver por ejemplo Pluckthun, *Biol Technology* 9: 545-551 (1991). La expresión en células eucarióticas en cultivo está disponible además para aquellos con experiencia en la materia como una opción para la producción de un anticuerpo, ver para revisión reciente, por ejemplo Reff, *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576 (1993); Trill y otros, *Curr. Opinion Biotech.* 6: 553- 560 (1995).

Los vectores adecuados se pueden elegir o construir, que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según proceda.

Los vectores pueden ser plásmidos, viral, por ejemplo, fago, o fagómido, según sea adecuado. Para más detalles ver, por ejemplo, Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual: 2da Edición*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Muchas técnicas conocidas y protocolos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en las células y expresión génica y análisis de las proteínas, se describen en detalle en Ausubel y otros eds., *Short Protocols in Molecular Biology*, 2da Edición, John Wiley & Sons (1992).

Así, otro aspecto de la presente invención proporciona una célula hospedera que contiene el ácido nucleico, como se describe en la presente. Un aspecto adicional proporciona un método que comprende introducir dicho ácido nucleico en una célula hospedera. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción mediante el uso de retrovirus u otros virus, por

ejemplo, vaccinia o, en células de insecto, baculovirus. Para las células bacterianas, las técnicas apropiadas pueden incluir la transformación con cloruro de calcio, la electroporación y la transfección mediante el uso de bacteriófagos. La introducción se puede seguir por originar o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, mediante el cultivo de las células hospederas en las condiciones para la expresión del gen.

5 En una modalidad, el ácido nucleico de la invención se integra en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula huésped. La integración se puede promover mediante la infusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándares.

10 La presente invención también proporciona un método que comprende usar un constructo como se el mencionado anteriormente en un sistema de expresión con el fin de expresar un anticuerpo o polipéptido como se describe anteriormente.

**Métodos de diagnóstico**

15 Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en los métodos de diagnóstico de tumores en sujetos humanos o animales.

20 Los genes que codifican las RAMP muestran expresión elevada en el tejido específico de cáncer. La expresión de RAMP puede detectarse en un tejido o célula usando el anticuerpo de la presente invención en un método tal como inmunoelectrotransferencia, el método de ELISA o tinción histológica. Una muestra (tal como muestra para biopsia o muestra de sangre) derivada de tejido de un sujeto se pone en contacto con un anticuerpo de la presente invención en condiciones para formar un complejo inmune. La presencia o la cantidad de RAMP en la muestra puede determinarse mediante la determinación de si la muestra se une al anticuerpo. De esta manera, se puede llevar a cabo el diagnóstico del cáncer, monitoreo del progreso o cura del cáncer, y la predicción del pronóstico.

25 En una modalidad la invención proporciona un método *in vitro* para detectar la presencia de un tumor o trastorno inflamatorio en una muestra biológica, que comprende las etapas de contactar la muestra biológica con un anticuerpo de la invención y detectar la unión aumentada del anticuerpo en relación con aquella detectada en un control negativo o en una muestra biológica de un sujeto normal saludable.

30 La invención proporciona además el uso de un anticuerpo de la invención en un método de diagnóstico in vivo. En una modalidad la invención proporciona un método para detectar la presencia de un tumor o trastorno inflamatorio en un sujeto, que comprende las etapas de administrar a dicho sujeto el anticuerpo de la invención y detectar la unión aumentada del anticuerpo en relación con aquella detectada en un control negativo o en un sujeto normal saludable.

35 Los anticuerpos pueden marcarse o conjugarse a otras moléculas para ayudar la imagen diagnóstica u otra detección. Por ejemplo, el anticuerpo radiomarcado con yodo 123 puede producirse para la detección por gammagrafía con tomografía por emisión de fotón simple con tomografía computarizada (SPECT/CT). Tales métodos pueden combinarse con otras técnicas de diagnóstico e imagen donde por ejemplo, puede realizarse la tomografía de emisión de positrón 18F-fluorodeoxiglucosa (18FDG) con tomografía computarizada (PET/CT). Estas técnicas son conocidas por aquellos con experiencia en la materia, y se ejemplifican en Birchler y otros, Otolaryngology - Head and Neck Surgery, Volumen 136, Número 4, Páginas 543-548).

40 En otra modalidad la invención proporciona un método para monitorear en un sujeto la progresión de un tumor o trastorno inflamatorio de un régimen terapéutico, que comprende las etapas de aislar una muestra biológica de un sujeto, contactar la muestra biológica con el anticuerpo de la invención y detectar la unión aumentada del anticuerpo en relación con aquella detectada en un control negativo o en una muestra biológica de sujeto normal saludable. En otra modalidad la invención proporciona un método para monitorear en un sujeto la progresión de un tumor o trastorno inflamatorio de un régimen terapéutico, que comprende las etapas de administrar a dicho sujeto un anticuerpo de la invención y detectar la unión aumentada del anticuerpo en relación con aquella detectada en un control negativo o en un sujeto normal saludable.

45 En otra modalidad la invención proporciona un método para monitorear en un sujeto la progresión de un tumor o trastorno inflamatorio de un régimen terapéutico, que comprende las etapas de administrar a dicho sujeto un anticuerpo de la invención y detectar la unión aumentada del anticuerpo en relación con aquella detectada en un control negativo o en un sujeto normal saludable.

50 La muestra biológica que se prueba puede incluir cualquier tejido de un sujeto tal como tejido para biopsia (por ejemplo tejido de tumores tales como los descritos en la presente o fluido del cuerpo (por ejemplo sangre). Cuando se usa en el diagnóstico, los anticuerpos pueden marcarse con una etiqueta detectable, por ejemplo, un radiomarcador tal como I o 99Tc, que puede unirse a los anticuerpos de la invención usando química convencional conocida en la materia de la imagimática del anticuerpo. Las etiquetas incluyen además etiquetas de enzimas tales como la peroxidasa de rábano picante. Las etiquetas incluyen, además, fracciones químicas, tales como biotina que se pueden detectar a través de la unión a una fracción específica detectable afin, por ejemplo, etiqueta de avidina.

**Productos. Composiciones farmacéuticas y usos terapéuticos**

Los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse solos o en conjunto con otros tratamientos, tanto simultáneamente o secuencialmente, dependiendo de la afección a tratar. Así, la presente invención proporciona además productos que contienen un anticuerpo de la presente invención y un agente activo como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento del tumor. Los agentes activos pueden incluir agentes quimioterapéuticos o citotóxicos que incluyen, 5-Fluorouracilo, cisplatino, Mitomicina C, oxaliplatino y tamoxifeno, que pueden operar sinérgicamente con los anticuerpos de la presente invención. Otros agentes activos pueden incluir dosis adecuadas de fármacos de alivio al dolor tales como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (por ejemplo aspirina, paracetamol, ibuprofeno o cetoprofeno) u opiáceos tales como morfina, o anti-eméticos.

Aunque no se desea estar limitado por la teoría, la capacidad de los anticuerpos de la invención para sinergizar con un agente activo para aumentar la aniquilación del tumor puede no ser debido a los mecanismos efectores inmunes sino más bien puede ser una consecuencia directa de la unión del anticuerpo a RAMP de la superficie de la célula.

Los anticuerpos de la presente invención por lo general se administran en forma de una composición farmacéutica, la cual puede comprender por lo menos un componente además del anticuerpo. La composición farmacéutica puede comprender, además del ingrediente activo, un excipiente farmacéuticamente aceptable, diluyente, portador, amortiguador, estabilizador u otros materiales bien conocidos por aquellos con experiencia en la materia. Estos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la ruta de administración, que puede ser oral o por inyección, por ejemplo, intravenosa.

Se prevé que las inyecciones sistémicas por rutas normales (tales como intravenosa, intra-arterial, peritoneal, inyección intramuscular o subcutánea) serán las rutas primarias para la administración terapéutica de las composiciones aunque la entrega local por inyección local o a través de un catéter u otro tubo quirúrgico puede usarse también como puede la inyección local o infusión por una minibomba de depósito permanente u otro dispositivo de liberación lenta. La administración local puede ser dentro de la masa de tejido patológico o dentro de una cavidad del cuerpo que contiene el tejido objetivo. Los ejemplos de tales cavidades pueden incluir los ventrículos cerebrales, las articulaciones sinoviales o la cavidad pleural. Las formulaciones líquidas pueden ser usadas después de la reconstitución a partir de formulaciones en polvo.

Para la inyección intravenosa o inyección en el sitio de la afección, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa aceptable por vía parenteral que está libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad, y estabilidad adecuados. Aquellos con experiencia relevante en la materia son capaces de preparar soluciones adecuadas mediante el uso de, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como cloruro de sodio para inyección, inyección de Ringer, inyección de lactato de Ringer. Los conservantes, estabilizadores, amortiguadores, antioxidantes y/o otros aditivos pueden incluirse, según se requiera.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en forma de tableta, cápsula, polvo o líquido. Una tableta puede comprender un portador sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un portador líquido, tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético.

Se pueden incluir solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido o glicoles, tales como glicol de etileno, glicol de propileno o glicol de polietileno. Cuando la formulación es un líquido puede ser, por ejemplo, una solución salina fisiológica que contiene un amortiguador no fosfato a pH 6.8-7.6, o un polvo liofilizado.

La composición puede administrarse además a través de microesferas, liposomas, otros sistemas de liberación de micropartículas o formulaciones de liberación sostenida colocadas en determinados tejidos incluyendo la sangre. Los ejemplos adecuados de portadores de liberación sostenida incluyen matrices de polímeros semi-permeables en la forma de artículos compartidos, por ejemplo, supositorios o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida implantables o microcapsulares incluyen poliláctidos (patente de Estados Unidos núm. 3, 773, 919; EP-A-0058481) copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman y otros, Biopolymers 22 (1): 1985), poli (2-hidroxietilo l-metacrilato) o acetato de etilvinilo (Langer y otros, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277, 1981, y Langer, Chem. Tech. 12:98-105, 1982).

Los liposomas que contienen los polipéptidos se preparan por métodos bien conocidos: DE3,218, 121A; Epstein y otros, PNAS USA, 82: 3688-3692, 1985; Hwang y otros, PNAS Estados USA, 77: 4030-4034, 1980; EP-A-0052522; E-A-0036676; EP-A-0088046; EP-A- 0143949; EP-A-0142541; JP-A-83-11808; las patentes de Estados Unidos núms. 4,485,045 y 4,544,545.

Normalmente, los liposomas son del tipo pequeño unilamelar (aproximadamente 200-800 Angstroms) en el que el contenido de lípido es aproximadamente 30 % mol de colesterol, la proporción seleccionada que se ajusta para la velocidad óptima de la pérdida de polipéptido.

La composición puede administrarse de una manera localizada a un sitio del tumor u otro sitio deseado o puede entregarse de una manera en la que se dirige al tumor u otras células.

5 Las composiciones se administran preferentemente a un individuo en una "cantidad terapéuticamente efectiva", siendo suficiente para mostrar beneficio al individuo. La cantidad real administrada, y velocidad y curso del tiempo de administración, dependerá de la naturaleza y gravedad que se trata. La prescripción del tratamiento, por ejemplo decisiones en la dosificación etc., está dentro de la responsabilidad de los médicos generales y otros doctores en medicina y típicamente tiene en cuenta el trastorno que se trata, la afección del paciente individual, el sitio de entrega, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos. Las composiciones de la invención son en particular relevantes para el tratamiento de tumores existentes, especialmente cáncer, y en la prevención de la recurrencia de dichas afecciones después del tratamiento inicial o cirugía. Los ejemplos de técnicas y protocolos mencionados anteriormente pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ta edición, Oslo, A. (ed), 1980.

15 La dosis óptima puede determinarse por los médicos basados en un número de parámetros que incluyen, por ejemplo, edad, sexo, peso, gravedad de la afección que se trata, el ingrediente activo que se administra y la ruta de administración. En general, se desea una concentración de suero de polipéptidos y anticuerpos que permite la saturación de receptores. Una concentración en exceso de aproximadamente 0.1nm es normalmente suficiente. Por ejemplo, una dosis de 100mg/ml de anticuerpo proporciona una concentración de suero de aproximadamente 20nM durante aproximadamente ocho días.

20 La dosis de la composición dependerá de las propiedades del anticuerpo, por ejemplo su actividad de unión y la vida media in vivo en el plasma, la concentración del polipéptido en la formulación, la ruta de administración, el sitio y velocidad de la dosificación, la tolerancia clínica del paciente implicado, la afección patológica que padece el paciente, tal como está adecuadamente dentro de la experiencia del médico. Esta invención se dirige además para optimizar los esquemas de inmunización para mejorar una respuesta inmune protectora contra el cáncer.

25 Un anticuerpo o composición de acuerdo con la invención puede ser útil en el tratamiento, retardo y/o prevención de un trastorno proliferativo tal como un tumor a través de, por ejemplo, la inhibición de la angiogénesis o proliferación celular del cáncer.

30 Los ejemplos específicos de los tumores a tratarse de acuerdo con la invención incluyen tumores de pulmón, intracraneal (incluyendo cerebro) y piel. Los tumores intracraneales preferidos son por ejemplo los tumores de cerebro. Los tumores de pulmón o cáncer se pueden clasificar en carcinoma de células pequeñas, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes, bronquioalveolar, escamoso y carcinoide. Cualquier tumor de pulmón puede tratarse de acuerdo con la invención. Los tumores de piel o cáncer se pueden clasificar en melanoma, escamoso oral y teratocarcinoma. Los tumores intracraneales y cerebrales se pueden clasificar en glioma, glioblastoma, neuroblastoma, adenoma pituitario, somatotropinomas, prolactinomas, meningiomas, astrocitomas y carcinoma del plexo coroide. Los tumores adrenales se pueden clasificar en carcinoma adrenocortical, feocromocitoma, aldosteronoma. El tumor puede ser un tumor ocular.

35 El tumor a tratarse se puede seleccionar del grupo que consiste de osteosarcoma, adenocarcinoma, glioblastoma, tumor de próstata, tumor de pecho y mesotelioma.

40 El tumor a tratarse puede ser un tumor cerebral por ejemplo un glioblastoma.

El tumor a tratarse puede ser un tumor adrenal, por ejemplo, un carcinoma adrenocortical.

45 El tumor a tratarse puede ser mesotelioma.

El tumor a tratarse puede ser un tumor óseo por ejemplo un osteosarcoma.

El tumor a tratarse puede ser un tumor de próstata.

50 El tumor a tratarse puede ser un tumor de mama.

El tumor a tratarse puede ser un tumor de colon

55 En una modalidad, el anticuerpo de la invención útil en el tratamiento de un tumor es un antagonista RAMP (por ejemplo, RAMP 3).

60 Otro trastorno proliferativo a tratarse puede incluir hiperqueratosis.

Un anticuerpo o composición de acuerdo con la invención puede ser útil en el tratamiento, retardo y/o prevención de un trastorno inflamatorio tal como se definió en la presente. En una modalidad, el anticuerpo de la invención útil en el tratamiento de un trastorno inflamatorio es un antagonista RAMP (por ejemplo RAMP 3).

5 Un anticuerpo o composición de acuerdo con la invención puede ser útil en el tratamiento, retardo y/o prevención de una afección cardiovascular a través de, por ejemplo, la promoción de la angiogénesis y vasulogénesis. Los ejemplos específicos de una afección cardiovascular pueden incluir insuficiencia cardíaca, ataque (específicamente la re-vascularización después del ataque), enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad vascular, infarto del miocardio (específicamente la re-vascularización después del infarto del miocardio) y angiopatía diabética y  
10 específicamente la retinopatía. En una modalidad, el anticuerpo de la invención útil en el tratamiento de una afección cardiovascular es un agonista RAMP (por ejemplo RAMP 3).

Un anticuerpo o composición de acuerdo con la invención puede ser útil también en el tratamiento de un trastorno seleccionado a partir de osteoporosis, obesidad, sepsis y heridas. Como se usa en la presente el término "herida" incluye úlceras y lesiones por ejemplo, heridas cutáneas tales como quemaduras, y afecciones asociadas con éstas. El anticuerpo o composición de la invención puede usarse para estimular la proliferación y crecimiento de tejido, tal como curativo de heridas en general. Esto puede incluir el curativo de heridas en la piel después de la cirugía donde un acelerador de la curación posee beneficios, curativo de heridas cutáneas abiertas donde hay pérdida de piel o tejidos, curativo de las úlceras ya sea debido a diabetes, úlceras por presión de pacientes en reposo u otras causas, curativo de la reparación tisular retardada, tal como en el retraso o falta de unión de fracturas óseas, reparación de cartilago y tejidos articulares después de la lesión con o sin cirugía, curativo de las lesiones del tendón, tales como roturas del tendón de Aquiles y lesiones del tendón en los caballos. Otras indicaciones que incluyen el tratamiento de la pérdida de tejido, tal como ocurre en la osteoporosis. En una modalidad, el anticuerpo de la invención útil en el tratamiento de la hipertensión, la obesidad, las heridas y la osteoporosis es un agonista RAMP (por ejemplo, RAMP 3). Como alternativa, el anticuerpo útil en el tratamiento de la osteoporosis puede ser un antagonista RAMP (por ejemplo, RAMP 3).

A través de toda la descripción y reivindicaciones de este documento, las palabras "comprende" y "contiene" y las variaciones de las palabras, por ejemplo "que comprende" y "comprende", significan "que incluyen pero no se limitan a", y no se pretende excluir (y no se excluyen) otras porciones, aditivos, componentes, enteros o etapas.

A través de toda la descripción y reivindicaciones de este documento, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera otra cosa. En particular, donde se use el artículo indefinido en la descripción, se entiende que contempla los plurales así como los singulares, a menos que el contexto requiera otra cosa.

Los rasgos, enteros, características, compuestos, porciones químicas o grupos descritos en conjunto con un aspecto particular, modalidad o ejemplo de la invención se entiende que son aplicables a cualquier otro aspecto, modalidad o ejemplo descrito en la presente a menos que se incompatible con éste.

40 La Figura 1 a - d muestra el ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales anti-RAMP 3;

La Figura 2 a - d muestra el ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de los anticuerpos monoclonales anti-RAMP 3;

45 Las Figuras 3 a 6 muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal anti-RAMP 3;

50 La Figura 7 a 10 muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo monoclonal anti-RAMP 3;

La Figura 11: los anticuerpos policlonales anti-RAMP-3 se ensayaron por su capacidad de regular el efecto de la adrenomedulina para aumentar el AMP cíclico en células de osteosarcoma humano MG63. Todos los anticuerpos redujeron el efecto de la adrenomedulina;

55 La Figura 12: muestra el efecto de los anticuerpos monoclonales en el crecimiento *in vitro* de las células SW-13. Los anticuerpos monoclonales anti-RAMP-3 se probaron por su capacidad de inducir inhibición de la proliferación de SW-13 (células adenocarcinoma). La concentración de 1:50 equivale a aproximadamente 5ng por concentración final de pocillo;

60 La Figura 13: muestra el efecto del anticuerpo monoclonal HB10 sobre el crecimiento *in vitro* de las células U87. Las células tumorales se sembraron a 2000 células, en placas de 96 pocillos, se adicionaron AM a 2x10<sup>-7</sup> y un intervalo

de dosis de anticuerpo. Como controles se adicionó un anticuerpo IgG no mamífero. Este régimen de tratamiento se lleva a cabo cada 2 días. En el día 4 las células se prepararon para ensayo MTT ATTC.

La Figura 14 muestra un ensayo de MTT evaluando la velocidad de proliferación en la línea celular de glioblastoma U-87 en presencia del anticuerpo JF2 en concentraciones variables (después de 8 días de cultivo).

5 La Figura 15 muestra un ensayo de MTT evaluando la velocidad de proliferación en la línea celular de glioblastoma U-87 en presencia del anticuerpo JB3 en concentraciones variables (después de 8 días de cultivo).

10 La Figura 16 muestra un ensayo de MTT evaluando la velocidad de proliferación de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-436-GFP en presencia del anticuerpo JB3 a diferentes concentraciones (después de 8 días de cultivo).

15 La Figura 17 muestra un ensayo de MTT evaluando la velocidad de proliferación de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-436-GFP en presencia del anticuerpo JF2 a diferentes concentraciones (después de 8 días de cultivo).

La Figura 18 muestra un ensayo de MTT evaluando la velocidad de proliferación en la línea celular de cáncer de próstata PC-3 en presencia del anticuerpo JB3 a una concentración de 10µg (después de 8 días de cultivo).

20 La Figura 19 muestra un ensayo de MTT evaluando la velocidad de proliferación en la línea celular de cáncer de próstata PC-3 en presencia del anticuerpo JF2 a una concentración de 10µg (después de 8 días de cultivo).

La Figura 20 muestra un ensayo de MTT evaluando la velocidad de proliferación de la línea celular de osteosarcoma SAOS en presencia del anticuerpo JB3 a una concentración de 10µg (después de 8 días de cultivo).

25 La Figura 21 muestra un ensayo de MTT evaluando la velocidad de proliferación en la línea celular de cáncer de colon HCT116 en presencia de anticuerpos JB3 y JF2 a una concentración de 10µg (después de 8 días de cultivo).

30 La Figura 22 muestra un ensayo de apoptosis evaluando los niveles de caspasa-3, un marcador en línea celular de glioblastoma U-87 en presencia de anticuerpos JB3 y JF2.

La Figura 23 muestra un ensayo de apoptosis evaluando los niveles de caspasa-3 un marcador en línea celular de cáncer de mama MDA-MB-436-GFP en presencia de anticuerpos JB3 y JF2.

35 La Figura 24 representa el volumen tumoral de MDA-MB-436-GFP que se inyecta en el flanco derecho de ratones desnudos CD1, tratados con el anticuerpo JF2 y controles durante un período de 6 semanas.

La Figura 25 representa los pesos tumorales de MDA-MB-436-GFP que se inyectan en el flanco derecho de ratones desnudos CD1, tratados con el anticuerpo JF2 y controles durante un período de 6 semanas.

40 La Figura 26 muestra la fluorescencia de las líneas celulares de cáncer MDA-MB-436-GFP que se inyectan en el flanco derecho de ratones desnudos

La Figura 27 muestra los cortes histológicos de tumores extraídos de ratones desnudos después de 6 semanas de tratamiento.

45 EJEMPLOS - La invención se describe con detalle en el siguiente ejemplo no limitativo:

50 **Materiales y métodos**

**Generación de la proteína RAMP de Dominio Extracelular (ECD)**

55 Las regiones ECD de la RAMP se generaron usando una reacción de PCR de alta fidelidad mediante el estuche de ADN polimerasa de KOD Hot Start de Novagen Toyobo. El ADN molde se obtuvo a partir de una muestra adquirida de ADNc de cerebro humano (Ambion).

Esta reacción se llevó a cabo dos veces, la primera reacción se llevó a cabo para aislar una región más grande que la ECD RAMP completa usando los siguientes cebadores:

60 **RAMP1**

**Directo**  
CGAGCGGACTCGACTCGGCAC

**Inverso**

CTTCCTAGGGTGGCGGTGGCC

**RAMP2**

5

**Directo**

GTC CGC CTC CTC CTT CT GCT

**Inverso**

AAG TGG AGT AAC ATG GTT ATT GT

10

**RAMP3**

**Directo**

AGC CAT GGA GAC TGG AGC GCT GC

**Inverso**

15 GTG GCC CAG TAG CTG GAG ATT GGC

La segunda reacción de PCR usa los productos a partir de la reacción con los cebadores anteriores. Usando los cebadores más abajo estos cebadores tuvieron sitios de restricción de EcoR1 y BamH1 incorporados en ellos:

20

**RAMP1**

**Directo**

GCGAATTCCTGCCAGACCACCAG

**Inverso**

25 GTGGATCCTACCGGGCCCGGGACA

**RAMP2**

**Directo**

30 GCG **AAT TCA** ATC CCC ACG AGG CCC TGG CTC AGC C

**Inverso**

CAG **GAT CCTACA** AGA GTG ATG AGG AAG GGG ATG

**RAMP3**

35

**Directo**

CAG **AATT TCC** AGA GCA GGC CGC TGC AAC CAG ACA G

**Inverso**

40 GTG **GAT CCC** ACC ACC AGG CCA GCC ATG GCG ACA GT

La secuenciación genómica del producto se realiza para probar el producto de manera concluyente. La proteína ECD desde este punto en adelante se denominará como "el inserto" a menos que se indique otra cosa.

**Purificación de la proteína**

45

Los péptidos ECD se expresaron y purificaron. La proteína se purificó utilizando el sistema de fusión génica de glutatión S-transferasa (GST).

**Generación del anticuerpo.**

50

Los anticuerpos para los péptidos ECD se generaron usando el siguiente protocolo.

**PROCOLO DE INMUNIZACIÓN DE RATÓN Y RATA.**

55

El protocolo de inmunización a continuación se siguió para generar anticuerpos contra el dominio extracelular RAMP-3:

El suero pre-inmune se tomó de los ratones previo a la inmunización. Cuatro ratones se inyectaron con un péptido correspondiente a un dominio extracelular RAMP-3:

10 20 30 40 50 60  
 GCPRAGGCNE TGMLERLPLC GKAFADMMGK VDVWKWCNLS EFIVYYESFT  
 NCTEMEANVV  
 70 80 90 99  
 GCYWPNPLAQ GFITGIHRQF FSNCTVDRVH LEDPPDEVL

5 Las inyecciones se reforzaron con 4 inyecciones adicionales, aproximadamente a intervalos mensuales. Las muestras de sangre de los ratones se tomaron para aislar el suero que contiene los anticuerpos policlonales. El adyuvante utilizado fue Freund (completo para la primera inyección, seguido por incompleto para el resto del recorrido). El volumen total que se puede inyectar en roedores es 0.2 ml (y preferentemente no más de 0.1 ml para los ratones). La mitad será antígeno y la otra mitad adyuvante por lo tanto, el antígeno debe ser de concentración suficiente para proporcionar el número de miligramos requeridos en un máximo inyectado de 0.1 ml ó 0.05 ml.

#### Protocolo de Transferencia tipo Western

15 Las transferencias de los anticuerpos se usaron para probar las membranas del péptido ECD original ejecutado en carriles duplicados con un marcador de tamaño. Los anticuerpos 1 y 2 muestran claramente la unión a las bandas de proteína en el tamaño esperado de 14kDa (datos no mostrados). El anticuerpo 3 muestra la unión muy fuerte en el mismo tamaño, mientras que AB4 no se detectó en este experimento (datos no mostrados).

#### Potencial de bloqueo del anticuerpo.

20 Para probar la capacidad de los anticuerpos de unirse a RAMP, se llevaron a cabo los ensayos para determinar el potencial de bloqueo de los anticuerpos:

- Las células humanas de osteosarcoma MG63 se trataron con 10pmol de AM y midió la respuesta de AMPc (método según se indicó anteriormente por ejemplo, usando el Inmunoensayo de Polarización Fluorescente Bluetrak para AMPc (FP) (Amersham Biosciences)). (Si se están probando agentes RAMP-1, este ensayo puede llevarse a cabo también usando CGRP como un ligando para probar la capacidad de bloqueo de los agentes)
- Las células se trataron previamente con el anticuerpo durante 1 hora
- Una dosis EC<sub>60</sub> de AM (10pmol) se aplicó y midió la respuesta de AMPc.

30 Los policlonales se usaron para probar su capacidad de regular el efecto de la adrenomedulina para aumentar el AMP cíclico en las células de osteosarcoma humano MG63.

#### Producción de anticuerpos monoclonales

35 Los anticuerpos monoclonales se produjeron usando el 3<sup>er</sup> ratón. Los métodos usados para producir los anticuerpos monoclonales se describen por Kohler y Milstein en Nature 256, 495-497 (1975) y también por Donillard y Hoffman, "Basic Facts about Hybridomas" en Compendium of Immunology V.II ed. de Schwartz, 1981.

40 Los clones se detectaron y seleccionaron en función de la no unión de la etiqueta GST en el péptido. De estos clones, se obtuvieron los datos del ELISA y los 5 mejores se seleccionaron para trabajo adicional

#### Isotipaje de anticuerpo

45 La caracterización de isotipo del anticuerpo monoclonal se determinó utilizando el estuche de isotipaje, IsoStrip (Roche Diagnostics GmbH).

Los isotipos de los anticuerpos monoclonales son los siguientes:

- 50 subtipo IgG1-IgG-CD12
- subtipo IgG1-IgG-HB10
- subtipo IgG1-IgG-JF2
- IgM-JB3
- IgA-CC2

55

#### Ensayos de proliferación

#### Cultivo de células

El cultivo celular se llevó a cabo bajo condiciones asépticas en plásticos de cultivo de tejidos tratados con Nunclon. Las células de glioblastoma U-87 (ATCC noHTB-14) usadas para este proyecto se cultivaron en EMEM estándar (Medio Esencial Mínimo de Eagle) (Gibco) con suero fetal bovino (Gibco) al 10% y antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma) al 5%. Las células congeladas se descongelaron a 37° C durante 2 minutos. Las células se transfirieron inmediatamente después al frasco de 75cm<sup>2</sup> con 10 ml de medio. El cultivo se incubó a 37° C con CO<sub>2</sub> al 5% hasta alcanzar confluencia. El medio se cambió cada tres días y las células se subcultivaron entonces después de alcanzar 80-90% de confluencia. Las células se lavaron con PBS (Gibco) para eliminar el suero presente, debido a que actúa como un inhibidor para la tripsina. Se adicionaron 3 ml de tripsina EDTA al 10% (Sigma) para eliminar la capa de células del frasco. Se permitió que la tripsinización ocurriera durante 15 minutos a 37° C para facilitar la dispersión. El frasco se observó bajo un microscopio para confirmar que las células se soltaron del frasco. Se adicionaron 6-8 ml del medio al frasco y las células se aspiraron suavemente. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante, el sedimento de células resultante se resuspendió en 1 ml de medio y se subcultivó en el número apropiado de frascos a una proporción de 1:6. (Refiérase al apéndice 1a para materiales de cultivo de células).

### Preparación de placas

Las células U87 de glioblastoma se cultivaron bajo condiciones estándares (como se mencionó anteriormente). El número total de células se contó usando un hemocitómetro (Hawksley) y la concentración se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Conteo total de célula por ml} = \frac{\text{Conteo de célula promedio (5 casillas)}}{0.02}$$

La concentración celular se ajustó a 2000 células por 50µl.

50 µl de la preparación de células anterior se sembraron en placas limpias de 96 pocillos (Costar, poliestireno, fondo plano).

### Condiciones experimentales

Dos grupos de estudios de proliferación se llevaron a cabo para cada anticuerpo. Un grupo se usó para estudiar el efecto en la proliferación del anticuerpo en presencia de adrenomedulina endógena, mientras que el otro grupo se usó para el estudio de los efectos del anticuerpo en presencia de adrenomodulina exógenamente adicionada. Se prepararon concentraciones variables de anticuerpo en PBS para dar lugar a concentraciones finales por pocillo de 10µg, 1µg, 100ng, 10ng, 1ng, 100pg, 10pg y 1 pg. Se llevó a cabo seis réplicas de cada concentración y de cada anticuerpo. Este intervalo de dosis se usó en ambos grupos. La adrenomedulina se adicionó al grupo adecuado a una concentración final por pocillo de 200 nM. El 5-fluorouracilo (Fluka) se usó como un control positivo (100 mM) para la reducción de la proliferación. Los controles de PBS se prepararon también. Las placas se incubaron después bajo condiciones estándares. El reemplazo y re-dosificación de anticuerpos y controles se llevó a cabo cada 2 días. Las respuestas de concentración de anticuerpos anti-GST de ratón se calcularon también de forma similar, ya que fue el anticuerpo de control para el experimento.

### Procedimiento de ensayo

Para verificar la consistencia de las células sembradas, se realizó un estudio de 12-24 horas. Intervalos de tiempo adicionales se llevaron a cabo en 2, 4, 6 y 8 días. El estuche usado para realizar el ensayo de proliferación fue el ensayo de proliferación celular con MTT (ATCC). En cada intervalo de tiempo 10 µl de reactivo MTT se adicionó a todos los pocillos y se dejó incubar a 37°C durante 2 horas. Después de 2 horas el detergente MTT se adicionó a los pocillos e incubó durante la noche y agitó en la oscuridad. La placa se leyó por absorbancia a 595 nm (Spectramax M5e), usando el software Pro 5.2.x softmax 100035

La proliferación/supervivencia de las células SW-13 y U87 (línea celular de glioblastoma) las células se determinó usando el ensayo de MTT (ver [www.lgcpromochem-atcc.com](http://www.lgcpromochem-atcc.com) para los detalles sobre el ensayo).

### Ensayo de Apoptosis

El ensayo de apoptosis se llevó a cabo usando el estuche de ensayo para la caspasa-3 (Sigma) (Dirigirse al apéndice 1c para materiales requeridos).

### Preparación de las células

Las células U-87 se prepararon en condiciones estándares. Una solución celular de  $2 \times 10^7$  células se preparó en 2 ml de medios que se dispensaron en tubos de polipropileno.

### Condiciones experimentales

Se tomaron para cada tratamiento  $2 \times 10^7$  células. Los grupos de tratamiento fueron, las células tratadas con anticuerpo (para cada anticuerpo), anticuerpo anti-Fas, anticuerpo y células tratadas con adrenomedulina, blanco y células tratadas con adrenomedulina. El control positivo usado fue el anticuerpo monoclonal anti-Fas (MBL). La concentración final de los anticuerpos usados fue 10g y para el anticuerpo anti-Fas fue 500 ng. El anticuerpo anti-Fas es un anticuerpo IgM y posee actividad citotóxica induciendo de ese modo apoptosis en las células. La suspensión celular se trató en 2ml del medio que se incubaron durante 3 horas a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ .

### Procedimiento de ensayo

El tampón de ensayo y tampón de lisis determinados en el estuche se preparó usando el agua de 17megohm determinada según las instrucciones estándares determinadas en el protocolo. Después de 3 horas de incubación, las células se centrifugaron a 600g por 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 1 ml de PBS. Las células se centrifugaron una vez más usando las condiciones anteriormente mencionadas y se descartó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en 200 $\mu\text{l}$  de tampón de lisis 1x e incubó en hielo durante 20 minutos. Las células lisadas se centrifugaron a 20.000g durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Los lisados celulares se colocaron después en una placa de fondo plano de 96 como se muestra en la figura 6 e incubaron durante toda la noche. La absorbancia se leyó a 405 nm (Spectramax M5e), usando el software softmax Pro 5.2.36.

### Estudios en Animales

#### Cultivo celular de células para xenoinjertos

Las células MDA-MB-436-GFP se cultivaron en medio RPMI que contiene penicilina (50 U/ml), estreptomycin (50 mg/ml), glutamina (1 mg/ml), y suplementado con suero fetal bovino al 10%. Las células se cultivaron bajo una atmósfera de aire de 95% de  $\text{CO}_2$ / 5% de humedad y alimentaron con medio fresco cada 2 días, siendo monitoreadas de forma rutinaria para la contaminación por micoplasma. Las células que crecen exponencialmente se recogieron usando la solución de Tripsina-EDTA. Todos los componentes de los medios de cultivo se adquirieron de Invitrogen Life Technologies

#### Condiciones de animales

El trabajo con los animales se realizó en las instalaciones de animales de la Universidad de Sheffield. Ratones machos de 4-a-5-semanas de edad CD1 desnudos (*nu/nu*) se usaron. Los ratones se aclimataron y alojaron en jaulas estériles en grupos de cuatro o menos bajo campanas de flujo laminar en una habitación de temperatura controlada, con un esquema de 12-horas luz/12-horas oscuridad, y se alimentaron con comida y agua sometidas a autoclave *libremente*.

#### Tratamiento y Xenoinjerto

Los ratones desnudos CD1 desnudos (*nu/nu*) se implantaron con células de cáncer de mama MDA-MB-436-GFP. Para los implantes celulares, las células MDA-MB-436-GFP, que crecen en cultivo, se lavaron con PBS, dispersaron en una solución 0.05% de tripsina, y resuspendieron. Después de la centrifugación (1000 rpm por 3 minutos a  $8^\circ\text{C}$ ), el sedimento celular se resuspendió en PBS y la concentración final se ajustó a  $3 \times 10^7$  células/ml y la suspensión se colocó en hielo. Después de que el sitio se limpió con etanol, 0.1 ml ( $0.5 \times 10^6$  células) de la suspensión se inyectaron por vía subcutánea en los flancos derechos de los ratones desnudos. Los tumores se midieron con un calibrador digital de Venier (Sitio), y volúmenes de los tumores se determinaron usando la fórmula ancho x largo x altura x 0.52 (para forma elipsoide), estas mediciones se tomaron dos veces por semana. Los tumores se dejaron desarrollar durante 21 días, los animales se dividieron aleatoriamente en tres grupos. Un grupo ( $n = 8$ ) recibió una inyección vía intraperitoneal del anticuerpo JB3 (200  $\mu\text{g}$  de IgG purificada) como una suspensión en PBS con un volumen de 0.2 ml cada martes y viernes de cada semana. Como control, un grupo ( $n = 8$ ) que recibió un anticuerpo irrelevante (IgG del mismo isotipo, una forma inactivada del anticuerpo) y el otro grupo ( $n = 8$ ) recibió inyecciones comparables sólo del vehículo (PBS). El esquema 1 se llevó a cabo en el tiempo indicado.

**Seccionamiento del tumor**

- 5 Los tumores se extirparon de los ratones después de la eutanasia y fijaron en solución de formalina salina al 10%. Los tumores en secciones se embebieron en parafina (protocolo estándar). Las secciones se cortaron a 5µm, a través del cuerpo de tumor. Las secciones de cada muestra se tiñeron con hematoxilina - y eosina (H&E) y montaron con cubreobjetos de vidrio.

**Resultados**

- 10 Todos los anticuerpos policlonales probados redujeron el efecto de la adrenomedulina en la producción de AMPc. Los resultados mostrados en la Figura 11 indican que los anticuerpos policlonales producidos contra RAMP-3 inhibieron la producción de AMPc de las células MG63 en, al menos 15%.
- 15 Cada anticuerpo monoclonal produjo inhibición de la proliferación de las células SW-13 en el intervalo de 12-45% ver la Figura 12 (la concentración de 1:50 equivale a aproximadamente 5 nanogramos de concentración final por pocillo).
- 20 Uno de los anticuerpos monoclonales probados, HB10, aumentó la proliferación de células U87 (ver Figura 13). Como aumentó la dosis de anticuerpo lo hizo el nivel de absorbancia y por lo tanto el nivel de proliferación lo que sugiere un papel agonista para este anticuerpo.
- 25 La Figura 14 muestra un ensayo de MTT evaluando la velocidad de proliferación en la línea celular de glioblastoma U-87 en presencia del anticuerpo JF2 en concentraciones variables (después de 8 días de cultivo). En comparación con los controles, una dosis de 10µg dosis de anticuerpo JF2 produjo una reducción significativa en la proliferación, esto representa un 40% de reducción en la proliferación.
- 30 La Figura 15 muestra un ensayo de MTT evaluando la velocidad de proliferación en la línea celular de glioblastoma U-87 en presencia del anticuerpo JB3 a concentraciones variables (después de 8 días de cultivo).
- 35 En comparación con los controles, todas las dosis del anticuerpo JB3 produjeron una reducción significativa en la proliferación, esto representa una reducción de ~ 35% de la proliferación en todas las dosis. Esto sugiere una EC50 que debe ser inferior que 1 pg.
- 40 La Figura 16 muestra un ensayo de MTT evaluando la velocidad de proliferación en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-436-GFP en presencia del anticuerpo JB3 a concentraciones variables (después de 8 días de cultivo). En comparación con los controles, todas las dosis del anticuerpo JB3 produjeron una reducción significativa en la proliferación, sin embargo no se observó ninguna respuesta. Los 10 ng produjeron la mayor reducción de 29%, sin embargo esta respuesta no difiere significativamente de los otros grupos tratados.
- 45 La Figura 17 muestra un ensayo de MTT evaluando la velocidad de proliferación en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-436-GFP en presencia del anticuerpo JF2 a concentraciones variables (después de 8 días de cultivo). En comparación con los controles, las dosis de 1µg y 10µg del anticuerpo JF2 produjeron una reducción significativa en la proliferación. Los 10µg produjeron la mayor reducción del 12%.
- 50 La Figura 18 muestra un ensayo de MTT evaluando la velocidad de proliferación en la línea celular de cáncer de próstata PC-3 en presencia del anticuerpo JB3 a una concentración de 10µg (después de 8 días de cultivo). En comparación con los controles, la dosis de 10µg de anticuerpo JB3 produjo una reducción significativa en la proliferación tanto en presencia como en ausencia de adrenomedulina exógenamente adicionada. Los 10µg produjeron una reducción del 57% en la proliferación.
- 55 La Figura 19 muestra un ensayo de MTT evaluando la velocidad de proliferación en la línea celular de cáncer de próstata PC-3 en presencia del anticuerpo JF2 a una concentración de 10µg (después de 8 días de cultivo). En comparación con los controles, la dosis de 10µg del anticuerpo JF3 produjo una reducción significativa en la proliferación tanto en presencia como en ausencia de adrenomedulina exógenamente adicionada. 10µg de JF2 en presencia de adrenomedulina produjeron a 37% de reducción en la proliferación y 22% de reducción en ausencia de adrenomedulina exógenamente adicionada.
- 60 La Figura 20 muestra un ensayo de MTT evaluando la velocidad de proliferación en la línea celular de osteosarcoma SAOS en presencia del anticuerpo JB3 a una concentración de 10µg (después de 8 días de cultivo). En comparación con los controles, la dosis de 10µg del anticuerpo JB3 produjo una reducción significativa en la proliferación en presencia, sin embargo en ausencia de la adrenomedulina exógenamente adicionada no se observó ninguna reducción significativa. Los 10µg de JB3 en presencia de adrenomedulina produjeron un 34% de reducción en la proliferación.

- 5 La Figura 21 muestra un ensayo de MTT evaluando la tasa de proliferación en la línea celular de cáncer de colon HCT116 en presencia del anticuerpo JB3 y JF2 a una concentración de 10µg (después de 8 días de cultivo). En comparación con los controles la dosis de 10µg de JB3 anticuerpo produjo una reducción significativa en la proliferación, sin embargo JF2 no produjo reducción estadísticamente significativa en la proliferación. Los 10µg de JB3 en presencia de adrenomedulina produjeron una reducción del 27% en la proliferación.
- 10 La Figura 22 representa los niveles de apoptosis, por niveles medidos de caspasa-3 un marcador de apoptosis. La línea celular de cáncer de glioblastoma U-87 en presencia del anticuerpo JB3 y JF2 a una concentración de 10µg mostró tanto una reducción significativa en los niveles de caspasa-3 como de su apoptosis. Los grupos tratados representan uno niveles de incremento del 26% de caspasa-3.
- 15 La Figura 23 representa los niveles de apoptosis, mediante la medida de los niveles de caspasa-3, un marcador de apoptosis. La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-436-GFP en presencia del anticuerpo JB3 y JF2 a una concentración de 10µg, mostró un aumento significativo en los niveles de caspasa-3 y de su apoptosis sólo con el anticuerpo JB3. El grupo tratado JB3 representa un aumento del 59% en la caspasa-3.
- 20 La Figura 24 representa el volumen tumoral de MDA-MB-436-GFP que se inyecta en el flanco derecho de ratones desnudos CD1, tratados con anticuerpo JF2 y controles durante un período de 6 semanas. Ambos grupos de control muestran aumentos de grandes volúmenes tumorales después de la semana 3, sin embargo las velocidades de crecimiento dentro de los grupos de tratamiento son considerablemente más lentas. Las barras de error dentro de los grupos de control son grandes durante todo el experimento sin embargo dentro del tratamiento los grupos de errores son regularmente pequeños.
- 25 La Figura 25 representa los pesos de los tumores de MDA-MB-436-GFP que se inyectan en el flanco derecho de ratones desnudos CD1, tratados con el anticuerpo JF2 y los controles durante un período de 6 semanas. Los pesos de los tumores se toman después de la muerte y se calculan nuevamente usando los volúmenes de los tumores. Los grupos de control muestran aumentos en el peso a partir de los primeros intervalos de tiempo, sin embargo los grupos tratados mostraron un crecimiento más lento hasta 4 semanas, que se pesaron aumentos, sin embargo todavía se mantiene por debajo al grupo control.
- 30 La Figura 26 muestra la fluorescencia de las líneas celulares de cáncer MDA-MB-436-GFP inyectadas en el flanco derecho de ratones desnudos.
- 35 La Figura 27 muestra las secciones histológicas de tumores extraídos de ratones desnudos después de 6 semanas de tratamiento. Las imágenes de las secciones que se tiñeron con H&E son representativas del tumor. En los grupos de control un gran número de vasos sanguíneos fueron visibles (flechas rojas) y pocas áreas de células necróticas. Dentro de los grupos de tratamiento hubo pocos vasos sanguíneos y grandes áreas de células pre-necróticas representadas por círculos amarillos anteriores.
- 40

**REIVINDICACIONES**

- 5       **1.**       Un anticuerpo aislado capaz de unirse a la proteína 3 modificadora de la actividad del receptor denominado RAMP3 del denominado Receptor de Calcitonina similar al Receptor CRLR cuyo anticuerpo comprende:
  - i) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1a; y
  - ii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2a.
- 10       **2.**       Un anticuerpo aislado capaz de unirse a la proteína 3 modificadora de la actividad del receptor denominado RAMP3 del denominado Receptor de Calcitonina similar al Receptor CRLR cuyo anticuerpo comprende:
  - i) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 1b; y
  - ii) un dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácido como se representa por una secuencia mostrada en la Figura 2b.
- 15       **3.**       Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 que comprende una etiqueta funcional.
- 20       **4.**       Un anticuerpo como el reivindicado en la reivindicación 3 en donde la etiqueta se selecciona a partir de toxinas, enzimas y radiomarcadores.
- 25       **5.**       Un anticuerpo como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en medicina.
- 30       **6.**       Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un excipiente, diluyente, vehículo, tampón o estabilizador farmacéuticamente aceptable.
- 35       **7.**       Una composición farmacéutica como la reivindicada en la reivindicación 6 que comprende adicionalmente un agente activo.
- 40       **8.**       Una composición farmacéutica como la reivindicada en la reivindicación 7 en donde el agente activo se selecciona de uno o más agentes quimioterapéuticos, agentes citotóxicos, 5-fluorouracilo, cisplatino, mitomicina C, oxaliplatino, tamoxifeno y fármacos para el alivio del dolor.
- 45       **9.**       El uso de un anticuerpo como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor.
- 50       **10.**       El uso de un anticuerpo como el reivindicado en la reivindicación 9 en donde el tumor es un tumor de la piel, pulmón, mediastino, pericardio, próstata, mama, colon, recto, hígado, páncreas, cerebro, estructuras intracraneales, ojo, testículo, ovario, útero, cuello uterino, riñón, tiroides, vejiga, tracto gastrointestinal, tejido hematológico, huesos o articulaciones.
- 55       **11.**       Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
- 12.**       Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 como se muestra en las Figuras 1a, 1b, 2a ó 2b.
- 13.**       Un constructo que comprende al menos un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12.
- 14.**       Un constructo como el reivindicado en la reivindicación 13 en donde el constructo se selecciona de un plásmido, vector, casetes de transcripción o expresión.
- 15.**       Una célula huésped recombinante que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12.
- 16.**       Una célula huésped recombinante que comprende un constructo de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14.
- 17.**       Un polipéptido representado por una secuencia mostrada en la Figura 1a, 1b, 2a ó 2b.

**Figura 1**

(a)

(ADN)

ACTAGTCGACATGAGGG6CCCCTGCTCAGTTTT6TTGGGATCTTGTTGCTCTTGTTCCAG  
GTACCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGA  
AAGAGTCAGTCTCACTTGTCTGGGCAAGTCAGGACATTGGTAGTAACTTAACTGGCTTCAG  
CAGGAACCAGATGGAACATTAACGCCTGATCTACGCCACATCCAGTTTAGATTCTGGTG  
TCCCCAAAAGGTTTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCAGATTATTCTCACCATCAGCAGCCT  
TGAGTCTGAAGATTTGTAGACTATTACTGTCTACAATATGCTAGTTCTCCTCCGACGTTCCG  
GTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCC  
CACCATCCAGTAAGCTTGGG

(Proteína)

MVFLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGKSLRLSLSAASGFTFSSYGMWVWRQAPG  
KGLIEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYNCAKEMRYGS  
GRKAIKYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA

(b)

(ADN)

ACTAGTCGACATGAACTTCGGGTTTCAGATTGGTTTTCTAGCCCTCATTTTAAAGGTGTC  
CAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCT  
GAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTATGCCATGTCTTGGGTTCCG  
CAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTTACAC  
CTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAC  
CCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACAGTGAAG  
ACATAGGTACGACGTGAAGTTTTGGGCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTC  
CTCAGAGAGTCAGTCTTCCCAAATGTCTTCCCCTCGTAAGCTTGGG

(Proteína)

LVDIMNFGRLRLVFLALILKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSLSAASGFTFSSYAMS WVRQTP  
EKRLIEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSED TAMYYSARHRYDVK  
FLGYWGQGTTLTVSSESQSFPNVFPLVSL

(c)

(ADN)

AGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGGGCAGAGCTTGTGAGGTCAGGGGCCCCAGTCAAGTTG  
TCC TGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACTACTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGC  
CTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAATGGTGATACTGAATATG  
CCCCGAATTTCCAGGGCAAGGCCACTATGACTGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACC  
TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTAATGCCCATGTTTT  
ATTACTACGGGAGTAGAGGATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAACCG  
TCTCTCA

(Proteina)

VKLQESGAELVRSAPVKLSCTASGFNIKDYMHVWKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTHEYAPN  
FQKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCNAHVLLLRGVEDAMDYWGQGTTVTVSS

(d)

(ADN)

ATGGACTTCGGGTTGAGCTGGGTTTTCTTGTTGCTATTTTAAAAGGTGTCCAATGTGAGG  
TGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGCGGTCCCTGAGACTCTCC  
TGTACAGCTTCTAGATTCACGTTTGCTGATTATGCTATCACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAG  
GGAAGGGGCTGGAGTGGGTAGGTTTCATTAGAAGCAAACCTTTTGGTGGGACAGCAGCAT  
ACGCCGCGTCTGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGCATCGCCT  
ATCTGCAATTGAACCGCCTGAAAACCGAAGACACAGCCGTGTATTACTGTAGTAGAGCCC  
CTTTATCGAGTGACTACAGTCCCTCCTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAACCG  
TCTCTCAAGATCCGCTCCACCAAGGGCCCATCCGCTTCCCCCTGGCAC

(Proteina)

MDFGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASRFTFADYAITWVRQAPGK  
GLEWVGFIRSKPFGGTAAYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQLNRLKTEDVAVYYCSRAPLSSDY  
SPSLDVWGQGTTVTVSSRSASTKGPSVFPLA

Figura 2

(a)

(ADN)

ATGAGGGCCCCTGCTCAGTTTTTTGGGATCTTGTTGCTCTTGTTCCAGGTACCAGATGTG  
ACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAGTCAGTCT  
CACTTGTGCGGGCAAGTCAGGACATTGGTAGTAACCTAAACTGGCTTCAGCAGGAACCAGA  
TGGAACTATTAACGCCTGATCTACGCCACATCCAGTTTAGATTCTGGTGTCCCCAAAAGG  
TTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTGAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTTGAGTCTGAAG  
ATTTGTAGACTTACTGTCTACAATATGCTAGTTCTCCTCCGACGTTCCGGTGGAGGCAC  
CAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGT

(Proteina)

MRAPAQFFGILLLLFPGTRCDIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSNLNLWLQQEPDGTI  
KRLIYATSSLDGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFVDYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIKRA  
DAAPTVSIFPPSSKLG

(b)

(ADN)

GACATCCAGATGACGCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAACTGTCACC  
ATCACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGG  
GAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAG  
GTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGA  
AGATTTTGGGAGTTACTGTCAACATCATTATGGTACTCCTCCGACGTTCCGGTGGAGGC  
ACCAAGCTGGAAATCAAACGG

**(Proteina)**

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFS  
GSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYCQHYYGTPPTFGGGTKLEIKR

(c)

**(ADN)**

TTTTTGAATTCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCT  
GCTTCCAGCAGTGATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGA  
GATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGTACACAGTAATGGAAACACCT  
ATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTC  
CAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTAC  
ACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTAC  
ACATGTTCCATTACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAACGGGCTGATGCTGC  
ACCAACTGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTC  
GTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGA

**(Proteina)**

FLNSTMKLPVRLVLMFWIPASSSDVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHNSGNTYLH  
WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPFT  
FGSGTKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYK

(d)

**(ADN)**

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTAAGTCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGT  
GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACC  
ATCTCGTACAGGGCCAGCAAAAGTGTAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAACC  
AACAGAAACCAGGACAGGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAGAATCTG  
GGGTCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGCTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATC  
CTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCA8GCACATTAGGGAGCTTACACGT  
TCGGAGGGGGCCACCAAGCTGGAAATCAAACGGAGATCTCGAACTGTGGCTGCACCATC  
TGTCTBT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTG  
CCTGC

**(Proteina)**

METDTLLWVLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQK  
PGQPPRLLIYLVSNLESQVDFSGSGSDFTLNHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGSKL  
EIKRRSRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL

**Figura 3**

(i)

MVFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYGMVWRQAPG  
KGLEWVAVISYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYNCAMKEMRYGS  
GRKAIKYIYGMDDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA

(ii)

MVFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYGYWVVRQAPG  
KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYNCAKEMRYGS  
GRKAIKYYYGMDWVGQGTTVTVSPASTKGPSVFPLA

**Figura 4**

(i)

LVDMNFGFSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTP  
EKREWWATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYSARHRYDVK  
FLGYWGQGTTLTVSSESQSFPNVFPLVSL

(ii)

LVDMNFGFRLVFLALILKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTP  
EKREWWATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYSARHRYDVK  
FLGYWGQGTTLTVSSESQSFPNVFPLVSL

(iii)

LVDMNFGFRLVFLALILKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTP  
EKREWWATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYSARHRYDVK  
FLGYWGQGTTLTVSSESQSFPNVFPLVSL

(iv)

LVDMNFGRLVFLALILKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTP  
EKREWWATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYSARHRYDVK  
FLGYWGQGTTLTVSSESQSFPNVFPLVSL

(v)

LVDMNFGRLVFLALILKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTP  
EKREWWATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYSARHRYDVK  
FLGYWGQGTTLTVSSESQSFPNVFPLVSL

(vi)

LVDMNFGLSLVFLALILKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTP  
EKREWWATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYSARHRYDVK  
FLGYWGQGTTLTVSSESQSFPNVFPLVSL

**Figura 5**

(i)

VKLQESGAELVRSGAPVELSCTASGFNIKDYMHWWKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTEYAPN  
FQ GKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCNAHVLLLRGVEDAMDYWGQGTTPSP

(ii)

GQAQESGAELVRSGAPVKLSCTASGFNIKDYMHWWKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTEYAP  
NFQ GKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCNAHVLLLRGVEDAMDYWGQGTTPVSS

(iii)

VKLQESGAGLVRSGAPVKLSCTASGFNIKDYMHWWKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTEYAPN  
FQ GKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCNAHVLLLRGVEDAMDYWGQGTTPSP

(iv)  
VKLQESGAELVRSGAPVKLSCTASGFNIKDYMHWWKQRPEQGLEWIGWIDPENGDEYAPN  
FQ GKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCNAHVLLLRGVEDAMDYWGQGT TVTVSS

(v)  
VKLQESRAELVRSGAPVKLSCTASGFNIKDYMHWWKQRPEQGLEWIGWIDPENGDEYAPN  
FQ GKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCNAHVLLLRGVEDAMDYWGQGT TVTSP

(vi)  
VQLQESGAELVRSGAPVKLSCTASGFNIKDYMHWWKQRPEQGLEWIGWIDPENGDEYAPN  
FQ GKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCNAHVLLLRGVEDAMDYWGQGT TVTVSS

(vii)  
VKLQESGAELVRSGAPVKLSCTASGFNIKDYMHWWKQRPEQGLEWIGWIDPENGDEYAPN  
FQ GKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCNAHVLLLRGVEDAMDYWGQGT TVTVSS

**Figura 6**

(i)  
MDFGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVPPGRSLRLSCTASRFTFADYAITWVRQAPGK  
GLEWVGFIRSKPFGGTAAYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQLNRLKTEDTAVYYCSRAPLSSDY  
SPSLDWGQGT TVTVSSRSASTKGPSVFPLA

(ii)  
MDFGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASRFTFADYAITWVRQAPGK  
GLEWVGFIRSKPFGGTAAYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQLNRLKTEDTAVYYCSRAPLSSDY  
SPSLDWGQGT TVTVSSRSASTKGPSVFPLA

(iii)  
MDFGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASRFTFADYAITWVRQAPGK  
GLEWVGFIRSKPFGGTAAYAXSVKGRFTISRDDSKSIAYLQLNRLKTEDTAVYYCSRAPLSSDY  
SPSLDWGQGT TVTVSSRSASTKGPSVFPLA

(iv)  
MDFGLSLVFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASRFTFADYAITWVRQAPGK  
LEWVGFIRSKPFGGTAAYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQLNRLKTEDTAVYYCSRAPLSSDY  
PSLDWVGQGT TVTVSSRSASTKGPSVFPLA

(v)  
MDFGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLGLSCTASRFTFADYAITWVRQAPGK  
GLEWVGFIRSKPFGGTAAYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQLNRLKTEDTAVYYCSRAPLSSDY  
SPSLDWGQGT TVTVSSRSASTKGP

**Figura 7**

(i)  
LVDMRAPAQFFGILLLLFPGTRCDIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSNLNWLQQEP  
DGTIKRLIYATSSLD SGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFVDYYCLQYASSPPTFGGGTKLE  
IKRADAAPT VSIFFPSSKLG

(ii)  
LVDMRAPAQIFGILLLLFPGTRCDIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSNLNWLQQEPD  
GTIKRLIYATSSLDGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDFVDYCYCLQYASSPPTFGGGTKLEI  
KRADAAPTVISIFPPSSKLG

(iii)  
LVDMRAPAQFLGILLLLFPGTRCDIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSNLNWLQQEPD  
RTIKRLIYATSSSDGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDSVDYCYCLQYASSPPTFGGGTKLEI  
KRADAAPTVISIFPPSSKLG

(iv)  
LVDMRTPAQFFGILLLLFPGTRCDIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRTSQDIGSNLNWLQQEPD  
GTIKRLIYATSSLDGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDFVDYCYCLQYASSPPTFGGGTKLEI  
KRADAAPTVISIFPPSSKLG

(v)  
TSRIMVSTPQFLGILLLLFPGTRCDIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSNLNWLQQEP  
DGTIKRLIYATSSLDGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDFVDYCYCLQYASSPPTFGGGTKLEI  
IKRADAAPTVISIFPPSSKLG

**Figura 8**

(i)  
DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFS  
GSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYGTPTFGGGTKLEIKR

(ii)  
DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFS  
GSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHRYGTPTFGGGTKLIKR

(iii)  
HQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSG  
SGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYGTPTFGGGTKLEIKR

(iv)  
DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFS  
GSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYGTPTFGGGTKLEIK

(v)  
DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFS  
GSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYGTPTFGGGTKLEIKR

**Figura 9**

(i)  
FLNSTMKLPVRLVLMFWIPASSSDVWMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHNGNTYLH  
WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPFT  
FGSGTRLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPK

- (ii)  
STMKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYL  
QKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPFTFGS  
GTKLEIKRANAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPK
- (iii)  
FLNSTMKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLH  
WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPFT  
FGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVMCFLNNFYPR
- (iv)  
FLNSTMKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLPLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLH  
WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPFT  
FGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPK
- (v)  
NSTMKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWY  
LQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPFTFGS  
GTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPK

**Figura 10**

- (i)  
METDTLLLWVLLLVWPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQK  
PGHPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCRHIRELTRSEGGTKL  
EIKRRSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL
- (ii)  
METDTLLLWVLLLVWPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQK  
PGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGTKL  
EIKRRSRTVAAPSVLIFPPSDEQLKSGTASVCL
- (iii)  
METDTLLLWVLLLVWPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQK  
PGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGTKL  
EIKRRSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL
- (iv)  
METDTLLLWVLLLVWPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQK  
PGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGTKL  
EIKRRSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL
- (v)  
METDTLLLWVLLLVWPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQK  
PGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGTKL  
EIKRRSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL

Figura 11

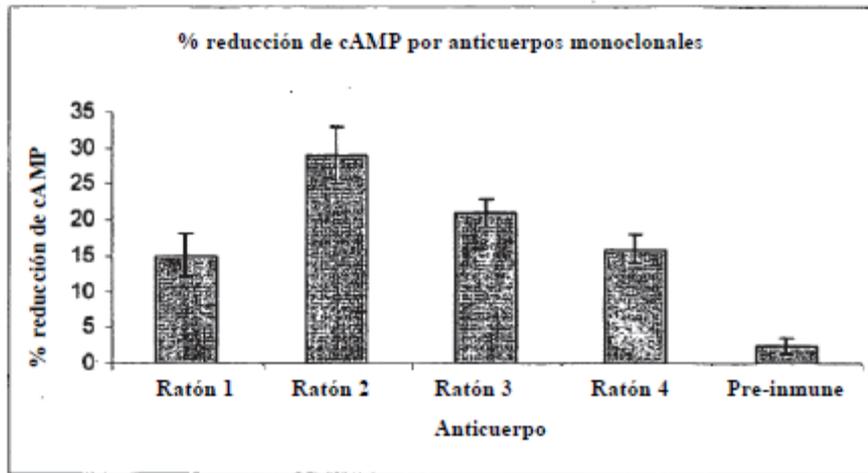


Figura 12

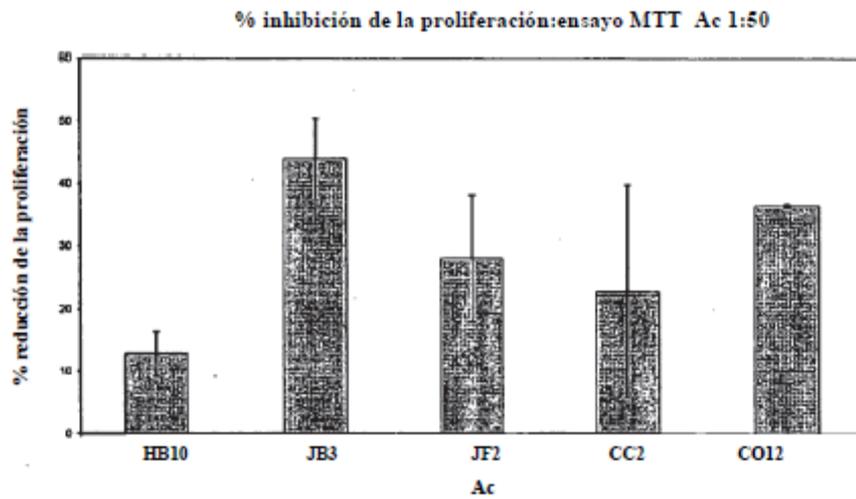
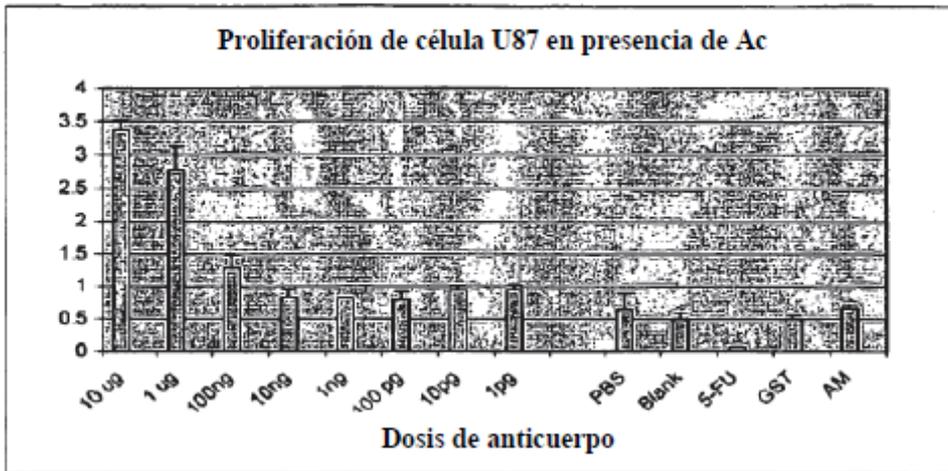


Figura 13



5

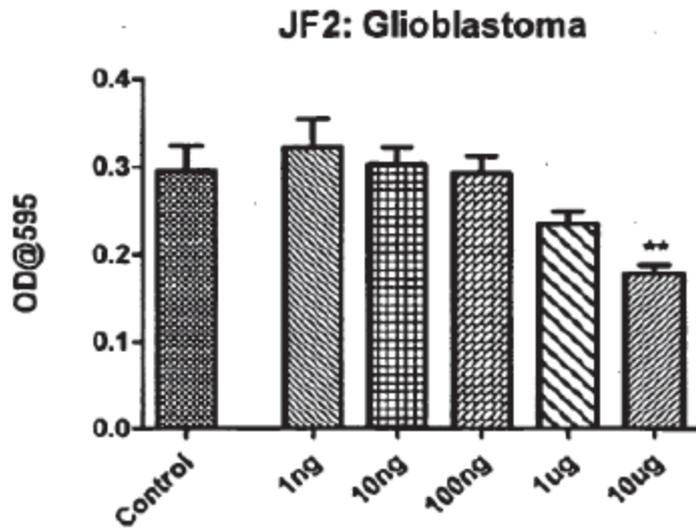


Figura 14

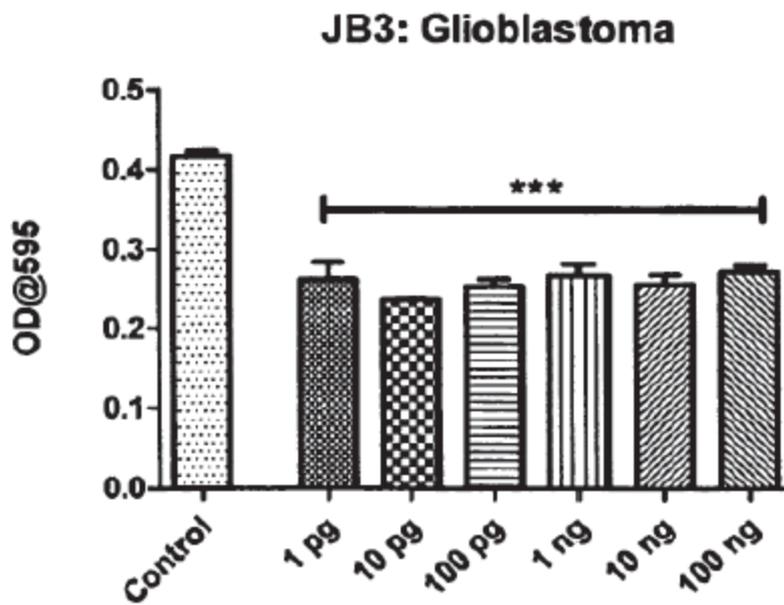


Figura 15

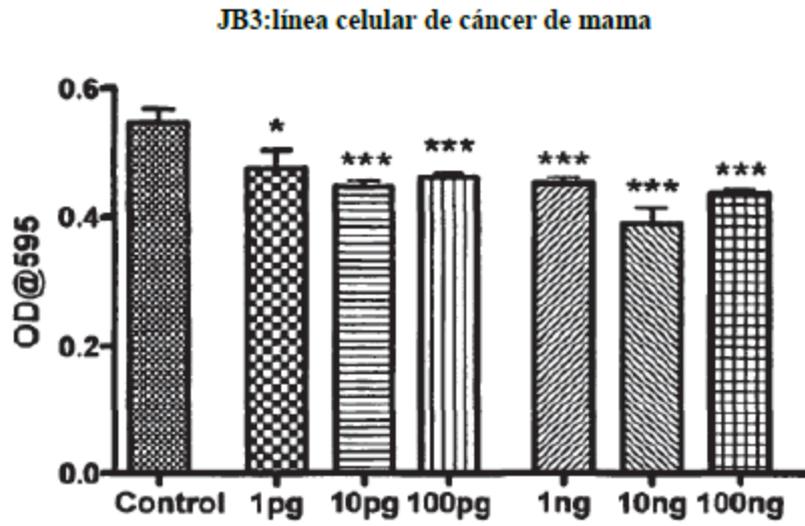


Figura 16

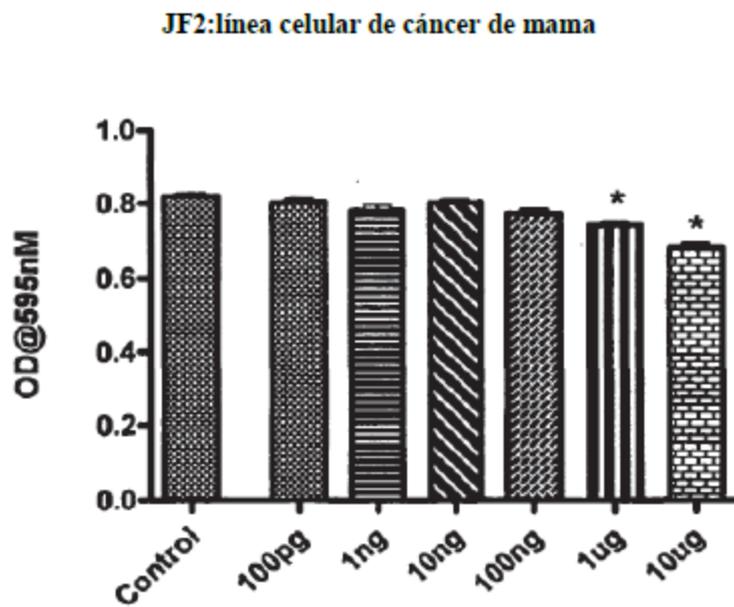


Figura 17

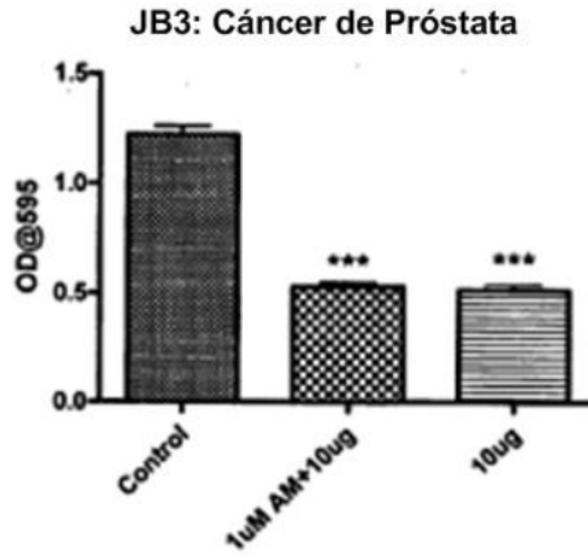


Figura 18

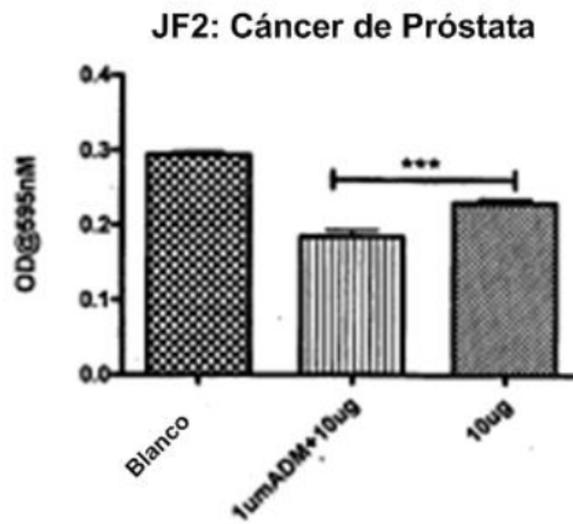


Figura 19

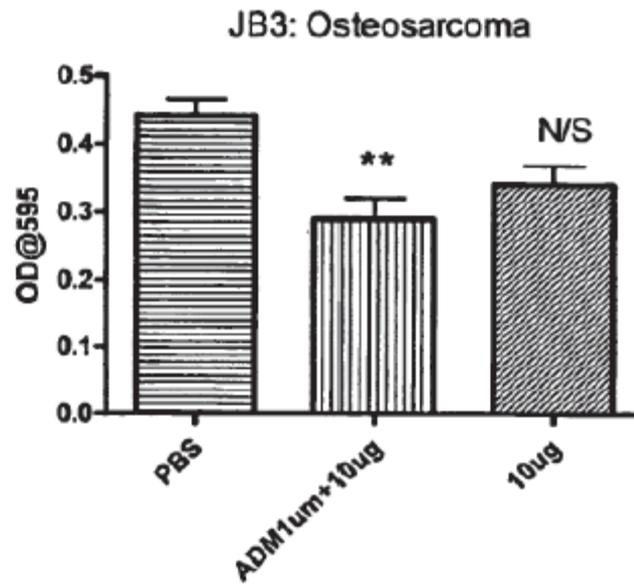


Figura 20

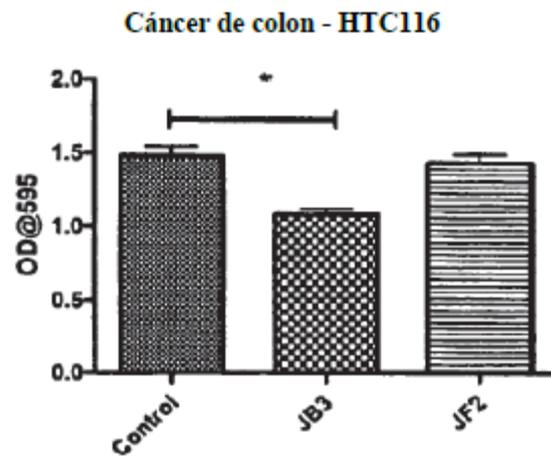


Figura 21

Niveles de apoptosis: Glioblastoma

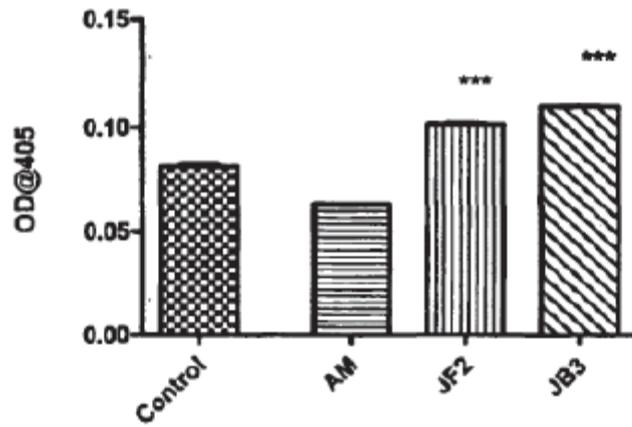


Figura 22

Niveles de apoptosis: cáncer de mama

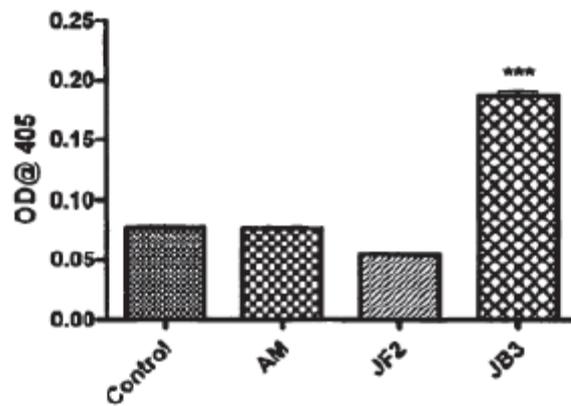


Figura 23

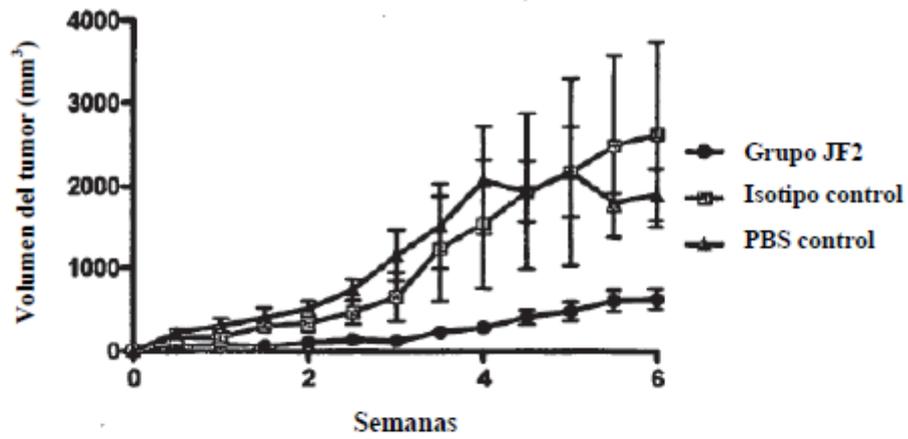


Figura 24

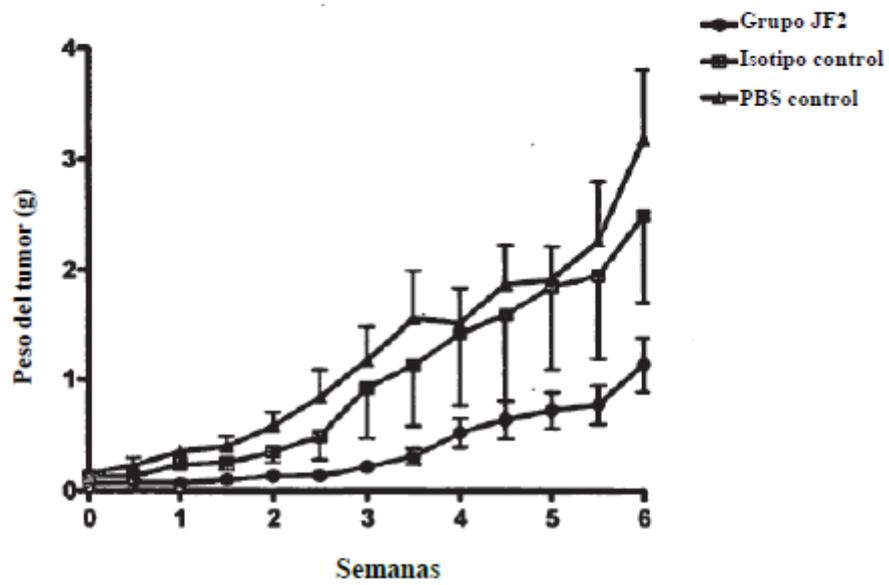
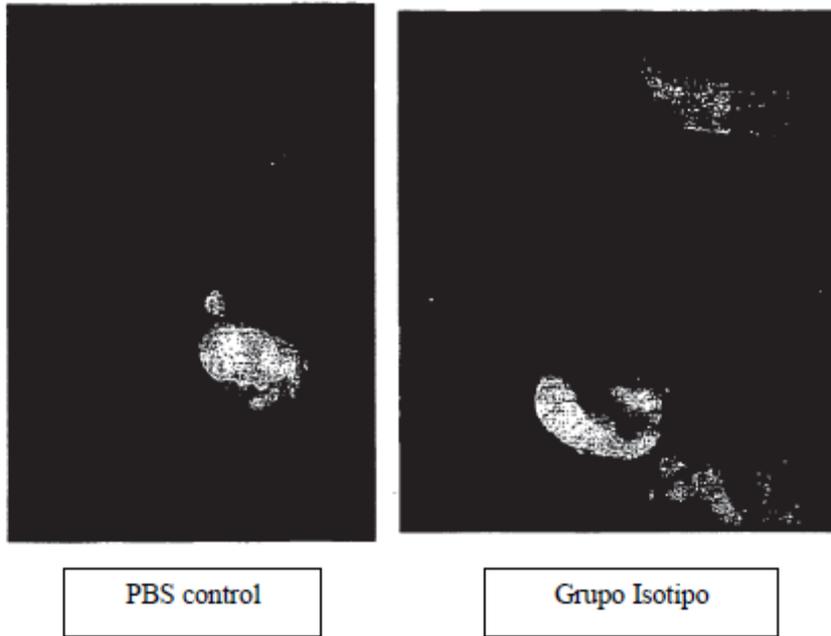
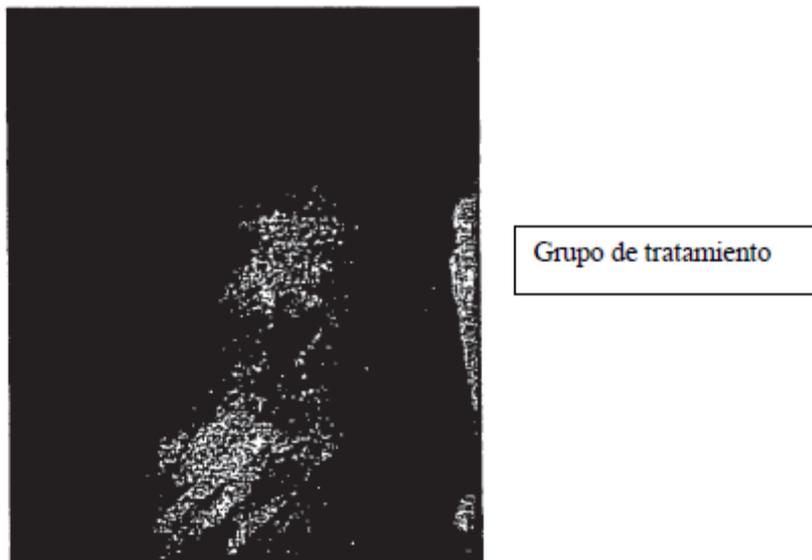
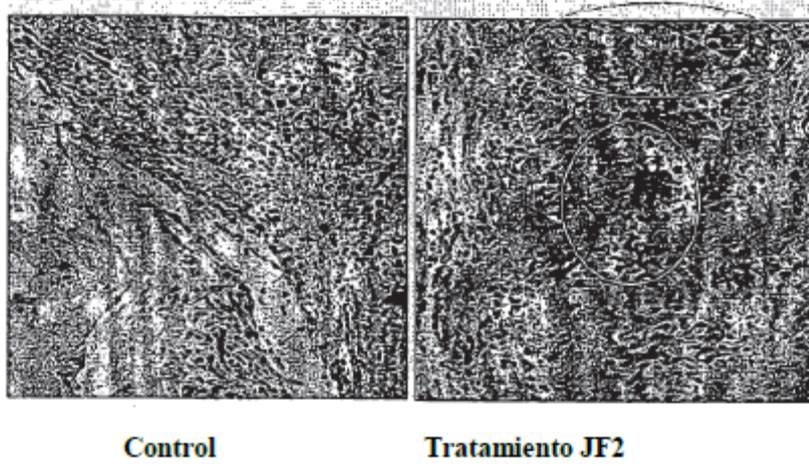


Figura 25



**Figura 26**





**Figura 27**