

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 502 217**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2008 E 08835102 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 2207805**

54 Título: **Antagonistas de NLRR-1 y sus usos**

30 Prioridad:

02.10.2007 US 976892 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.10.2014

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**SMITH, VICTORIA;
HONGO, JO-ANNE S.;
STINSON, SUSANNA y
HAZEN, MEREDITH**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 502 217 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

Antagonistas de NLRR-1 y sus usos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones y métodos útiles para el tratamiento del cáncer y otros trastornos, y en particular a antagonistas de la Proteína 1 Neuronal con Repeticiones Ricas en Leucina.

10 **Antecedente de la invención**

Las proteínas neuronales con repeticiones ricas en leucina (NLRR, *Neuronal Leucine Rich Repeat*) se identificaron en primer lugar a partir de una biblioteca de ADNc de cerebro de ratón y están codificadas por una familia de tres genes (Taguchi y col., 1996; Taniguchi y col., 1996). Constituyen una novedosa familia de proteínas LRR que contiene 11 o 12 LRR, un dominio de inmunoglobulina, y un dominio de fibronectina de tipo III (Bormann y col., 1999; Fukamachi y col., 2001; Hayata y col., 1998). A partir de sus características estructurales, se supone que estas proteínas transmembrana glicosiladas juegan papeles en la adhesión, migración, morfogénesis o señalización celular. La expresión embrionaria regulada y la localización celular de las proteínas de la familia NLRR sugieren importantes papeles durante el desarrollo en el control de la adhesión, el movimiento o la señalización celular (Haines y col., 2005), pero sus funciones han permanecido elusivas. se ha mostrado que NLRR-3 tiene un papel en la potenciación de la señalización de EGFR en respuesta a concentraciones bajas de EGF promoviendo probablemente la asociación de EGFR y EGF en depresiones y endosomas recubiertos de clatrina de tal manera que no existe evidencia de asociación física con EGFR (Fukamachi y col., 2002). Se ha reconocido durante mucho tiempo la endocitosis de EGFR como un mecanismo de atenuación, pero algunos estudios han revelado que los complejos endosómicos conservan la potencia de señalización y que la internalización de EGFR puede servir incluso para amplificar la fosforilación de la quinasa MAP, y estimular las rutas que conducen a la supervivencia celular (Haugh y col., 1999a; Haugh y col., 1999b; Sato y col., 2001; Schoeberl y col., 2002; Wang y col., 2002).

La NLRR-1 (conocida como LRRN1) comparte homología con la NLRR-3, incluyendo la conservación completa del motivo de endocitosis en el extremo C. La NLRR-1 se ha identificado como un marcador temprano del desarrollo neuroectodérmico (Aubert y col., 2003) y también se ha encontrado en un subconjunto de precursores miogénicos durante el desarrollo del somita (Haines y col., 2005), pero su función sigue siendo desconocida.

Los datos con respecto a la expresión de proteínas NLRR en patologías humanas son limitados, pero en neuroblastoma, la expresión de NLRR-1, a diferencia de NLRR-3, está significativamente asociada con supervivencia corta y con malos factores de pronóstico (Hamano y col., 2004).

La familia del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) comprende cuatro receptores estrechamente relacionados (HER1/EGFR, HER2, HER3 y HER4). La familia EGFR y los ligandos asociados estimulan una serie de acontecimientos de señalización intracelulares que regulan la proliferación, la migración, diferenciación y supervivencia celulares (Wells, 1999). La activación de la ruta EGFR juega un papel fundamental en la neoplasia, y los avances recientes en el tratamiento tumoral dirigido contra EGFR han resaltado algunos aspectos de la señalización y activación de EGFR en la tumorigénesis, que incluyen contribuciones de dichos factores como la amplificación genómica, la expresión de proteínas, mutaciones, y efectores en la dirección 3' (Dzidziuszko y col., 2006; Eberhard y col., 2005; Han y col., 2005; Lynch y col., 2004; Oliveira y col., 2006; Paez y col., 2004; Shepherd y col., 2005; Tsao y col., 2005).

La expresión en exceso de la quinasa de EGFR, o su ligando TGF-alfa, se asocia frecuentemente con muchos cánceres, incluyendo cánceres de pulmón, colorrectal, ovario, carcinoma de células renales, vejiga, cánceres de cabeza y cuello, glioblastomas y astrocitomas, y se cree que contribuyen al crecimiento maligno de estos tumores. Se ha encontrado también que una mutación específica de delección en el gen EGFR (EGFRvIII) aumenta la tumorigenicidad celular. La activación de las rutas de señalización estimuladas por EGFR promueve múltiples procesos que son potencialmente promotores del cáncer, por ejemplo, la proliferación, angiogénesis, angiogénesis, motilidad e invasión celulares. la expresión aumentada de HER1/EGFR se asocia frecuentemente con enfermedad avanzada, metástasis y pronóstico malo. Por ejemplo, en NSCLC y cáncer gástrico, la expresión aumentada de HER1/EGFR ha mostrado estar correlacionada con un elevado índice metastásico, una mala diferenciación celular.

Se han llevado a cabo intensos esfuerzos de investigación para desarrollar agentes antitumorales que inhiban directamente la actividad quinasa del EGFR y anticuerpos que reduzcan la actividad de la quinasa EGFR bloqueando la activación del EGFR (de Bono J.S. y Rowinsky, E.K. (2002) Trends in Mol. Medicine 8:S19-S26; Dancy, J. y Sausville, E.A. (2003) Nature Rev. Drug Discovery 2:92-313). Algunos estudios han demostrado, descrito, o sugerido que algunos inhibidores de la quinasa EGFR pueden mejorar la destrucción originada por las células tumorales o la neoplasia cuando se usan en combinación con determinados agentes anticancerosos o quimioterapéuticos o tratamientos diferentes (por ejemplo, Herbst, R.S. y col. (2001) Expert Opin. Biol. Ther. 1:719-732; Solomon, B. y col (2003) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 55:713-723; Krishnan, S. y col. (2003) Frontiers in Bioscience 8, e1-13; Grunwald, V. e Hidalgo, M. (2003) J. Nat. Cancer Inst. 95:851-867; Seymour L. (2003) Current

Opin. Investig. Drugs 4(6):658-666; Khalil, M.Y. y col. (2003) Expert Rev. Anticancer Ther.3:367-380; Bulgaru, A.M. y col. (2003) Expert Rev. Anticancer Ther.3:269-279; Dancey, J. y Sausville, E.A. (2003) Nature Rev. Drug Discovery 2:92-313; Ciardiello, F. y col. (2000) Clin. Cancer Res. 6:2053-2063; y Publicación de Patente N°: US 2003/0157104).

5 Erlotinib (por ejemplo, HCl de erlotinib, conocido también como TARCEVA® u OSI-774) es un inhibidor de la quinasa EGFR oralmente disponible. In vitro, erlotinib ha demostrado sustancial actividad inhibidora frente a la quinasa EGFR en numerosas líneas de células tumorales humanas que incluyen cáncer colorrectal y de mama (Moyer J.D. y col. (1997) Cancer Res. 57(4838), y la evaluación preclínica ha demostrado actividad frente a numerosos xenoinjertos tumorales humanos que expresan EGFR (Pollack, V.A. y col (1999) J. Pharmacol. Exp. Ther. 291:739). Erlotinib ha demostrado actividad en ensayos clínicos en numerosas indicaciones, incluyendo cáncer de cabeza y cuello (Soulieres, D., y col., (2004) J. Clin. Oncol. 22(77), NSCLC (Perez-Soler R, y col., (2001) Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 20/310a resumen 1235), CRC (Oza, M., y col., (2003) Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 22/196a resumen 785) y MBC (Winer, E., y col., (2002) Breast Cancer Res. Treat. 76/5115a resumen 445; Jones, R.J., y col., (2003) Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 22/45a resumen 180). En un ensayo clínico en fase III, la monoterapia con erlotinib prolongó significativamente la supervivencia, retrasó la progresión de la enfermedad y retrasó el empeoramiento de los síntomas relacionados con cáncer de pulmón con NSCLC avanzado, resistente al tratamiento (Shepherd, F. y col. (2004) J. Clin. Oncology, 22:14S (Suplemento del 15 de julio), Resumen 7022). En noviembre de 2004 la U.S. Food and Drug Administration (FDA) homologó TARCEVA® para el tratamiento de pacientes para el cáncer de pulmón no microcítico localmente avanzado o metastásico (NSCLC) tras el fracaso de al menos un régimen de quimioterapia previo.

A pesar del significativo avance en el tratamiento del cáncer, se necesitan tratamientos mejorados.

25 Sumario de la invención

La invención proporciona un antagonista de la Proteína 1 Neuronal con Repeticiones Ricas en Leucina (NLRR-1) para su uso en un método de inhibición de la señalización de EGFR en una célula de mamífero que comprende poner en contacto la célula con una composición que comprende una cantidad eficaz de dicho antagonista (NLRR-1) tal como se define en las reivindicaciones. El antagonista es un anticuerpo dirigido contra NLRR-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, tal como el anticuerpo monoclonal 3D1.6.9, producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732. En otros casos, el anticuerpo compite por la unión con el anticuerpo monoclonal 3D1.6.9 producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732 de la ATCC. En otros casos más, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano, o anticuerpo humanizado, En algunos casos, el anticuerpo quimérico o humanizado comprende un fragmento procedente del anticuerpo monoclonal 3D1.6.9 producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732 de la ATCC.

La célula es una célula cancerosa. La célula puede ser una célula de cáncer de mama, célula de cáncer colorrectal célula de cáncer de pulmón, célula de cáncer de próstata, célula de cáncer de hígado, célula de cáncer de páncreas, célula de cáncer de ovario.

La invención proporciona un antagonista de NLRR-1 para el uso en un método para inhibir el crecimiento de las células tumorales en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de NLRR-1 tal como se define en las reivindicaciones. El antagonista es un anticuerpo dirigido contra NLRR-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, tal como el anticuerpo monoclonal 3D1.6.9, producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732. En otros casos, el anticuerpo compite por la unión con el anticuerpo monoclonal 3D1.6.9 producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732 de la ATCC. En otros casos más, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano, o anticuerpo humanizado, En algunos casos, el anticuerpo quimérico o humanizado comprende un fragmento procedente del anticuerpo monoclonal 3D1.6.9 producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732 de la ATCC.

En algunos casos, EGFR no está amplificado en las células tumorales. Se puede administrar adicionalmente al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de EGFR, en el que el antagonista de EGFR es un anticuerpo dirigido contra EGFR o un fragmento de unión a antígeno del mismo o una molécula pequeña que se une a EGFR. En algunos casos, la molécula pequeña es erlotinib. En algunos casos, las células tumorales del sujeto son resistentes a un antagonista de EGFR. En algunos casos, las células tumorales del sujeto son resistentes a erlotinib. En algunos casos, la administración del antagonista de NLRR-1 y el antagonista de EGFR aumenta la inhibición del crecimiento de la célula tumoral en comparación con la administración del antagonista de EGFR sin la administración del antagonista de NLRR-1.

La célula puede ser una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer colorrectal una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de hígado, una célula de cáncer de páncreas, o una célula de cáncer de ovario.

En un aspecto, la invención proporciona un antagonista de NLRR-1 para el uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de NLRR-1 tal como se define en las reivindicaciones. El antagonista es un anticuerpo dirigido contra NLRR-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un ARNip, o una molécula pequeña que se une a NLRR-1. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, tal como el anticuerpo monoclonal 3D1.6.9, producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732. En otras realizaciones, el anticuerpo compite por la unión con el anticuerpo monoclonal 3D1.6.9 producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732 de la ATCC. En otras realizaciones adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano, o anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo quimérico o humanizado comprende un fragmento procedente del anticuerpo monoclonal 3D1.6.9 producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732 de la ATCC.

En algunas realizaciones, EGFR no está amplificado en las células tumorales. En algunas realizaciones, Se administra adicionalmente al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de EGFR, en el que el antagonista de EGFR es un anticuerpo dirigido contra EGFR o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una molécula pequeña que se une a EGFR. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es erlotinib. En algunas realizaciones, el cáncer es resistente a un antagonista de EGFR. En algunas realizaciones, el cáncer es resistente a erlotinib. En algunas realizaciones, la administración del antagonista de NLRR-1 y el antagonista de EGFR aumenta la inhibición del crecimiento del cáncer en comparación con la administración del antagonista de EGFR sin la administración del antagonista de NLRR-1.

En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, y ovario.

Se describe también en el presente documento un antagonista de NLRR-1 para el uso en un método para tratar el cáncer en un paciente cuyo cáncer es resistente al tratamiento con un antagonista de EGFR que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de NLRR-1 tal como se define en las reivindicaciones. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, tal como el anticuerpo monoclonal 3D1.6.9, producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732. En otros casos, el anticuerpo compite por la unión con el anticuerpo monoclonal 3D1.6.9 producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732 de la ATCC. En otros casos más, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 3D1.6.9 producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732 de la ATCC. En otros casos más, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano, o anticuerpo humanizado. En algunos casos, el anticuerpo quimérico o humanizado comprende un fragmento procedente del anticuerpo monoclonal 3D1.6.9 producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732 de la ATCC.

En algunos casos, EGFR no está amplificado en las células tumorales. En algunos casos, Se administra adicionalmente al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de EGFR, en el que el antagonista de EGFR es un anticuerpo dirigido contra EGFR o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un ARNip, o una molécula pequeña que se une a EGFR. En algunos casos, la molécula pequeña es erlotinib. En algunos casos, el cáncer es resistente a un antagonista de EGFR. En algunos casos, el cáncer es resistente a erlotinib. En algunos casos la administración del antagonista de NLRR-1 y el antagonista de EGFR aumenta la inhibición del crecimiento del cáncer en comparación con la administración del antagonista de EGFR sin la administración del antagonista de NLRR-1.

En algunos casos, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, y ovario.

Otro aspecto más de la invención proporciona un método para identificar pacientes que podrían beneficiarse del tratamiento con un antagonista de NLRR-1 que comprende comparar el nivel de NLRR-1 presente en la población de células del ensayo aislada de un paciente y una población de células de referencia donde un aumento en el nivel de expresión de NLRR-1 en la población de células del ensayo indica que el paciente podría beneficiarse del tratamiento con un antagonista de NLRR-1 tal como se define en las reivindicaciones.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para identificar pacientes que podrían beneficiarse de un tratamiento combinado con un antagonista de NLRR-1 y un antagonista de EGFR que comprende comparar el nivel de NLRR-1 presente en una población de células del ensayo aislada de un paciente y una población de células de referencia, donde la población de células del ensayo no comprende la amplificación de EGFR, y donde un aumento en el nivel de expresión de NLRR-1 en la población de células del ensayo indica que el paciente podría beneficiarse de un tratamiento combinado de un antagonista de NLRR-1 y un antagonista de EGFR tal como se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra la expresión de NLRR-1 en un cáncer de próstata de grado alto. **1A:** Niveles de transcritos de

NLRR-1 en cánceres de próstata (rombos) y expresión media (cuadrados) tal como se determinó mediante el análisis de la micromatriz. Norma, normal; BPH, hiperplasia prostática benigna; PIN, neoplasia intraepitelial prostática; AdCa, adenocarcinoma, **1B**: Niveles de transcritos de NLRR-1 procedente de microdissección por captura láser de tumores de próstata tal como se ha determinado mediante un análisis de micromatriz. **1C**: Análisis de RT-PCR de los transcritos de MUC1 y NLRR-1 en tumores de próstata. Se determinaron las cantidades usando una curva normalizada de ADN genómico humano.

La **Figura 2** muestra la expresión de NLRR-1 a través de un amplio espectro de cánceres. **2A**: Transcrito de NLRR-1 en normal (N) frente a tumor (T) tal como se determinó mediante al análisis de la micromatriz. **2B**: Expresión del transcrito de NLRR-1 en mieloma múltiple y linfoma de células del manto tal como se determinó mediante el análisis de la micromatriz. **2C**: Transcrito de ERBB2 frente a transcrito de EGFR en tumores 2003 tal como se determinó mediante el análisis de la micromatriz. **2D**: Transcrito de NLRR-1 frente a transcrito de EGFR en tumores 2003 tal como se determinó mediante el análisis de la micromatriz.

La **Figura 3** muestra la inmunoprecipitación simultánea de NLRR-1 y EGFR. **3A**: Lisados de células BT549 tratados con α -NLRR-1, o anticuerpo monoclonal α -ragweed, precipitado con perlas de proteína G agarosa, y se inmunotransfirió con y se inmunotransfirió con el anticuerpo monoclonal α -NLRR-1 policlonal o anticuerpo monoclonal α -EGFR **3B**: lisados de células NCI-H2009 tratados con α -NLRR-1, o anticuerpo monoclonal α -ragweed, precipitado con perlas de proteína G agarosa, y se inmunotransfirió con α -EGFR, α -ERBB2, α -ERBB3, α -IGF1R, y α , β -adaptingina.

La Figura 4 muestra la fosforilación de ERK con la transfección de NLRR-1. Se transfectaron células Cos-7 con el vector pEY-FP o NLRR-1.YFP, se privaron de alimento y estimularon con 100ng/ml EGF (**4A**) o 50 nM TGF(**4B**), a continuación se analizaron mediante citometría de flujo para P-ERK. Se recogieron 50.000 casos y se clasificaron en FSC, SSC, e YFP. Vector (\bullet); NLRR-1-YFP (\cdot).

La **Figura 5** muestra la expresión superficial celular de NLRR1 y EGFR. **5A**: Detección de NLRR-1 mediante citometría de flujo de células transfectadas con NLRR-1. Células HEK293 se transfectaron transitoriamente con el vector pEYFP, NLRR-1.YFP, o NLRR-1 NLRR-1C.YFP y se tiñeron con anticuerpo monoclonal seguido por anticuerpo secundario contra IgG de ratón marcado con alexa 647 NLRR-1C está truncado en el aminoácido 681, borrando el motivo de endocitosis mediado por clatrina. Se recogieron 10.000 casos y se clasificaron en FSC, SSC, PI, e YFP. Los datos representan las unidades de fluorescencia relativa promedio. **5B**: Detección de EGFR mediante citometría de flujo tras la inactivación del ARNip con NLRR-1. Se recogieron 10.000 casos y se clasificaron en FSC, SSC, y PI. Se representaron en gráficas las unidades de fluorescencia promedio.

La **Figura 6** muestra la inactivación del ARNip de línea de células tumorales en NLRR-1. **6A**: Análisis del transcrito de NLRR-1 utilizando RT-PCR sobre las inactivaciones de ARNip de NLRR-1 en líneas de células tumorales. Se normalizaron los datos utilizando la expresión de RPL19. **6B**: Se representó gráficamente el defecto en la viabilidad celular con la inactivación del ARNip de NLRR-1 como un porcentaje del control. Los datos representan los promedios de los triplicados \pm SD. **6C**: Apoptosis inducida mediante privación de alimento en líneas de células tumorales con inactivación del ARNip de NLRR-1. Se midió la apoptosis mediante la actividad de la caspasa 3/7 y se normalizó para las células viables en réplicas emparejadas. Los datos representan los promedios de los triplicados \pm SD.

La **Figura 7** muestra la fosforilación de ERK y AKT. **7A-E**: Fosforilación de ERK medida mediante citometría de flujo. Se privó de alimento a las células y se trataron tanto con anticuerpo monoclonal α -ragweed o α -NLRR-1 y a continuación se estimularon con un curso temporal mediante **A**: 10 % de suero **B**: 50 nM de TGF α . **C**: 100 ng/ml de EGF **D**: 1ng/ml de EGF **E**: 0,01ng/ml de EGF: α -ragweed (\square); α -NLRR (\blacktriangle) **7F-I**: Fosforilación de AKT medida mediante citometría de flujo. Se privó de alimento a las células y se trataron tanto con α -ragweed como con anticuerpo monoclonal α -NLRR-1 y a continuación se estimularon con un curso temporal con **F**: 10 % de suero **G**: 50 nM de TGF α **H**: 1 ng/ml de EGF **I**: 0,01ng/ml de EGF: α -ragweed (\square), α -NLRR-1 (\blacktriangle). **7J-K**: Fosforilación de ERK tras estimulación con 50 nM de TGF α comparando el anticuerpo monoclonal α -ragweed, el anticuerpo monoclonal α -NLRR y erlotinib a 2,5 μ M. **J**: curso de tiempo **K**: se representó gráficamente a los 16 minutos como un porcentaje de α -ragweed del control. α -ragweed (\square); α -NLRR-1 (\blacktriangle), Erlotinib 2,5 μ M (\bullet); Erlotinib 0,25 μ M (X). Para la citometría de flujo, Se recogieron 5.000 a 10.000 casos y se clasificaron en FSC y SSC.

La **Figura 8** muestra la sinergia de la inactivación del ARNip de NLRR-1 y erlotinib. Se midió la apoptosis en respuesta al inhibidor de EGFR erlotinib en líneas de células tumorales **8A**: NCI-H647 **8B**: NCI-H1781 **8C**: NCI-H226, **8D**: NCI-H520 **8E**: NCI-H2009 **8F**: SK-MES-1 (NLRR-1 negativo) con un ARNip del control (o un ARNip de NLRR-1 (R, resistente a erlotinib (CI50>8 μ M); S, sensible a erlotinib (CI50>2 μ M);

La **Figura 9** muestra la expresión del transcrito de NLRR1 y NLRR-3. **9A**: Análisis mediante RT-PCR de NLRR-1 en mieloma múltiple (MM). Se aisló ARN de mieloma múltiple a partir de células CD138+ purificadas a partir de médula ósea.

los datos representan la cantidad calculada usando una curva normalizada de ADN genómico humano. hu BM, médula ósea humana (Clontech); hu de bazo, bazo humano (Clontech); B normal; células B normales (Clontech); LnCAP, línea de células de tumor de próstata. **9B:** Expresión de NLRR-3 en tejidos normales (N) frente a tumorales (T) tal como se determinó mediante el análisis de la micromatriz.

5 La **Figura 10** muestra el nivel del transcrito en comparación con diversos tumores. **10A:** CBL frente a EGFR en tumores 2003 tal como se midió mediante el análisis de la micromatriz. **10B:** E-caderina (CDH1) frente a EGFR tumores 2003 tal como se midió mediante el análisis de la micromatriz.

10 La **Figura 11** muestra la fosforilación de ERK con anticuerpos α -ragweed o α -NLRR-1. **11A:** las gráficas de citometría de flujo con ERK fosforilado tras el tratamiento con α -ragweed o anticuerpo monoclonal α -NLRR-1, privación de alimento, y estimulación con suero al 10 %. Se recogieron 5.000 a 10.000 casos y se clasificaron las células en FSC y SSC. **11B:** Resumen de la inhibición de un anticuerpo α -NLRR-1 de fosforilación de ERK con estimulación suero al 10 % sobre 5 experimentos llevados a cabo de manera independiente representados gráficamente como un porcentaje de α -ragweed del control. Los datos representan los promedios \pm SE. Los resultados de un test de la T unilateral son estadísticamente significativos (*) a los 8 minutos, $p=0,013$ y a 16 minutos $p=0,023$. **11C:** Fosforilación de ERK de NCI-H520 ERK con estimulación sérica tal como se midió mediante citometría de flujo. α -ragweed (Y); α -NLRR-1 (\blacktriangle).

20 La **Figura 12** muestra las fusiones de NLRR-1 y Δ C YFP. **12A:** Diagrama de construcciones de proteínas de fusión: secuencia blanca: dominio extracelular de NLRR-1, secuencia sombreada: región transmembrana, secuencia negra: motivo de endocitosis mediada por clatrina secuencia sombreada: YFP. **12B:** Detección de NLRR-1 mediante citometría de flujo de las proteínas de fusión: Se transfectaron transitoriamente células HEK293 con el vector pEYFP, NLRR-1.YFP, o NLRR-1 y se tiñeron con el anticuerpo monoclonal α -NLRR-1 seguido por anticuerpo secundario dirigido contra Ig de α -ratón marcado con alexa 647. Se recogieron 10.000 casos y se clasificaron las células en FSC, SSC, PI, e YFP.

25 La **Figura 13** muestra los niveles del transcrito de TGF α (13A) y EGF (13B) en tejidos normales (N) y tumorales (T) tal como se midió mediante el análisis de la micromatriz.

30 La **Figura 14** muestra células HEK293 transfectadas transitoriamente con NLRR-1.YFP teñidas con anticuerpos monoclonales α -NLRR-1 seguido por anticuerpo secundario dirigido contra Ig α de ratón marcado con alexa 647, y se analizaron mediante citometría de flujo. Se recogieron 10.000 casos y se clasificaron en FSC, SSC, PI, e YFP.

35 La **Figura 15** muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 1) de NLRR-1 humana.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

40 La expresión "Repetición Neuronal Rica en Leucina" o "NLRR" tal como se usa en el presente documento, se refiere, salvo que se indique otra cosa, a cualquier polipéptido NLRR natural o variante (tanto natural como sintético). En general, la familia de la proteína NLRR contiene 11 o 12 LRR, un dominio de inmunoglobulina, y un dominio de fibronectina de tipo III (Bormann y col., 1999; Fukamachi y col., 2001; Hayata y col., 1998). Los miembros de la familia NLRR incluye NLRR-1, NLRR-2, NLRR-3, NLRR-4, NLRR-5, y NLRR-6. Se ha aislado y caracterizado NLRR-1 humana. Véase, por ejemplo, Número de acceso del Genbank AAQ88679, Patente de los Estados Unidos N° 7.189.813, y Patente de los Estados Unidos N° 20050208523. y Patente de los Estados Unidos N° 20060002943. las divulgaciones de las cuales se incorporan por referencia en su totalidad en el presente documento. En la Figura 15 se presentan la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos de la NLRR-1 humana.

50 La expresión "NLRR silvestre" se refiere generalmente a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína NLRR que se produce naturalmente. La expresión "secuencia NLRR silvestre" se refiere generalmente a una secuencia de aminoácidos que se encuentra en una NLRR que se produce naturalmente.

55 La expresión "variante de NLRR" tal como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido NLRR que incluye una o más mutaciones de aminoácidos en la secuencia NLRR natural. De manera opcional, la una o más mutaciones de aminoácidos incluye sustitución(es) de aminoácidos.

60 Un polipéptido de "secuencia natural" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido derivado de la naturaleza. De esta manera, un polipéptido de secuencia natural puede tener la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que se produce naturalmente procedente de cualquier mamífero. Dicho polipéptido de secuencia natural se puede aislar de la naturaleza o se puede producir por medios recombinantes o sintéticos. La expresión polipéptido de "secuencia natural" abarca específicamente las formas truncadas o secretadas del polipéptido que se produce naturalmente (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), las formas variantes que se producen naturalmente (por ejemplo, alternativamente, las formas de corte y empalme) y las

65

variantes alélicas del polipéptido que se producen naturalmente.

Una "variante" de polipéptido significa un polipéptido biológicamente activo que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con el polipéptido de la secuencia natural. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, los polipéptidos donde uno más restos de aminoácidos se añaden, o eliminan, en el extremo N o C del polipéptido. Ordinariamente, una variante tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de la secuencia de aminoácidos, una variante tendrá al menos aproximadamente un 90 % de identidad de la secuencia de aminoácidos, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con el polipéptido de la secuencia natural.

Por "EGFR" se entiende el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico del polipéptido receptor de la tirosina quinasa que se describe en Ullrich y col, *Nature* (1984) 309:418425, denominado alternativamente como el producto del gen Her-1 y el gen c-erbB, así como sus variantes tales como EGFRvIII. Las variantes de EGFR incluyen también variantes de delección, sustitución e inserción, por ejemplo aquellas descritas en Lynch y col (*New England Journal of Medicine* 2004, 350(2129), Paez y col (*Science* 2004, 304(1497), Pao y col (*PNAS* 2004, 101:13306).

Una "muestra biológica" (denominada indistintamente "muestra" o "muestra de tejido o célula" abarca varios tipos de muestras obtenida de un individuo y se puede utilizar en un ensayo diagnóstico o en un ensayo de vigilancia. La definición abarca muestras de sangre y otros líquidos de origen biológico, muestras de tejido sólido tales como un espécimen de biopsia o cultivos de tejidos o células derivados de los anteriores, y su progenie. La definición incluye también muestras que se han manipulado de cualquier manera después de su obtención, tales como mediante tratamiento con reactivos, solubilización, o enriquecimiento de determinados componentes, tales como proteínas o polinucleótidos, o incluyéndolas en una matriz semisólida o sólida a fines de división en secciones. La expresión "muestra biológica" abarca una muestra clínica, e incluye también células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados de células, suero, plasma, fluido biológico, y muestras de tejidos. La fuente de la muestra de muestras biológicas como una muestra de un órgano o tejido reciente, congelado y/o preservado o de biopsia o aspirado; sangre o cualquier constituyente sanguíneo; fluidos corporales tales como fluido cerebroespinal, fluido amniótico, fluido peritoneal, o fluido intersticial; células de cualquier tiempo en gestación o desarrollo del sujeto. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de un tumor primario o metastásico. La muestra biológica puede contener compuestos que no se entremezclan naturalmente con el tejido en la naturaleza tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos, o similares.

Un "antagonista de NLRR-1" (denominado indistintamente "inhibidor de NLRR-1") es un agente que interfiere con la función de NLRR-1. Los ejemplos de antagonistas de NLRR-1 incluyen anticuerpos que se unen a NLRR-1 ("anticuerpos dirigidos contra NLRR-1"); antagonistas de moléculas pequeñas de NLRR-1; moléculas de ARN de sentido contrario e inhibidor (por ejemplo, ARNsh o ARNip) Preferentemente, el antagonista de NL-RR1 es un anticuerpo o molécula pequeña que se une a NLRR-1. En una realización particular, un antagonista de NLRR-1 tiene una afinidad de unión (constante de disociación) con NLRR-1 de aproximadamente 1.000 nM o menos. En otra realización, un antagonista de NLRR-1 tiene una afinidad de unión con NLRR-1 de aproximadamente 100 nM o menos. En otra realización, un antagonista de RLL-1 tiene una afinidad de unión con NLRR-1 de aproximadamente 50 nM o menos. En una realización particular, un antagonista de NLRR-1 inhibe NLRR-1 con una CI50 de 1.000 o menos. En otra realización, un antagonista de NLRR-1 inhibe NLRR-1 con una CI50 de 500 o menos. En otra realización, un antagonista de NLRR-1 inhibe NLRR-1 con una CI50 de 50 o menos.

Un "antagonista de EGFR" (denominado indistintamente "inhibidor de EGFR") es un agente que interfiere con la actividad o función de NLRR-1. Los ejemplos de antagonistas de EGFR incluyen anticuerpos para EGFR que se unen a EGFR ("anticuerpos dirigidos contra EGFR"); anticuerpos dirigidos contra el ligando de EGFR; antagonistas de moléculas pequeñas de EGFR; inhibidores de la tirosina quinasa de EGFR; moléculas de ARN de sentido contrario e inhibidor (por ejemplo, ARNsh y ARNip por ejemplo, documento WO2004/87207). Preferentemente, el antagonista de EGFR es un anticuerpo o molécula pequeña que se une a EGFR. En algunas realizaciones, el antagonista de EGFR es un dirigido contra EGFR. En una realización particular, un antagonista de EGFR tiene una afinidad de unión (constante de disociación) con EGFR de aproximadamente 1.000 nM o menos. En otra realización, un antagonista de EGFR tiene una afinidad de unión con EGFR de aproximadamente 100 nM o menos. En otra realización, un antagonista de EGFR tiene una afinidad de unión con EGFR de aproximadamente 50 nM o menos. En una realización particular, un antagonista de EGFR inhibe la señalización de EGFR con una CI50 de 1.000 o menos. En otra realización, un antagonista de EGFR inhibe la señalización de EGFR con una CI50 de 500 o menos. En otra realización, un antagonista de EGFR inhibe la señalización de EGFR con una CI50 de 50 o menos.

Los antagonistas de EGFR incluyen agentes terapéuticos que se unen a EGFR e inhiben la activación de EGFR. Los ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, Patente de los Estados Unidos N° 4.943. 533, Mendelsohn y col.) y sus variantes, tales como 225 quimerizada (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) 225 humana reconvertida 225 (H225) (véase, documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo dirigido contra EGFR completamente humano (Imclone); los anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo I (Patente de los Estados Unidos 5.212.290) anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR tal como se

describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF (véase el documento WO98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto y col. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) una anticuerpo humanizado dirigido contra EGFR que compite con EGF y TGF-alfa por la unión con EGFR; y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns y col., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo dirigido contra EGFR puede estar conjugado con un agente citotóxico, generando de esta manera un inmunocombinado *por ejemplo*, EP659.439A2, Patente de Merck GmbH).

Los antagonistas de EGFR incluyen también pequeñas moléculas tales como los compuestos descritos en los documentos US5616582, US5457105, US5475001, US5654307, US5679683, US6084095, US6265410, US6455534, US6521620, US6596726, US6713484, US5770599, US6140332, US5866572, US6399602, US6344459, US6602863, US6391874, WO9814451, WO9850038, WO9909016, WO9924037, WO9935146, WO0132651, US6344455, US5760041, US6002008, US5747498. Los antagonistas de EGFR de molécula pequeña concretos incluyen (CP-358774, erlotinib, OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, diclorhidrato de N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxil]-6-quinazolinil]-, Pfizer Inc.); Iressa® (ZD1839, gefitinib, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metil-fenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluorofenil)-N2-(1-metil-piperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidina-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletil)amino]-1H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxfenil)-4-[(1-feniletil)amino]-7H-pirrolo[2,3-d]primidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butenamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida); lapatinib (Tykerb, GlaxoSmithKline); ZD6474 (Zactima, AstraZeneca); CUDC-101 (Curis); canertinib (CI-1033); AEE788 (6-[4-[(4-etil-1-piperazinil)metil]fenil]-N-[(1R)-1-feniletil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina, WO2003013541, Novartis) y PKI166 4-[4-[[[(1R)-1-feniletil]amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol, documento WO9702266 de Novartis).

"Activación de EGFR" se refiere a la activación, o fosforilación, de EGFR. En general, La activación de EGFR da como resultado la transducción de la señal (producida por ejemplo por un dominio de quinasa intracelular de los restos de tirosina que fosforilan el receptor de EGFR en EGFR o un polipéptido sustrato). La activación de EGFR puede estar mediada por la unión al ligando de EGFR con un dímero de EGFR que comprende EGFR. La unión del ligando de EGFR con un dímero de EGFR puede activar un dominio de quinasa de uno o más de los EGFR en el dímero y da como resultado por tanto la fosforilación de los restos de tirosina en uno o más de los EGFR y/o la fosforilación de los restos de tirosina en un(os) polipéptido(s) adicional(es) del sustrato.

Por cáncer "resistente a antagonista de EGFR" o un cáncer que es "resistente al tratamiento con un antagonista de EGFR" se entiende que el paciente con cáncer ha progresado al recibir un tratamiento con un antagonista de EGFR (es decir, el paciente es "resistente a EGFR"), o el paciente ha progresado en 12 meses (por ejemplo, en uno, dos, tres, o seis meses) tras completar un régimen de tratamiento basado en EGFR. Por ejemplo, cánceres que incorporan el mutante T790M de EGFR son resistentes a un tratamiento con erlotinib y gefitinib. Una célula tumoral "resistente a un antagonista de EGFR" que no responde al tratamiento con un antagonista de EGFR. Por ejemplo, la célula tumoral continúa sobreviviendo con el antagonista de EGFR y no experimenta la apoptosis.

Por cáncer "resistente a erlotinib" o un cáncer que es "resistente al tratamiento con erlotinib" se entiende que el paciente con cáncer ha progresado al recibir un tratamiento basado en EGFR (es decir, el paciente es "resistente a erlotinib"), o el paciente ha progresado en 12 meses (por ejemplo, en uno, dos, tres, o seis meses) tras completar un régimen de tratamiento basado en erlotinib. Una célula tumoral "resistente a erlotinib" significa un tumor que no responde al tratamiento con erlotinib. Por ejemplo, la célula tumoral continúa sobreviviendo con el antagonista erlotinib y no experimenta la apoptosis.

La expresión "independiente de ligando", tal como se usa en el presente documento, como por ejemplo, aplicado a la actividad de señalización del receptor, se refiere a la actividad de señalización que no es dependiente de la presencia de un ligando. Por ejemplo, La señalización de EGFR puede ser el resultado de la dimerización con otros miembros de la familia HER tales como HER2. Un receptor que tiene la actividad quinasa independiente de ligando no presupondrá necesariamente la unión del ligando a este receptor para producir la activación adicional de la actividad quinasa.

El término "constitutivo", tal como se usa en el presente documento, como por ejemplo, aplicado a la actividad quinasa del receptor, se refiere a la actividad de señalización continua de un receptor que no es dependiente de la presencia de un ligando u otras moléculas de activación. Por ejemplo, La variante III de EGFR (EGFRvIII) que se encuentra comúnmente en glioblastoma multiforme ha perdido mucho de su dominio extracelular. Aunque los ligandos son incapaces de unirse a EGFRvIII están no obstante continuamente activos y se asocian con la proliferación y supervivencia anómalas. Dependiendo de la naturaleza del receptor, toda la actividad puede ser constitutiva o la actividad del receptor puede activarse adicionalmente mediante la unión de otras moléculas (por ejemplo, ligandos). Los acontecimientos celulares que conducen a la activación son bien conocidos entre las personas normalmente expertas en la materia. Por ejemplo, la activación puede incluir la oligomerización, por ejemplo, dimerización, trimerización, etc., en complejos receptores de orden superior. Los complejos pueden comprender una especie individual de proteína, es decir, un complejo homomérico. Alternativamente, los complejos pueden comprender al menos dos especies diferentes de proteínas, es decir, un complejo heteromérico. La formación del complejo se puede producir mediante, por ejemplo, la expresión en exceso de formas normales o mutantes del receptor sobre la superficie de una célula. La formación del complejo puede producirse también por

una mutación o mutaciones específicas en un receptor.

La frase "amplificación génica" se refiere a un procedimiento por el cual se forman múltiples copias de un gen o fragmento de gen en una célula o línea celular concreta. La región duplicada (un tramo de ADN amplificado) se denomina "amplicón". Habitualmente, la cantidad de ARN mensajero (ARNm) producido, es decir, el nivel de expresión génica, aumenta también en la proporción del número de copias realizadas del gen concreto expresado.

Un cáncer o muestra biológica que muestra la expresión, la amplificación, o la activación de EGFR" es uno que, en un ensayo diagnóstico, expresa (que incluye expresa en exceso) EGFR, tiene amplificado el gen EGFR, y/o demuestra de otra forma la activación o la fosforilación de EGFR.

Un cáncer o muestra biológica que "no muestra la expresión, la amplificación, o la activación de EGFR" es uno que, en un ensayo diagnóstico, no expresa (que incluye expresa en exceso) EGFR, no tiene amplificado el gen EGFR, y/o no demuestra de otra forma la activación o la fosforilación de EGFR.

Un cáncer o muestra biológica que "muestra la activación de EGFR" es uno que, en un ensayo diagnóstico, demuestra la activación o la fosforilación de EGFR. se puede determinar dicha activación directamente (midiendo por ejemplo la fosforilación de EGFR mediante ELISA) o de manera indirecta.

Un cáncer o muestra biológica que "no muestra la activación de EGFR" es uno que, en un ensayo diagnóstico, no demuestra la activación o la fosforilación de EGFR. Dicha activación puede determinarse directa (midiendo, por ejemplo, la fosforilación del EGFR mediante ELISA) o indirectamente.

Un cáncer o muestra biológica que "muestra la amplificación del EGFR" es uno que, en un ensayo de diagnóstico, tiene amplificado el gen de EGFR.

Una célula cancerosa con "expresión o amplificación en exceso de EGFR" es uno que tiene niveles significativamente superiores de proteína o gen EGFR en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha expresión en exceso se puede producir mediante amplificación génica o mediante transcripción o traducción aumentada. Se puede determinar la expresión o amplificación en exceso de EGFR en un ensayo diagnóstico o pronóstico evaluando los niveles aumentados de la proteína EGFR presente sobre la superficie de una célula (por ejemplo, mediante un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). Alternativa, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica EGFR en la célula, *por ejemplo*, mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre, 1998), transferencia de Southern, o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa en tiempo real (cRT-PCR). Además de los anteriores ensayos, están disponibles diversos ensayos *in vivo* para el especialista experto. Por ejemplo, se pueden exponer células en el interior del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está marcado opcionalmente con una marca detectable, por ejemplo, un isótopo radioactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a las células en el paciente, por ejemplo, mediante barrido externo de la radioactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente anteriormente expuesto al anticuerpo.

Una célula cancerosa que "expresa o amplifica en exceso el EGFR" es una que no tiene niveles mayores de los normales de proteína o gen EGFR en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido.

El término "mutación", tal como se usa en el presente documento, significa una diferencia en la secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleico de una proteína o ácido nucleico concretos (gen, ARN) con respecto a la proteína o ácido nucleico silvestre, respectivamente. Una proteína o ácido nucleico mutado se puede expresar a partir de o encontrarse en un alelo (heterocigótico) o ambos alelos (homocigótico) de un gen, y puede ser una línea somática o germinal. En la presente invención, las mutaciones son generalmente somáticas. Las mutaciones incluyen redistribuciones de secuencias tales como inserciones, deleciones, y mutaciones puntuales (que incluyen polimorfismos de nucleótidos/aminoácidos individuales).

"Inhibir" es disminuir o reducir una actividad, función, y/o cantidad en comparación con la de referencia.

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

En el presente documento, una muestra o célula que "expresa" una proteína de interés es una que codifica el ARNm de la proteína, o la proteína, incluyendo fragmentos de las mismas, se determina para estar presente en la muestra o la célula.

Un "inmunoconjugado" (denominado indistintamente "conjugado de anticuerpo-fármaco", o "ADC") significa un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento; una toxina (por ejemplo, una toxina de proteína, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, la planta, o animal, o sus fragmentos), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

La expresión "región Fc", tal como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a un complejo dimérico que comprende secuencias del polipéptido del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, donde una secuencia del polipéptido del extremo C es la que es obtenible mediante digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede comprender secuencias de Fc naturales o variantes. Aunque los límites de la secuencia de Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la secuencia de Fc de la cadena pesada de IgG se define usualmente para extenderse desde un resto de aminoácido en la posición Cys226, o desde aproximadamente la posición pro230, hasta el extremo carboxilo de la secuencia de Fc. La secuencia de Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y comprende opcionalmente un dominio CH4. La lisina del extremo C (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o mediante ingeniería genética del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. De acuerdo con ello, una composición que comprende un anticuerpo que tiene una región Fc de acuerdo con la presente invención puede comprender un anticuerpo con K447, con todo K447 eliminado, o una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

Por "polipéptido Fc" en el presente documento se entiende uno de los polipéptidos que forma una región Fc. Se puede obtener un polipéptido Fc a partir de cualquier inmunoglobulina adecuada, tal como los subtipos IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄, IgA, IgE, IgD o IgM. En algunas realizaciones, un polipéptido Fc comprende parte o toda una secuencia bisagra natural (generalmente en su extremo N). En algunas realizaciones, un polipéptido Fc no comprende una secuencia funcional o natural.

La "región bisagra", "secuencia bisagra", y sus variaciones, tal como se usa en el presente documento, incluyen el significado conocido en la materia, que se ilustra en, por ejemplo, Janeway y col., *Immuno Biology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (4^a ed., 1999); Bloom y col., *Protein Science* (1997), 6:407-415; Humphreys y col., *J. Immunol. Methods* 1997: 209:193-202.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones la numeración de los restos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU como en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), que se han incorporado expresamente por referencia en el presente documento, El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de un resto del anticuerpo EU de la IgG1 humana.

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales (que incluyen los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes, y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad de unión al antígeno deseada.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden solo una porción de un anticuerpo intacto, donde la porción conserva preferentemente al menos uno, preferentemente la mayor parte o todas, las funciones normalmente asociadas con esta porción cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y conserva de esta manera la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, uno que comprende la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, la modulación de la vida media del anticuerpo, función de ADCC y unión al complemento. En una realización, un fragmento de unión es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida in vivo sustancialmente similar a la de un anticuerpo intacto. Por ejemplo, de tal manera que un fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno unido a una secuencia de Fc capaz de conferir la estabilidad in vivo al fragmento. En una realización, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de un brazo tal como se describe en el documento WO2005/063816. En una realización, el anticuerpo de un brazo comprende mutaciones de Fc que constituyen "protuberancias" y "orificios" tal como se describe en el documento WO2005/063816. Por ejemplo, una mutación completa puede ser una o más de T366A, L368A y/o Y407V en un polipéptido Fc, y una mutación cavidad puede ser T366W.

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Algunos anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben la actividad biológica del antígeno.

Salvo que se indique otra cosa, la expresión "anticuerpo multivalente" se usa a lo largo de esta memoria descriptiva para denotar un anticuerpo que comprende tres o más sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente se diseña preferentemente mediante ingeniería genética para tener tres o más sitios de unión a antígeno y es generalmente una secuencia no natural de IgM o IgA.

Un fragmento "Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en estrecha asociación, que puede ser covalente en la naturaleza, por ejemplo en scFv. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del

dímero V_H - V_L . En conjunto, las seis CDR o un subconjunto de las mismas confieren la especificidad de unión a antígeno del anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque usualmente a una afinidad más baja que el sitio de unión completo.

5 Tal como se usa en el presente documento, "dominio variable de anticuerpo" se refiere a las porciones de las cadenas ligera y pesada de las moléculas de anticuerpo que incluyen secuencias de aminoácidos de Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2, y CDR3), y Regiones Marco (FR). V_H se refiere al dominio variable de la cadena pesada. V_L se refiere al dominio variable de la cadena ligera. De acuerdo con los métodos usados en la presente invención, las posiciones de aminoácidos asignadas a las CDR y FR se pueden definir de acuerdo con Kabat (Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991). La numeración de los aminoácidos de los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno está también de acuerdo con la de Kabat.

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "Regiones determinantes de la Complementariedad" (CDR; es decir, CDR1, CDR2, y CDR3) se refiere a los restos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo, la presencia de los cuales es necesaria para la unión al antígeno. Cada dominio variable tiene normalmente tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región determinante de la complementariedad puede comprender restos de aminoácidos procedentes de una "región determinante de la complementariedad" tal como se define por Kabat (es decir, aproximadamente los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)) y/o aquellos restos procedentes de un "bucle hipervariable" (es decir, aproximadamente los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). En algunos casos, una región determinante de la complementariedad puede incluir los aminoácidos procedentes de una región CDR definida de acuerdo con Kabat y un bucle hipervariable. Por ejemplo, la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo 4D5 incluye los aminoácidos 25 a 35.

30 "Regiones marco" (FR a partir de ahora en el presente documento) son aquellos restos de dominio variable diferentes de los restos de las CDR. Cada dominio variable tiene normalmente cuatro FR identificados como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si las CDR se definen de acuerdo con Kabat, los restos FR de la cadena ligera se sitúan en aproximadamente los restos 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3), y 98-107 (LCFR4) y los restos FR de la cadena pesada se sitúan aproximadamente en los restos 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3), y 103-113 (HCFR4) en los restos de la cadena pesada. Si las CDR comprenden restos de aminoácidos de los bucles hipervariables, los restos FR de la cadena ligera se sitúan en aproximadamente los restos 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3), y 97-107 (LCFR4) y los restos FR de la cadena ligera y la cadena pesada se sitúan aproximadamente en los restos 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3), y 102-113 (HCFR4) en los restos de la cadena pesada. En algunos casos, cuando la CDR comprende los aminoácidos procedentes de una CDR tal como define Kabat y aquellos de un bucle hipervariable, Los restos FR se ajustarán de acuerdo con él. Por ejemplo, cuando CDRH1 incluye los aminoácidos H26-H35, los restos FR1 de la cadena pesada están en las posiciones 1-25 y los restos FR2 están en las posiciones 36-49.

45 El fragmento "Fab" contiene un dominio variable y constante de la cadena ligera y un dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos del anticuerpo $F(ab')_2$ comprende una pareja de fragmentos Fab que se unen generalmente de manera covalente próximos a sus extremos carboxilo mediante cisteínas bisagra entre ellos. Se conocen en la materia otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

50 "Fv de cadena única" o fragmentos de anticuerpos "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies Vol 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

55 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H y V_L). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen los diacuerpos más completamente, por ejemplo, en el documento EP 404.097; documento WO 93/11161, y Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

65 La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata y col., Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden una pareja de segmentos Fd en tándem (V_H - C_H1 - V_H - C_H1) que, junto con los polipéptidos complementarios de cadena ligera, forman una pareja de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o mono-específicos.

El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se ha obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y esto no se debe de tomar como una necesidad de preparar el anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente invención se pueden fabricar a partir de varias técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo y col., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988). Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos nº 4.816.567), tecnologías de expresión en fagos (véase, por ejemplo, Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991). Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222: 58,1-597 (1992). Sidhu y col., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004). Lee y col., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004). Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34), 12467-12472 (2004). y Lee y col., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos de tipo humano en animales que tienen partes o todos los loci o genes de la inmunoglobulina humana que codifican secuencias de la inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento WO 1998/24893, el documento WO 1996/34096, el documento WO 1996/33735, el documento WO 1991/10741, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature* 362: 255-258 (1993). Bruggemann y col., *Year in Immunol.* 7:331993, Patentes de los Estados Unidos con números 5.545.807, 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks y col., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992). Lonberg y col., *Nature* 368: 856-859 (1994). Morrison, *Nature* 368: 812-8,13 (1994). Fishwild y col., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996). Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995)).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con su homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivadas de una especie concreta o que comienzan con una clase o subclase concreta de anticuerpo, mientras que el(los) resto(s) de la(s) cadena(s) es(son) idéntico(s) a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como a los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos 4.816.567, y en Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATIZED® donde la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva del anticuerpo procedente de un anticuerpo producido mediante, por ejemplo, monos macaco inmunizados con el antígeno de interés.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor están sustituidos por los restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco Fv (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los restos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones y col., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha preparado utilizando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos que se describen en el presente documento. Esta definición de anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprenden restos de unión a antígeno de origen no humano. Los anticuerpos humanos se pueden preparar usando varias técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, en la que la biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y col. *Nature Biotechnology* 14:309-314 (1996); Sheets y col. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:6157-6162 (1998)). Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). se pueden preparar también anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulinas en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de la inmunoglobulina endógena ase han inactivado parcial o completamente. Tras el estímulo se observó producción de anticuerpos humanos, que se asemeja estrechamente a la observada en seres humanos en todos los aspectos incluyendo la redistribución de genes, el ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos. esta solución se describe, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Números 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks y col., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992). Lonberg y col., *Nature* 368: 856-859 (1994). Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996). Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:

826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995). Alternativa, se puede preparar el anticuerpo humano mediante la inmortalización de linfocitos B humanos produciendo un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (de tal manera que se pueden recuperar los linfocitos B de un individuo o se pueden haber inmunizado in vitro). Véase, por ejemplo, Cole y col., Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77(1985). Boerner y col., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991); y la patente de los Estados Unidos nº 5.750.373.

Un "anticuerpo puro" es un anticuerpo que no está conjugado con una molécula heteróloga, tal como un resto o radiomarca citotóxica.

Un anticuerpo "madurado mediante afinidad" es un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo progenitor que no posee aquella(s) alteración(es). Los anticuerpos madurados mediante afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados mediante afinidad están producidos mediante procedimientos conocidos en la materia. Marks y col., Bio/Technology 10:779-783 (1992) describe la maduración mediante afinidad del dominio lanzadera de VH y VL. La mutagénesis aleatoria de CDR y/o de los restos marco se describe mediante: Barbas y col. Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier y col. Gene 169:147-155 (1995). Yelton y col., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson y col., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995). y Hawkins y col., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

Un anticuerpo que tiene una "característica biológica" de un anticuerpo designado es uno que posee una o más de las características biológicas de este anticuerpo que le distingue entre otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno.

Para seleccionar los anticuerpos que se unen a un epítipo sobre un antígeno unido por un anticuerpo de interés se puede llevar a cabo un ensayo de bloqueo cruzado tal como se describe en Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), para aumentar la vida media de los anticuerpos o del polipéptido que contiene las secuencias de aminoácidos de la presente invención, se puede unir un epítipo de unión de un receptor salvaje al anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo), como se ha descrito, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos 5.739.277. Por ejemplo, se puede unir una molécula de ácido nucleico que codifica el epítipo de unión del receptor salvaje en marco con un ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica de la presente invención de tal manera que la proteína de fusión expresada por la molécula de ácido nucleico diseñada mediante ingeniería genética comprenda el epítipo de unión del receptor salvaje y una secuencia polipeptídica de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión del receptor salvaje" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (*por ejemplo*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable de aumentar la vida media sérica de la molécula de IgG *in vivo* (*por ejemplo*, Ghetie y col., Ann. Rev. Immunol., 18:739-766 (2000). Tabla 1). los anticuerpos con sustituciones en una región Fc de los mismos vidas medias en suero aumentadas se describen también en el documento WO00/42072, el documento WO 02/060919, Shields y col., J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001); Hinton, J. Biol. Chem. 279:6213-6216 (2004)). En otra realización, se puede aumentar también la vida media en suero, *por ejemplo*, uniendo otras secuencias de polipéptidos. *Por ejemplo*, se pueden unir anticuerpos u otros polipéptidos útiles en los métodos de la invención a la albúmina sérica o a una porción de la albúmina sérica que se une al receptor FcRn o a un péptido de unión a albúmina sérica de tal manera que la albúmina sérica se une al anticuerpo o al polipéptido, *por ejemplo*, dichas secuencias polipeptídicas se describen en el documento EO01/45746.

Un polipéptido "aislado" o anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido o el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el polipéptido o anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95 % en peso del polipéptido o anticuerpo tal como se determina mediante el método de Lowry, y lo más preferente más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos en el extremo N o la secuencia interna de aminoácidos mediante el uso de un secuenciador de copa rotatoria, o 83) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El polipéptido o anticuerpo aislado incluye el polipéptido o anticuerpo *in situ* en células recombinantes debido a que al menos un componente del ambiente natural del polipéptido no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, el polipéptido o anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Por "fragmento" se entiende una porción del polipéptido o molécula de ácido nucleico que contiene, preferentemente, al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, o más de la longitud completa de la molécula de ácido nucleico o del polipéptido de referencia. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100, 200, 300, 400, 500, 600, o más nucleótidos o 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200 aminoácidos o más.

"Tratamiento" se refiere tanto a un tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen los que tienen ya un tumor benigno, precanceroso, o no metastásico así como aquellos en los que se va a evitar la incidencia o la recurrencia del cáncer.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar o evitar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de los cánceres, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor primario; inhibir (es decir, retrasar en alguna extensión y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida que el fármaco puede evitar el crecimiento y/o la destrucción de las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para el tratamiento del cáncer la eficacia *in vivo* puede medirse, por ejemplo, evaluando la duración de la supervivencia, el tiempo de progresión de la enfermedad (TTP), los índices de respuesta (RR) la duración de la respuesta, y/o la calidad de vida.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la dolencia fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento celular no regulado. Incluidos en esta definición están los cánceres benignos y malignos. Por "cáncer de etapa temprana" o "tumor de etapa temprana" se entiende un cáncer que no es invasivo o metastásico o se clasifica como un cáncer en Etapa 0, I, o II. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, mieloma, blastoma (que incluye meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (que incluye liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (que incluyen tumores carcinoides, gastrinoma, y cánceres de células de islotes), mesotelioma, schwannoma (que incluye neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma, y neoplasias leucémicas o linfoides. los ejemplos más concretos de dichos cánceres incluyen el cáncer espinocelular (*por ejemplo*, cáncer espinocelular epitelial), cáncer de pulmón incluyendo cáncer microcítico (SCLC), cáncer de pulmón no microcítico ("NSCLC"), adenocarcinoma del pulmón y cáncer espinocelular del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (que incluye cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o de útero, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, cáncer de testículo, cáncer de esófago, tumores del tracto biliar, así como cáncer de cabeza y cuello.

El término "cáncer" incluye cánceres hematopoyéticos o cánceres de la sangre relacionados, tales como linfoma, leucemia, mieloma o neoplasias linfoides, y también cánceres del bazo y cánceres de ganglios linfáticos. Los ejemplos más concretos de dichos cánceres asociados a linfocitos B, incluyen por ejemplo, linfomas de grado alto, intermedio y bajo (que incluyen linfomas de linfocitos B tales como, por ejemplo, linfoma de linfocitos B de tejido linfoide asociado a mucosa y linfoma no de Hodgkin, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño linfoma de zona marginal, linfoma de células grandes difusas, linfoma folicular, y linfoma de Hodgkin y linfomas de linfocitos T) y leucemias (que incluyen leucemia secundaria, leucemia linfocítica crónica, tales como linfoma de linfocitos B (linfocitos CD5+B), leucemia mieloide, tal como leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoide, tales como leucemia linfoblástica aguda y mielodisplasia) mieloma múltiple, tal como neoplasia de células plasmáticas, y otros cánceres hematológicos y/o asociados a linfocitos B o T. están incluidos también cánceres de células hematopoyéticas adicionales, que incluyen leucocitos polimorfonucleares, tales como basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos, células dendríticas, plaquetas, eritrocitos y linfocitos citolíticos naturales. Los orígenes de los cánceres de linfocitos B son como sigue: los orígenes del linfoma de linfocitos B de zona marginal están en la memoria de los linfocitos b en la zona marginal, el linfoma folicular y el linfoma de linfocitos B grande difuso se originan en los centrocitos en la zona luminosa de los centros germinales, el mieloma múltiple se origina en células plasmáticas, la leucemia linfocítica crónica y la leucemia de linfocitos pequeños se origina en los linfocitos B1 (CD5+), el linfoma de células del manto se origina en los linfocitos B no expuestos en la zona del manto y el linfoma de Burkitts se origina en los centroblastos en la zona oscura de los centros germinales. Los tejidos que incluyen células hematopoyéticas denominados en el presente documento "tejidos de células hematopoyéticas" incluyen el timo y la médula ósea y los tejidos linfoides periféricos, tales como el bazo, los ganglios linfáticos, tejidos linfáticos asociados con la mucosa, tales como los tejidos linfáticos asociados con el intestino, las amígdalas, las placas de peyer y el apéndice y los tejidos linfáticos asociados con otras mucosas, por ejemplo, los revestimientos de los bronquios.

El término "precanceroso" se refiere a una dolencia o un crecimiento que precede normalmente o se desarrolla en un cáncer. Un crecimiento "precanceroso" tendrá células que se caracterizan por una regulación anómala del ciclo, la proliferación, la diferenciación, celular, que se pueden determinar mediante marcadores de regulación del ciclo celular, la proliferación, o la diferenciación celular.

Por "displasia" se entiende cualquier crecimiento o desarrollo anómalo de un tejido, órganos, o células. Preferentemente, la displasia es de grado alto o precancerosa.

Por "metástasis" se entiende la diseminación del cáncer a partir de su sitio primario a otros lugares en el cuerpo. Las células cancerosas pueden dividirse lejos de un tumor primario, penetrar en los vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través del torrente sanguíneo, y crecer en focos distantes (metastatizar) en tejidos normales en otras partes del cuerpo. La metástasis puede ser local o distante. La metástasis es un proceso secuencial, que depende de células tumorales que se dividen del tumor primario, viajan a través del torrente sanguíneo, y se detienen en un sitio distante. En el nuevo sitio, las células establecen un suministro de sangre y pueden crecer para formar una

masa potencialmente fatal.

Las rutas moleculares estimuladoras e inhibitoras en el interior de la célula tumoral regulan este comportamiento, y las interacciones entre las células tumorales y las células hospedadoras en el sitio distante son también significativas.

Por "no metastásico" se entiende un cáncer que es benigno o que sigue permaneciendo en el sitio primario y no ha penetrado en el sistema de vasos linfáticos o sanguíneos o en otros tejidos diferentes que el sitio primario. En general, un cáncer no metastásico es cualquier cáncer que está en la Etapa 0, I, o II del cáncer, y ocasionalmente en la Etapa III del cáncer.

Por "tumor primario" o "cáncer primario" se entiende el cáncer original y no una lesión metastásica localizada en otro tejido, órgano, o localización en el cuerpo del sujeto.

Por "tumor benigno" o "cáncer benigno" se entiende un tumor que sigue localizándose en el sitio de origen y no tiene la capacidad de infiltrar, invadir, o metastatizar en un sitio distante.

Por "carga tumoral" se entiende el número de células cancerosas, el tamaño de un tumor, o la cantidad de cáncer en el cuerpo. La carga tumoral se denomina también carga del tumor.

Por "número tumoral" se entiende el número de tumores.

Por "sujeto" o "paciente" se entiende un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, un mamífero humano o no humano, tal como un bovino, equino, cánido, ovino; o felino, Preferentemente, el sujeto o paciente es un ser humano.

La expresión "tratamiento anticanceroso" se refiere a un tratamiento útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos anticancerosos incluyen, pero no se limita a, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes utilizados en el tratamiento con radiación, agentes antiangiogénesis; agentes apoptóticos, agentes antitubulina, y otros agentes para tratar el cáncer, anticuerpos dirigidos contra CD20, inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, Gleevec™ (Mesilato de Imatinib)), un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones; citoquinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a uno o más de los siguientes receptor(es) de ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o VEGF, TRAIL/Apo2, y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. La combinaciones de los mismos están incluidas también en la invención.

La expresión "agente citotóxico" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o causa destrucción de las células. Se pretende que la expresión incluya los isótopos radioactivos (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal. o sus fragmentos,

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotequina (incluyendo el análogo sintético topotecán), briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus derivados análogos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicamicina, especialmente calicamicina gamma 1I y calicamicina omega 1I (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dineimicina, incluyendo dineimicina A, bifosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromoproteínas relacionadas tales como los cromóforos del antibiótico enediina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); ácido fólico y análogos tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona

propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglucetimidina, mitotano, trilostano; recuperador del ácido fólico tales como el ácido folínico; aceglatona; aldofosfamida glicosido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; y epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansinas y anssamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente la toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretanp; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ exento de cremóforo, formulación de nanopartículas de paclitaxel diseñada mediante ingeniería genética (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; GEMZAR® gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecan (Camptosar, CPT-11) (que incluye el régimen de tratamiento de irinotecan con 5-FU y leucovorina); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina, leucovorina (LV); oxaliplatino, que incluye el régimen de tratamiento con oxaliplatino (FOLFOX); inhibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™) y VEGF-A que reducen la proliferación celular y las sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables. Incluidos también en esta definición están los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los tumores tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON· toremifeno; e inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglucetimidina, MEGASE® megestrol acetato, AROMASIN® exemestano, formestanie, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol, y ARIMIDEX® anastrozol. y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida; leuprólido, y goserelina, así como troxacitabina (un análogo de citosina en el nucleósido 1,3-dioxolano); oligonucleótidos de sentido contrario, especialmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas para terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN®, y la vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; el inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; Vinorelbina y Esperamicinas (véase la patente de los Estados Unidos N° 4.675.187), y las sales farmacéuticamente aceptables. ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

El término "profármaco", tal como se usa en esta solicitud se refiere a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco progenitor y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en una forma progenitora más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382. 615ª Meeting Belfast (1986) y Stella y col., Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt y col., (ed.), pp. 247-267. Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados por D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco exento de citotoxicidad más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivatizar en una forma de profármaco para el uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a: aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Por tratamiento de radiación se entiende el uso de rayos gamma o rayos beta, dirigidos para inducir un daño suficiente a una célula con el fin de limitar su capacidad para funcionar normalmente o para destruir la célula por completo. Se apreciará que existen muchos medios conocidos en la materia para determinar la dosificación y la duración del tratamiento. Se proporcionan tratamientos típicos como una administración temporal y las dosificaciones típicas varían desde aproximadamente 10 a 200 unidades (Grays) por día.

Métodos y composiciones

La invención identifica determinadas propiedades y actividades novedosas de NLRR-1 que se pueden explicar utilizando los métodos de la invención para fines terapéuticos.

Tal como se describe en el presente documento, la NLRR-1 se asocia con el complejo de señalización de EGFR y promueve la activación de la quinasa MAP en respuesta a TGFα, indicando que la NLRR-1 juega un papel significativo en la señalización de EGFR. Adicionalmente, la asociación con NLRR-1 promueve la internalización de EGFR. La señalización procedente del complejo de EGFR internalizado puede amplificar la fosforilación de la

quinasa MAP y estimular las rutas que conducen a la supervivencia celular (Haugh y col., 1999a; Haugh y col., 1999b; Sato y col., 2001; Schoeberl y col., 2002; Wang y col., 2002), coherente con las observaciones de apoptosis aumentada en la reducción de NLRR-1 a partir de células tumorales. Adicionalmente, la NLRR-1 puede asociarse con el heterodímero EGFR/ERBB2.

De acuerdo con ello, La invención proporciona un antagonista de NLRR-1 para el uso en un método de inhibir la señalización de EGFR en una célula de mamífero que comprende poner en contacto la célula con un antagonista de NLRR-1 tal como se define en las reivindicaciones. El nivel de señalización de EGFR se redujo tras el contacto con el antagonista de NLRR-1.

La invención proporciona un antagonista de NLRR-1 para el uso en un método de inhibir la señalización de EGFR en una célula de mamífero que comprende poner en contacto la célula con un agente que inhibe la interacción de EGFR con NLRR-1 tal como se define en las reivindicaciones. La inhibición de la interacción entre EGFR y NLRR-1 por el agente da como resultado una reducción de la señalización de EGFR.

En diversos tumores se observa expresión generalizada de NLRR-1, un homólogo de NLRR-3, y, en un análisis más detallado del transcrito de tumores de próstata, la expresión estaba correlacionada con una puntuación de Gleason elevada y un marcador de pronóstico malo caracterizado de manera independiente, MUC1 (Andren y col., 2006a; Lapointe y col., 2004). Como se muestra en los Ejemplos, la NLRR-1 se expresa no solo en tumores de próstata si no a través de una serie de tumores epiteliales, e incluso algunas neoplasias hematológicas agresivas tales como mieloma múltiple y linfoma de células del manto (Figura 2A, B; Figura 9A) así como en páncreas, mama, pulmón, y colon metastásico.

Se encuentra que el TGF α se encuentra frecuentemente sobreexpresado a lo largo de varios tipos de tumores, está correlacionado con una enfermedad más agresiva y un mal pronóstico, puede funcionar en modalidades tanto autocrinas como paracrinas, y es un fuerte activador de la señalización de EGFR (Ebner y Derynck, 1991; El-Obeid y col., 2002; Jhappan y col., 1990; Jiang y col., 1998; Maeda y col., 2002; Martinez-Arca y col., 2005; O'Dwyer P y Benson, 2002; Scher y col., 1995; Wang y col., 1998) (Figura 13A,B). La atenuación de la activación de la ruta de la quinasa MAP y de la quinasa PI3 utilizando un anticuerpo monoclonal específico de NLRR-1, en respuesta al suero o a TGF α , indica un importante papel de NLRR-1 en la activación de la ruta de EGFR en células tumorales.

Tal como se muestra en los Ejemplos, el agotamiento de NLRR-1 en líneas de células de tumor de pulmón da como resultado un crecimiento disminuido y una apoptosis aumentada a todos los niveles de la expresión de NLRR-1 endógeno, indicando que las células cancerosas tienen una dependencia significativa sobre NLRR-1 para su viabilidad. La expresión de NLRR-1 está inversamente correlacionada con EGFR elevado a través de tumores que indican que NLRR-1 actúa la ruta de señalización de EGF en células tumorales en ausencia de EGFR amplificado. Adicionalmente, el agotamiento de NLRR-1 en líneas de células de tumores de pulmón promueve la apoptosis tras el tratamiento con el inhibidor de EGFR Erlotinib. Fue evidente un significativo aumento en la sensibilidad para la línea de células NCI-H647 por otra parte resistente a erlotinib y se observó sinergia entre la inactivación de NLRR-1 y erlotinib para las líneas de células resistentes. Estos datos indican que NLRR-1 juega un papel significativo en la señalización de EGFR y que NLRR-1 podría contribuir a la resistencia presentada por algunos tumores a los inhibidores de la quinasa de EGFR tales como erlotinib.

La invención proporciona un antagonista de NLRR-1 para el uso en un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto, La invención proporciona un antagonista de NLRR-1 para el uso en un método para inhibir el crecimiento de las células tumorales en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de NLRR-1 tal como se define en las reivindicaciones. Las células tumorales expresan EGFR. En otros casos, las células tumorales expresan EGFR, pero la expresión de EGFR no está amplificada.

En un aspecto, la invención proporciona un antagonista de NLRR-1 para el uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de NLRR-1 tal como se define en las reivindicaciones. Las células del cáncer expresan EGFR. En otras realizaciones, las células del cáncer expresan EGFR, pero la expresión de EGFR no está amplificada.

En determinadas realizaciones, al sujeto se le administra un antagonista de EGFR además del antagonista de NLRR-1. En algunas realizaciones, el cáncer que se va a tratar es resistente al tratamiento con un antagonista de EGFR. En otra realización, el antagonista de EGFR administrado con el antagonista de NLRR-1 es erlotinib. En otra realización, el cáncer que se va a tratar es resistente al tratamiento con erlotinib. En otras realizaciones, la administración del antagonista de NLRR-1 y el antagonista de EGFR aumenta la inhibición del crecimiento del cáncer en comparación con la administración de cualquier antagonista solo. En otras realizaciones, el aumento en la inhibición del cáncer con el tratamiento combinado es sinérgico en comparación con el tratamiento con el antagonista de NLRR-1 o el antagonista de EGFR solo.

El término cáncer abarca una serie de trastornos proliferativos, que incluyen, pero no se limitan a crecimientos precancerosos, tumores benignos, y tumores malignos. Los cánceres que se van a tratar mediante los anteriores

métodos incluyen aquellos cánceres que comprenden un tumor sólido o un tumor no sólido o de tejido blando. Los ejemplos de tumores de tejido blando incluyen leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda en personas adultas, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B maduros, leucemia linfocítica crónica, leucemia polinfocítica, o leucemia de células pilosas), mieloma (mieloma múltiple), o linfoma (por ejemplo, linfoma no de Hodgkin, linfoma cutáneo de linfocitos T, linfoma de células del manto, o enfermedad de Hodgkin). Un tumor sólido incluye cualquier cáncer de tejidos corporales diferente de la sangre, médula ósea, o el sistema linfático. Los tumores sólidos se pueden dividir adicionalmente en aquellos de origen de células epiteliales y aquellos de origen de células no epiteliales. Los ejemplos de tumores sólidos de células epiteliales incluyen tumores del tracto gastrointestinal, colon, mama, próstata, pulmón, de riñón, hígado, páncreas, de ovario, de cabeza y cuello, cavidad oral, estómago, duodeno, intestino delgado, intestino grueso, ano, vesícula biliar, labio, nasofaringe, piel, el útero, órgano genital en varones, órganos urinarios, vejiga, y piel. Los tumores sólidos de origen no epitelial incluyen sarcomas, tumores cerebrales, y tumores óseos.

La invención también se refiere a las composiciones para uso que comprenden los compuestos anteriores, de manera individual y de forma combinada, tal como se describe más adelante en el presente documento. Las composiciones son para tratar una dolencia patológica, tal como un tumor, en un sujeto.

Antagonistas de NLRR-1

Los antagonistas de NLRR-1 útiles en los usos médicos descritos en el presente documento incluyen polipéptidos que se unen específicamente a NLRR-1, anticuerpos para NLRR-1 (anticuerpos dirigidos contra NLRR-1), moléculas pequeñas, moléculas receptoras y derivados, tales como inmunoadhesinas, que se unen específicamente a NLRR-1, y proteínas de fusión. Los antagonistas de NLRR-1 incluyen también variantes antagonísticas de los polipéptidos de NLRR-1, aptámeros de ARN y pepticuerpos dirigidos contra NLRR-1. Los ejemplos de cada uno de estos se describen a continuación.

Los anticuerpos dirigidos contra NLRR-1 que son útiles en los usos médicos descritos en el presente documento incluyen cualquier anticuerpo que se une con suficiente afinidad y especificidad a NLRR-1 y puede reducir o inhibir la actividad de NLRR-1 o inhibir la asociación de NLRR-1 con EGFR o cualquier miembro de la ruta de EGFR, incluyendo, HER2, HER3, y HER4. El anticuerpo seleccionado tendrá normalmente una afinidad de unión suficientemente fuerte por NLRR-1 por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a NLRR-1 humano con un valor Kd de entre 100 nM-1 pM. se pueden determinar las afinidades de la unión mediante una resonancia de plasmón superficial basada en el ensayo del (tal como el ensayo BIAcore que se describe en la Publicación de Solicitud PCT N° WO2005/012359); análisis de adsorción inmunoenzimáticos (ELISA); y ensayos de competición (por ejemplo, RIA), por ejemplo. Preferentemente, el anticuerpo dirigido contra NLRR-1 se puede usar como agente terapéutico en el direccionamiento y la interferencia con enfermedades o dolencias donde está implicada la actividad de NLRR-1/EGFR. Asimismo, el anticuerpo puede someterse a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, a fin de evaluar su eficacia como un agente terapéutico. Se conocen dichos ensayos en la materia y dependen del antígeno diana y del uso previsto para el anticuerpo.

En determinados ejemplos, el anticuerpo dirigido contra NLRR-1 es el anticuerpo producido mediante la línea de células del hibridoma depositado en la American Type Culture Collection con el Número de Acceso ATCC PTA-8732 (hibridoma 3D 1.6.9). En otros ejemplos, el anticuerpo comprende un fragmento del anticuerpo monoclonal producido por la línea de células del hibridoma depositada en la American Type Culture Collection con el Número de Acceso ATCC PTA-8732 (hibridoma 3D 301.6.9). En otros ejemplos, el anticuerpo comprende una o más secuencias de la CDR del anticuerpo monoclonal producido por la línea de células del hibridoma depositada en la American Type Culture Collection con el Número de Acceso ATCC PTA-8732 (hibridoma 3D 301.6.9). En otros ejemplos, el anticuerpo compite por la unión con el anticuerpo monoclonal producido por la línea de células del hibridoma depositada en la American Type Culture Collection con el Número de Acceso ATCC PTA-8732 (hibridoma 3D 301.6.9). En otros ejemplos, el anticuerpo se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal producido por la línea de células del hibridoma depositada en la American Type Culture Collection con el Número de Acceso ATCC PTA-8732 (hibridoma 3D 301.6.9).

Se pueden usar polipéptidos de NLRR-1 o sus fragmentos que se unen específicamente a EGFR, u otros miembros de la ruta de EGFR, en los métodos, por ejemplo, para unirse a y secuestrar la proteína EGFR, evitando por tanto su señalización. Preferentemente, los polipéptidos NLRR-1 o sus fragmentos, son una forma soluble. En algunos ejemplos, una forma soluble del polipéptido ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad biológica de la proteína EGFR mediante la unión a EGFR, evitando por tanto su asociación con sus ligandos naturales.

Los aptámeros son moléculas de ácidos nucleicos que forman estructuras terciarias que se unen específicamente a una molécula diana, tal como un polipéptido NLRR-1. La generación y el uso terapéutico de aptámeros están bien establecidos en la materia. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N° 5.475.096. Se puede encontrar información adicional sobre los aptámeros en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 20060148748.

Un pepticuerpo es una secuencia peptídica unida a una secuencia de aminoácidos que codifica un fragmento o

porción de una molécula de inmunoglobulina. Los polipéptidos se pueden derivar de secuencias aleatorizadas seleccionadas mediante cualquier método para una unión específica, incluyendo pero sin limitarse a, tecnología de expresión en fago. En una realización preferida, el polipéptido seleccionado puede unirse a una secuencia de aminoácidos que codifica la porción Fc de una inmunoglobulina. Los peptidocuerpos que se unen específicamente a y antagonizan NLRR-1 son también útiles en los usos médicos descritos en el presente documento.

Antagonistas de EGFR

Los antagonistas de EGFR incluyen anticuerpos tales como el anticuerpo monoclonal humanizado conocido como nimotuzumab (YM Biosciences), ABX-EGF completamente humano (panitumumab, Abgenix Inc.) así como los anticuerpos completamente humanos conocidos como E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 y E7.6. 3 y descritos en el documento US 6.235.883; MDX-447 (Medarex Inc). Pertuzumab (2C4) es un anticuerpo humanizado que se une directamente a HER2 pero interfiere con la dimerización de HER2-EGFR inhibiendo por tanto la señalización de EGFR. Otros ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, la Patente de los estados Unidos N° 4.943. 533, Mendelsohn y col.) y sus variantes, tales como 225 quimerizada (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) 225 humana reconfigurada 225 (H225) (véase, documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo dirigido contra EGFR completamente humano (Imclone); los anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo I (Patente de los Estados Unidos 5.212.290) anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF (véase el documento WO98/50433, Abgenix); documento EMD 55900 (Stragliotto y col., Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo humanizado dirigido contra EGFR que compete con EGF y TGF-alfa por la unión con EGFR; y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns y col., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo dirigido contra EGFR puede estar conjugado con un agente citotóxico, generando de esta manera un inmunocombinado *por ejemplo*, EP659.439A2, Patente de Merck GmbH).

Los anticuerpos dirigidos contra EGFR que son útiles en los usos médicos descritos en el presente documento incluyen cualquier anticuerpo que se une con suficiente afinidad y especificidad a EGFR y puede reducir o inhibir la actividad de EGFR. El anticuerpo seleccionado tendrá normalmente una afinidad de unión suficientemente fuerte por EGFR, por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a EGFR humano con un valor Kd de entre 100 nM-1 pM. se pueden determinar las afinidades de la unión mediante una resonancia de plasmón superficial basada en el ensayo del (tal como el ensayo BIAcore que se describe en la Publicación de Solicitud PCT N° WO2005/012359); análisis de adsorción inmunoenzimáticos (ELISA); y ensayos de competición (por ejemplo, RIA), por ejemplo. Preferentemente, el anticuerpo dirigido contra EGFR se puede usar como agente terapéutico en el direccionamiento y la interferencia con enfermedades o dolencias donde está implicada la actividad del ligando de EGFR/EGFR. Asimismo, el anticuerpo puede someterse a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, a fin de evaluar su eficacia como un agente terapéutico. Se conocen dichos ensayos en la materia y dependen del antígeno diana y del uso previsto para el anticuerpo.

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos se pueden unir a EGFR y a NLRR-1. En otro ejemplo, Un anticuerpo biespecífico ilustrativo se puede unir a dos diferentes epítopos de la misma proteína, por ejemplo, la proteína NLRR-1. Alternativamente se puede combinar un grupo de NLRR-1 o EGFR con un grupo que se une a una molécula estimuladora de un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2 o CD3), o receptores de Fc para la IgG (Fc gR), tales como Fc gRI (CD64), Fc gRII (CD32) y Fc gRIII (CD16) de tal manera que se centren los mecanismos de defensa celular de una célula que expresa NLRR-1 o EGFR. Se pueden usar también anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan EGFR o NLRR-1. Estos anticuerpos poseen un grupo de unión a EGFR o NLRR-1 y un grupo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón α , alcaloides de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o el isótopo radioactivo de hapteno). Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (*por ejemplo*, anticuerpos F(ab')₂ biespecíficos).

Los antagonistas de EGFR incluyen también pequeñas moléculas tales como los compuestos descritos en los documentos US5616582, US5457105, US5475001, US5654307, US5679683, US6084095, US6265410, US6455534, US6521620, US6596726, US6713484, US5770599, US6140332, US5866572, US6399602, US6344459, US6602863, US6391874, WO9814451 WO9850038, WO9909016, WO9924037, WO9935146, WO0132651, US6344455, US5760041, US6002008, US5747498. Los antagonistas de EGFR de molécula pequeña concretos incluyen (CP-358774, erlotinib, OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, diclorhidrato de N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolilino]-, Pfizer Inc.); Iressa® (ZD1839, gefitinib, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metil-fenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-N2-(1-metil-piperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidina-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PK1-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletil)amino]-1H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxi-fenil)-4-[(1-feniletil)amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butanamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butanamida); lapatinib (Tykerb, GlaxoSmithKline); ZD6474 (Zactima, AstraZeneca); CUDC-101 (Curis); canertinib (CI-1033); AEE788 (6-[4-[(4-etil-1-

piperezinil]metil]fenil]-N-[(1R)-1-feniletíl]-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-amina, WO2003013541, Novartis) y PKI166 4-[4-[[[(1R)-1-feniletíl]amino]-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol, documento WO9702266 de Novartis).

Anticuerpos

Los anticuerpos para el uso en la invención incluyen anticuerpos que se unen específicamente a una proteína de acuerdo con la invención y un fragmento de anticuerpo de dichos anticuerpos. Los anticuerpos ilustrativos incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, fragmentos, biespecíficos, multiespecíficos, heteroconjugados multivalentes que contienen la función efectora,

Anticuerpos policlonales,

Los anticuerpos pueden comprender anticuerpos policlonales. Los técnicos expertos conocen métodos para preparar anticuerpos policlonales. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales están sensibilizados en animales mediante una o múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intra peritoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que es inmunógena en la especie que se va a inmunizar, *por ejemplo*, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o un inhibidor de la tripsina de soja que utiliza un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

En una realización, los animales se inmunizaron contra una molécula de acuerdo con la invención conjugados inmunogénicos, o derivados combinando, *por ejemplo*, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante de Freund completo e inyectando la disolución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después los animales se sometieron a refuerzo con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante de Freund completo mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días después, los animales se sometieron a extracción de sangre y se evaluó el suero para el título del anticuerpo. Los animales se sometieron a refuerzo hasta que se alcanzó la meseta del título. Usualmente, los animales se sometieron a refuerzo con el conjugado del mismo antígeno pero conjugados a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Se pueden preparar también conjugados en cultivos celulares recombinantes como proteínas de fusión. Asimismo, son adecuados agentes de agregación tales como alum son adecuados usados para potenciar la respuesta inmunitaria.

Anticuerpos monoclonales,

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales frente a un antígeno descrito en el presente documento usando el método del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y col., Nature, 256:495 (1975), o se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N° 4.816.567).

En el procedimiento del hibridoma, se inmunizó un ratón u otro animal hospedador adecuado, tal como un hámster o un mono macaco, como se ha descrito anteriormente en el presente documento para estimular linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente se pueden inmunizar linfocitos *in vitro*. A continuación se fusionan los linfocitos con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de esta forma se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HG-PRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina; y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de las células deficientes en HGPRRT.

Las células de mieloma típicas son aquellas que se fusionan eficazmente, apoyan la producción estable de alto nivel del anticuerpo mediante las células productoras de los anticuerpos seleccionados, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre estas, las líneas de células de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores MOPC-21 y MPC-11 de ratón disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE.UU., y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EE.UU.), Se han descrito también líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

Se evaluó el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la diana de interés. Se puede determinar la especificidad de la unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un enzimoimmunoanálisis de absorción (ELISA). Se

conocen en la técnica dicha técnicas y ensayos. Se puede determinar la edad de unión del anticuerpo monoclonal, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107 220 (1980).

5 Tras identificar las células de hibridoma que producen los anticuerpos de la especificidad, afinidad, y/o actividad deseadas. Los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y hacerse crecer con métodos normalizados; *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RP-MI-1640. Además, se pueden hacer crecer células de hibridoma *in vivo* como tumores de ascites en un animal.

10 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente a partir del medio de cultivo, fluido de ascites, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína Sefarosa-A, cromatografía con hidroxapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad; Se pueden preparar también anticuerpos monoclonales mediante métodos de ADN recombinante, tales como las descritos en la solicitud de patente de los Estados Unidos N° 4.816.567. El ADN que
15 codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que se transfecta a continuación en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de
20 hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra manera la proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. A continuación se describirá con más detalle la producción recombinante de anticuerpos.

25 Se pueden aislar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de bibliotecas de anticuerpos dirigidos contra fagos usando las técnicas descritas en McCafferty y col. *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos de murino y ser humano, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (intervalo nM) mediante la reproducción aleatoria de la cadena (Marks y col., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como a la infección combinatoria y a la recombinación *in vivo* como
30 una estrategia para construir bibliotecas muy grandes de fagos (Waterhouse y col., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993). De esta manera, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas del hibridoma del anticuerpo monoclonal convencionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

35 Se puede modificar también el ADN, sustituyendo, por ejemplo, la secuencia de codificación de los dominios constantes de la cadena ligera y la cadena pesada humana en lugar de las secuencias homólogas de murino (Patente de los Estados Unidos n° 4.816.567; Morrison, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)). o uniendo covalentemente a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido no de inmunoglobulina.

40 Normalmente dichos polipéptidos no de inmunoglobulina están sustituidos por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio combinado a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio combinado a antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio combinado a antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

45 **Anticuerpos humanizados y humanos**

Los anticuerpos pueden comprender anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en este procedentes de una fuente que es no humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo restos "importados", que se capturan normalmente de un dominio variable de "importación". Se puede llevar a cabo esencialmente la humanización siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones y col., *Nature*, 32,1:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDR o las secuencias de CDR de roedores por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. De acuerdo con ello, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567) donde se ha sustituido sustancialmente
50 menos de un dominio variable humano intacto por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos de la FR están sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

60 La elección de los dominios variables humanos, el ligero y el pesado, que se van a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método del "mejor ajuste" así denominado, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se selecciona frente a la biblioteca completa de las secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta a continuación como la región marco (FR) del anticuerpo humanizado (Sims y col., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia y col., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método usa una región marco particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de las
65

cadena ligera o pesada. Se puede usar la misma región marco para diversos anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta y col., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Es importante además que los anticuerpos sean humanizados con retención de la afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir esta meta, de acuerdo con un método típico, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias progenitoras y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias progenitoras y humanizada. Están comúnmente disponibles modelos de tridimensionales de inmunoglobulinas y son familiares para los expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras tridimensionales conformacionales probables de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del probable papel de los restos en el funcionamiento de la secuencia de la inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse con su antígeno. De esta forma, se pueden seleccionar restos FR y combinarse desde un receptor e importar secuencias de tal manera que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como una afinidad aumentada por el(los) antígeno(s) diana. En general, los restos de la CDR están directa y más sustancialmente implicados en influenciar la unión al antígeno.

Alternativamente es ahora posible producir animales transgénicos (*por ejemplo*, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de una inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado una completa inhibición de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de una matriz génica de la inmunoglobulina de una línea germinal humana en dichos ratones mutantes de una línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras el estímulo del antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann y col., Yearin Immuno., 7:331993, y Duchosal y col. Nature 355:2581992 Se pueden derivar también anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de expresión en fagos (Hoogenboom y col., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan y col. Nature Biotech 14:309 (1996)).

Los anticuerpos humanos se pueden producir usando varias técnicas conocidas en la materia. que incluyen bibliotecas de expresión en fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). De acuerdo con esta técnica, se clonaron en marco los genes del dominio V del anticuerpo tanto en un gen mayor como menor de una proteína de revestimiento de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresaron como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo dan como resultado también la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta aquellas propiedades. De esta manera, el fago imita alguna de las propiedades de los linfocitos B. Se puede llevar a cabo la expresión en el fago en varios formatos, revisados en, por ejemplo, Johnson, K S. y Chiswell, D J., Cur Opin in Struct Biol 3:564-571 (1993). Se pueden usar algunas fuentes de segmentos de genes V para la expresión en el fago. Por ejemplo, Clackson y col., Nature, 352:624-628 (1991) aislarse una matriz diversa de anticuerpos dirigidos contra oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria poco aleatorizada de genes V derivados de los bazos de ratones humanizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos inmunizados y anticuerpos para que se pueda aislar una matriz diversa de antígeno (incluyendo autoantígenos), por ejemplo, siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks y col., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) o Griffith y col., EMBO J. 12:725-734 (1993). Véase, también, Patentes de los Estados Unidos con Números 5.565.332 y 5.573.905. Están también disponibles las técnicas de Cole y col. y Boerner y col. para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, 77 (1985) y Boerner y col., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)). Se pueden generar también linfocitos B activados in vitro (véanse las Patentes de los Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275).

Fragmentos de anticuerpos

En la invención también se incluyen fragmentos de anticuerpos. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se han obtenido por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) y Brennan y col., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, se pueden aislar fragmentos de anticuerpos a partir de las bibliotecas de anticuerpos dirigidos contra fagos descritas anteriormente. Alternativamente se pueden recuperar directamente fragmentos de Fab'-SH procedentes de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter y col., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otra solución, se pueden aislar fragmentos $F(ab')_2$ directamente de un cultivo de células hospedadoras recombinantes. Serán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos para una persona normalmente experta en la materia. En otras realizaciones, en anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena única (scFv). véase el documento WO 93/16185; patente de los Estados Unidos 5.571.894, y la patente de los Estados Unidos N° 5.587.458; Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intacto que están desprovistos de regiones constantes; de esta manera, que son adecuadas para la unión no específica reducida en el

uso in vivo. Se pueden construir proteínas de fusión SFv para dar como resultado la fusión de una proteína efectora tanto en el extremo amino como en el extremo carboxi de un sFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, más arriba. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal" por ejemplo, tal como se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos 5.641.870 Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser

5

Anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos).

Los anticuerpos también incluyen, por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Mientras que dichas moléculas se unirán solo normalmente a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos triespecíficos u otros multiespecíficos (es decir, cuatro o más especificidades incluidas en una molécula) se incluyen en esta expresión cuando se usan en el presente documento. Los ejemplos de BsAbs conocidos en la materia incluyen aquellos con un grupo dirigido contra un antígeno de célula tumoral dirigido contra una molécula estimuladora de la citotoxicidad tal como antiFc gRI/anti-CD15, anti-p185^{HER2}/Fc gRIII (CD16), antiCD3/anticuerpo dirigido contra linfocitos B malignos (1D10), anti-CD3/anti-p185^{HER2}, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anticuerpo contra carcinoma de células renales, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D1 (anticuerpo dirigido contra carcinoma de colon), anti-CD3/anticuerpo dirigido contra un análogo de la hormona estimuladora de melanocitos, anticuerpo dirigido contra el receptor de-EGF /anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anticuerpo dirigido contra la molécula de adhesión celular neural (NCAM)/anti-CD3, anticuerpo dirigido contra la proteína de unión a folato (FBP)/anti-CD3, anticuerpo dirigido contra antígeno asociado a carcinoma pan (AMOC-31)/anti-CD3; BsAbs con un grupo que se une específicamente a un antígeno tumoral y un grupo que se une a una toxina tal como anti-saporina/anti-Id-1, anti-CD22/anti-saporina, anti-CD7/anti-saporina, anti-CD38/anti-saporina, anti-CEA/anticuerpo dirigido contra la cadena de la ricina A, anticuerpo dirigido contra interferón- α (IFN- α)/idiotipo dirigido contra hibridoma, anti-CEA/anticuerpo dirigido contra alcaloides de la vinca; BsABS para convertir los profármacos activados por enzimas tales como anti-CD30/anticuerpo dirigido contra fosfatasa alcalina (que cataliza la conversión del profármaco fosfato de mitomicina en alcohol de mitomicina); BsAbs, que se puede usar como agentes fibrinolíticos tales como antifibrina/anticuerpo dirigido contra activador del plasminógeno tisular (tPA), antifibrina/ anticuerpo dirigido contra activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA); BsAbs para dirigir los complejos inmunes a los receptores superficiales celulares tales como al anticuerpo dirigido contra la lipoproteína de baja densidad (LDL)/anticuerpo dirigido contra el receptor Fc (por ejemplo, Fc gRI, Fc gRII o Fc gRIII); BsAbs para el uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas tales como anti-CD3/anticuerpo dirigido contra el virus del herpes simple (VHS), anticuerpo dirigido contra el complejo CD3 del receptor de los linfocitos T/anticuerpo dirigido contra la gripe, anti-Fc gR/anti-HIV; BsAbs para la detección tumoral *in vitro* o *in vivo* tal como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185^{HER2}/anti-hapteno; BsAbs como adyuvantes de vacunas; y BsAbs como herramientas diagnósticas tales como anticuerpo dirigido contra IgG de conejo/anti-ferritina, anticuerpo dirigido contra peroxidasa de rábano picante (HRP) anticuerpo dirigido contra hormona, anti-somatostatina/anticuerpo dirigido contra la sustancia P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti- α -galactosidasa. Los ejemplos de anticuerpos triespecíficos incluyen anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 and anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37. En determinados aspectos de la invención, uno de los anticuerpos en el anticuerpo biespecífico se puede acoplar con un marcador celular específico de macrófagos y el otro con un marcador celular específico de células dendríticas. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo podría unirse de forma más estrecha a una célula que soporta el marcador celular específico de un macrófago dado y el marcador celular específico de una célula dendrítica dada a diferencia de una célula que soporta solo uno o el otro marcador.

45

Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (*por ejemplo*, anticuerpos F(ab')₂ biespecíficos). Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión simultánea de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina, en las que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein y col., *Nature*, 305:537-539 (1983). debido a la mezcla aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpos, de los cuales solo uno tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se lleva a cabo usualmente mediante cromatografía de afinidad, es más bien engorrosa, y los rendimientos del producto son bajos. Se han descrito procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Trauneker y col., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

55

De acuerdo con otra solución diferente, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios que combinan anticuerpo-antígeno) se fusionan en secuencias del dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos una parte de la bisagra y las regiones CH₂, y CH₃. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH₁ que contiene el sitio necesario para la unión con la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfectan simultáneamente en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en las realizaciones cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los

65

rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias de codificación para dos de las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado elevados rendimientos o cuando las relaciones no son de particular significancia.

5 En un ejemplo de esta solución, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un grupo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro grupo. Se ha encontrado que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones no deseadas de la cadena de inmunoglobulina, debido a que la presencia de una cadena ligera de
10 inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una fácil manera de separación. Se describe esta solución en el documento WO 94/04690, Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology*, 121 210 (1986).

15 De acuerdo con otra solución descrita, por ejemplo, en el documento WO96/27011, se puede diseñar mediante ingeniería genética la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante del anticuerpo. En este método, una o más cadenas secundarias de aminoácidos pequeños procedentes de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen con cadenas secundarias más grandes (*por ejemplo*, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de idéntico o
20 similar tamaño al de la(s) gran(des) cadena(s) secundarias en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las grandes cadenas secundarias de aminoácidos con unas más pequeñas (*por ejemplo*, alanina o treonina) esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

25 Se conocen también en la materia las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando el enlace químico. Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985) describe un procedimiento donde los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia de un agente complejante de ditiol, arsenito de sodio para estabilizar ditioles adyacentes y evitar la formación del disulfuro intermolecular. Los
30 fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de trinitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en el Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

35 En progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH procedentes de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera fue capaz de unirse a células
40 que expresaban en exceso el receptor de VEGF y linfocitos T humanos normales, así como de estimular la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos frente a dianas de tumores de mama humanos. Se han descrito también diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny y col., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina procedentes de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos diferentes anticuerpos mediante fusión génica. Se redujeron los homodímeros de anticuerpos en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpos. Se puede utilizar también este método para la producción de homodímeros de anticuerpos. la tecnología del "diacuerpo" descrita por Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos
50 biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectados a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. De acuerdo con ello, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando por tanto dos sitios de unión a antígeno. Se ha notificado también otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber y col., *J. Immunol.*, 152 5368 (1994).

Se contemplan también anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt y col., *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

60 **Anticuerpos heteroconjugados,**

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados" Dichos anticuerpos biespecíficos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células diana de sistemas inmunes a células no deseadas (Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documento WO 91/00360, documento WO 92/200373, y documento EP 03089). Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Son bien conocidos en la materia los agentes de
65

reticulación adecuados, y se describen en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980. junto con numerosas técnicas de reticulación.

Anticuerpos multivalentes,

5 Los anticuerpos incluyen un anticuerpo multivalente. Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente mediante la expresión celular de un antígeno al cual se unen los anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes de los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígenos (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante la expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígenos. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión al extremo amino en la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en el presente documento comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende una cadena polipeptídica (y preferentemente dos cadenas polipeptídicas), donde la(s) cadena(s) polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representa un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s). VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-región de la cadena Fc; o VH-CH1-VH-CH1-región de la cadena Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento comprende además preferentemente al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede, por ejemplo, comprender entre aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptido del dominio variable de la cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de la cadena ligera y, de manera opcional, comprenden además un dominio CL. los anticuerpos multivalentes pueden tener múltiples sitios de unión para el mismo antígeno, o sitios de unión para dos o más antígenos diferentes.

Diseño mediante ingeniería genética de la función efectora.

30 Puede ser deseable modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora, con el fin de potenciar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de un trastorno o enfermedad concreta. Por ejemplo, se pueden(n) introducir un(os) resto(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo por tanto la formación de un enlace disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una destrucción celular mediada por el complemento aumentada y una citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron y col., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Se pueden preparar también anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada utilizando reticuladores heterobifuncionales tal como se describe en Wolff y col. Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Alternativamente Se puede diseñar mediante ingeniería genética un anticuerpo que tenga regiones Fc dobles y pueda por tanto tener una lisis del complemento potenciada y capacidades de ADCC. Véase Stevenson y col. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989). Para aumentar la vida media en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor salvaje en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la Patente de los estados Unidos 5.739.277, por ejemplo. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión del receptor salvaje" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable de aumentar la vida media sérica de la molécula de IgG *in vivo* (por ejemplo,

Inmunoconjugados

50 En el presente documento también se describen inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo descrito en el presente documento conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, una toxina (*por ejemplo*, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal. o sus fragmentos), o un isótopo radioactivo (*es decir*, un radioconjugado). Se dispone de una diversidad de radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: por ejemplo, ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re.

Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados Por ejemplo, BCNU, estreptozocina, vincristina, 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos en su conjunto como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de los Estados Unidos 5.053.394, 5.770.710, esperamicinas (Patente de los Estados Unidos 5.877.296), etc. (véase también la definición de agentes quimioterapéuticos en el presente documento) se pueden conjugar con anticuerpos o fragmentos de los mismos.

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo muy radioactivo. Está disponible varios isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados o fragmentos de los mismos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: por ejemplo, ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁹⁰Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P, ²¹²Pb, ¹¹¹In, isótopos radiactivos de Lu, etc. cuando el conjugado se usa para diagnóstico, puede comprender un átomo

radioactivo para estudios de gammagrafía, por ejemplo ^{99m}Tc o ^{123}I , o una marca de espín para adquisición de imágenes mediante resonancia magnética nuclear (RMN) (conocida también como adquisición de imágenes mediante resonancia magnética, IRM), tales como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Se pueden incorporar radiomarcas u otras marcas en el conjugado por medios conocidos. Por ejemplo, se puede biosintetizar el péptido o se puede sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcas tales como ^{99m}Tc o ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re y ^{111}In se pueden unir mediante un resto de cisteína en el péptido. Se puede unir itrio-90 mediante un resto de lisina. Se puede usar el método del IODÓGENO (Fraker y col (1978) Biochem. Bio phys. Res. Commun. 80: 49-57 para incorporar yodo-123. Véase, por ejemplo, Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy (Chatal, CRC Press 1989) que describe otros métodos en detalle.

Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden usar incluyen la cadena de la difteria A, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, el antígeno protector de la toxina del ántrax, cadena de la exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modicina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, neomicina, y los tritecenos. Véase, por ejemplo, documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

Los conjugados del anticuerpo y un agente citotóxico se pueden preparar usando varios agentes de acoplamiento de la proteína bifuncional tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo), iminotiolano (IT), derivados funcionales de imidoésteres (tal como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis azido (tales como (p-azidobenzoil) hexanediamina), derivados de bis-azonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor biactivos (tales como 1,5-diflúor-2,4-nitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta y col., Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ilustrativo para conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico a la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil en medio ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador que contiene dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992). patente de los Estados Unidos n° 5.208.020).

Alternativamente una proteína de fusión que comprende el anti-VEGF, y/o se puede preparar la antiproteína de acuerdo con el anticuerpo de la invención y o el agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado, tanto adyacentes entre sí como separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En determinados ejemplos, el anticuerpo se conjuga con un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el predireccionamiento del tumor, donde el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido por la eliminación del conjugado sin unir procedente de la circulación usando un agente de aclaramiento y a continuación la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleido). En determinados ejemplos, se forma un inmunconjugado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; ADNasa).

Maitansina y maitansinoides

Se puede conjugar un anticuerpo con una o más moléculas de maitansinoide. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. Maitansina se aisló en primer lugar procedente del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (Patente de los Estados Unidos N° 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios producen también maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol (Patente de los Estados Unidos 4.151.042). se describen el maitansinol sintético y sus derivados y análogos, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos con Números 4.137.230, 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Se puede conjugar un anticuerpo con una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica tanto del anticuerpo como de la molécula de maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo han mostrado eficacia en la potenciación de la citotoxicidad de las células diana sin afectar negativamente la función o la solubilidad del anticuerpo, aunque podría esperarse que incluso una molécula de toxina7anticuerpo potencie la citotoxicidad durante el uso de un anticuerpo puro. Los

maitansinoides son bien conocidos en la materia y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se describen los maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos 5.208.020 y en otras patentes y publicaciones no de patente referidas a partir de ahora en el presente documento. En una realización, los maitansinoides son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Existen muchos grupos de unión conocidos en la materia para preparar los conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la patente de los estados unidos N° 5.208.020 o en la patente EP 0 425 235 B1, y Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992). Los grupos de unión incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasa, o grupos lábiles a esterasa, que se describen en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose los grupos disulfuro y tioéter.

Los conjugados de un anticuerpo y un maitansinoide se pueden preparar usando varios agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como -succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) , iminotiolano (IT), derivados funcionales de imidoésteres (tal como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis azido (tales como (p-azidobenzoil) hexanediamina), derivados de bis-azonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoilo)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor biactivos (tales como 1,5-diflúor-2,4-nitrobenzono). Los agentes de acoplamiento típicos incluyen propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP) (Carlsson y col., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y pentanoato de N-succinimidil-4-(2-piridiltio)(SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El enlazador puede unirse a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace, dependiendo de la distribución de las lesiones. Por ejemplo, se puede formar un enlace éster mediante reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción se puede producir en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. El enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

30 **Calicamicina**

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de calicamicina, La familia de antibióticos de la calicamicina es capaz de producir roturas en el ADN bicatenario a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la calicamicina, véanse las patentes de los Estados Unidos 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de la American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de la calicamicina que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman y col., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode y col., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes de los estados Unidos anteriormente mencionadas de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral que se puede conjugar con el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la calicamicina como la QFA tienen sitios de acción intracelulares y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpo potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

45 **Otras modificaciones en anticuerpos**

En el presente documento se contemplan otras modificaciones de un anticuerpo Por ejemplo, el anticuerpo se puede unir a uno de varios polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, propilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo puede estar atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo) respectivamente), en sistemas de administración de fármaco en forma coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas, o en macroemulsiones. Dichas técnicas se han descrito en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

55 **Tratamientos combinados**

La presente invención proporciona un uso combinado de un antagonista de NLRR-1 y un antagonista de EGFR como parte de un régimen de tratamiento previsto para proporcionar un efecto beneficioso o un efecto sinérgico a partir de la actividad combinada de estos agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero sin limitación, la acción farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de agentes terapéuticos.

En algunas realizaciones, la célula tumoral o el cáncer que se va a tratar con el antagonista de NLRR-1 y el antagonista de EGFR es resistente al tratamiento con un antagonista de EGFR en ausencia de tratamiento con un antagonista de NLRR-1. En otra realización, el antagonista de EGFR administrado con el antagonista de NLRR-1 es erlotinib. En otra realización, la célula tumoral o el cáncer que se va a tratar con el antagonista de NLRR-1 y erlotinib es resistente al tratamiento con erlotinib en ausencia de tratamiento con un antagonista de NLRR-1. En otras

realizaciones, la administración del antagonista de NLRR-1 y el antagonista de EGFR aumenta la inhibición del crecimiento de la célula tumoral o del cáncer en comparación con la administración del antagonista de EGFR sin la administración del antagonista de NLRR-1. En otras realizaciones, el aumento en la inhibición del crecimiento tumoral o del cáncer utilizando el tratamiento combinado es sinérgico en comparación con el tratamiento con el antagonista de NLRR-1 o el antagonista de EGFR solo.

La administración combinada incluye la administración simultánea o la administración concurrente, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferentemente existe un periodo de tiempo mientras que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

Diagnósticos

La NLRR-1 se expresa en muchos tumores diferentes y su expresión no se correlaciona con la expresión elevada de EGFR indicando que NLRR-1 facilita la ruta de señalización de EGFR y proporciona un medio para aumentar la activación de la ruta sin requerir la amplificación de EGFR. Adicionalmente, la expresión de NLRR-1 está correlacionada con la resistencia que se encuentra en algunos tumores a los antagonistas de EGFR, tales como erlotinib. La inactivación de la expresión de NLRR-1 en células cancerosas resistentes a antagonistas de EGFR da como resultado una sensibilidad aumentada al tratamiento con el tratamiento de fármacos dirigidos contra EGFR.

De acuerdo con ello, un aspecto de la invención se refiere también a los métodos y composiciones para diagnosticar los trastornos proliferativos celulares, tales como cáncer. El método puede comprender comparar el nivel de NLRR-1 presente en una población de células de ensayo y una población de células de referencia donde un aumento en el nivel de expresión de LLRR-1 en la población de células del ensayo indica que contiene células cancerosas.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para determinar si una población de células de ensayo tiene una ruta de EGFR activada en ausencia de amplificación de EGFR. En algunas realizaciones, el método comprende comparar el nivel de NLRR-1 presente en una población de células de ensayo que no tiene amplificación de EGFR y una población de células de referencia donde un aumento en el nivel de expresión de NLRR-1 indica que la ruta de EGFR está activada tal como se define en las reivindicaciones, cuyo método es útil para identificar pacientes que son probablemente resistentes al tratamiento con un antagonista de EGFR debido a la ausencia de amplificación de EGFR pero que podrían beneficiarse de un tratamiento combinado de un antagonista de NLRR-1 y un antagonista de EGFR.

En los anteriores métodos, la población de células de ensayo puede ser cualquier número de células, es decir, una o más células, y se puede proporcionar *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*. En determinados ejemplos, las células en la población de células de referencia se derivan de un tipo de tejido tan similar cómo es posible al de la muestra de ensayo, por ejemplo, una población de células tumorales. En algunos ejemplos, la población de células de referencia se deriva del mismo sujeto que la población de células de ensayo, *por ejemplo*, a partir de una región próxima a la región de origen de la población de células de ensayo. En algunos ejemplos, la población de células de referencia se deriva del mismo tipo de tejido que la población de células de ensayo, pero se ha recogido del sujeto en un momento diferente (por ejemplo, en un momento más inicial que el de la población de células de ensayo). En algunos ejemplos, se recogieron una serie de muestras de la población de células de referencia a intervalos de tiempo regulares procedentes del sujeto (por ejemplo, diariamente, semanalmente, mensualmente, o anualmente). En un ejemplo, la población de células de referencia se deriva de una pluralidad de células. Por ejemplo, la población de células de referencia puede ser una base de datos de los modelos de expresión de NLRR-1 procedentes de células previamente ensayadas.

Alternativamente se puede generar un control determinando la expresión del gen doméstico (tal como un miembro de la familia actina) en una población de células de referencia. El gen doméstico actúa como un control comparativo sobre el que se determina la expresión en exceso del gen NLRR-1.

En otros ejemplos, se determinan también los niveles de EGFR en la población de células del ensayo y de referencia.

Métodos de detección de proteínas y ácidos nucleicos

Detectar la presencia, la actividad, o la cantidad de una proteína puede llevarse a cabo fácilmente utilizando métodos conocidos en la materia. Se puede medir la expresión al nivel de la proteína es decir, midiendo los niveles de polipéptidos. Dichos métodos son bien conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, inmunoensayos basados en anticuerpos para las proteínas. Los niveles de expresión de una o más secuencias de proteínas en la población de células de ensayo se pueden comparar con los niveles de expresión de las secuencias en una o más células a partir de una población de células de referencia. Se puede comparar la expresión de las secuencias en las poblaciones de células de ensayo y del control utilizando cualquier método reconocido en la materia para comparar la expresión de secuencias de ácidos nucleicos. Por ejemplo, se puede comparar la expresión utilizando los métodos GENECALLING™ tal como se describe en la patente de los Estados Unidos N° 5.871.697 y en Shimkets y

col., Nat. Biotechnol. 17:798-803, En determinadas realizaciones de la invención, se ha medido la expresión de una, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más, doce o más, trece o más, catorce o más, quince o más, 20 o más, 25 o más secuencias de proteínas

5 Se pueden emplear también diversas técnicas de ensayo conocidas en la materia, tales como los ensayos de unión competitivos, ensayos de tipo sándwich directos o indirectos y ensayos de inmunoprecipitación llevados a cabo tanto en fases heterogéneas como homogéneas (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158). Los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígenos usados en los ensayos se pueden marcar con un resto detectable. El resto detectable debería ser capaz de producir, de forma tanto directa como
10 indirecta, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina, o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Se puede emplear cualquier método conocido en la materia para conjugar el anticuerpo con el resto detectable, incluyendo aquellos métodos descritos por Hunter y col., Nature, 144:945 (1962); David y col., Biochemistry, 13:1014 (1974);
15 Pain y col., J. Immunol. Meth. 40:219 (1981); y Nygren, J. Histochem. And Cytochem. 30:407 (1982). Son bien conocidas en la materia las técnicas de detección de ácidos nucleicos, y se pueden emplear para evaluar la presencia de un ARNm que codifica NLRR-1 y determinar de esta manera la presencia o la cantidad de NLRR-1 en una población de células a partir de la cual se extrajo la muestra de células. Se describen los métodos habitualmente conocidos en la materia de la tecnología del ADN recombinante que se pueden utilizar para evaluar la presencia,
20 cantidad, o actividad de los ácidos nucleicos, por ejemplo, en Ausubel y col. eds. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, y Kriegler (1990) Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, Los ejemplos de dichas técnicas incluyen la hibridación fluorescente *in situ* (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia Southern, o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). tales como PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

25 De manera opcional, la comparación de las secuencias expresadas diferencialmente entre una población de células de ensayo y una población de células de referencia se puede llevar a cabo con respecto a un ácido nucleico del control cuya expresión es independiente del parámetro o condición que se está midiendo. Los niveles de expresión del ácido nucleico en el ácido nucleico del ensayo y de referencia se pueden usar para normalizar los niveles de la señal en las poblaciones comparadas. Los ácidos nucleicos del control adecuados pueden determinarse fácilmente por una persona normalmente experta en la materia.

Agentes quimioterapéuticos,

35 El tratamiento combinado descrito en el presente documento puede comprender además uno o más agente(s) quimioterapéuticos. La administración combinada incluye la administración simultánea o la administración concurrente, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferentemente existe un periodo de tiempo mientras que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

40 El agente quimioterapéutico, si se administra, se administra por tanto usualmente a las dosificaciones conocidas, u opcionalmente reducidas debido a la acción combinada de los fármacos o los efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico antimetabolitos. La preparación y los calendarios de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o tal como se ha determinado empíricamente por el especialista experto.

45 Se han descrito anteriormente diversos agentes quimioterapéuticos que se pueden combinar. Los agentes quimioterapéuticos preferidos que se van a combinar se seleccionan entre el grupo que consiste en un taxoide (incluyendo docetaxel y paclitaxel), vinca (tales como vinorelbina o vinblastina), compuesto de platino (tal como carboplatino o cisplatino), inhibidor de la aromatasas (tal como letrozol, anastrozol, o exemestano), antiestrógeno (por ejemplo fulvestrante o tamoxifeno), etopósido, tiotepa, ciclofosfamida, metotrexato, doxorubicina liposómica, doxorubicina liposómica pegilada, capecitabina, gemcitabina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), o inhibidor del proteosoma (*por ejemplo* PS342).

55 Formulaciones, dosificaciones y administraciones

Los agentes farmacéuticos utilizados en la invención se formularán, dosificarán, y administrarán de una forma consistente con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el sujeto concreto que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la
60 causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el calendario de administración, la interacción fármaco-fármaco de los agentes que se van a combinar, y el resto de factores conocidos de los profesionales sanitarios.

Las formulaciones terapéuticas se preparan utilizando métodos normalizados conocidos en la materia mezclando el principio activo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences (20ª edición), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott,

Williams & Wilkins, Filadelfia, PA. Los portadores aceptables, incluyen solución salina, o tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a 10 restos); proteínas, tal como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparaginas, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes como el EDTA; alcoholes azucarados tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONIC™, o PEG.

De manera opcional, pero preferentemente, la formulación contiene una sal farmacéuticamente aceptable, preferentemente cloruro de sodio, y preferentemente a aproximadamente concentraciones fisiológicas. De manera opcional, Las formulaciones de la invención pueden contener un conservante farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la concentración del conservante varía entre 0,1 y 2,0 %, normalmente en v/v. Los conservantes adecuados incluyen aquellos conocidos en las técnicas farmacéuticas. Se prefieren como conservantes el alcohol bencílico, fenol, m-cresol, metilparabeno, y propilparabeno De manera opcional, las formulaciones de la invención pueden incluir un tensioactivo farmacéuticamente aceptable a una concentración de 0,005 a 0,02 %.

La formulación del presente documento puede contener también más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Dichas moléculas están presentes en combinación de manera adecuada en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Los principios activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco en forma coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se han descrito en Remington's Pharmaceutical Sciences, *más arriba*.

Se pueden preparar preparaciones de liberación continua. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación continua incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que tienen la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación continua incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o (/polialcohol vinílico) poliácidos (Patente de los Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de g etilo, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido), y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico. Aunque los polímeros tales como acetato de etileno-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante periodos de tiempo de 100 días, algunos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados siguen estando en el cuerpo durante un largo plazo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de un enlace S-S intermolecular a través de un intercambio tío-disulfuro, se puede conseguir la estabilización modificando los restos sulfidrido, liofilizando a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados, y desarrollando composiciones específicas de la matriz polimérica.

Los agentes terapéuticos de la invención se administran a un paciente humano, de acuerdo con los métodos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante las rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o mediante inhalación En el caso de antagonistas de VEGF, se desea particularmente la administración si están asociados extensos efectos secundarios o toxicidad con el antagonismo de VEGF. Se puede usar también una estrategia *ex vivo* para las aplicaciones terapéuticas. Las estrategias *ex vivo* implican transfectar o transducir células obtenidas a partir del sujeto con un polinucleótido que codifica un antagonista de NLRR-1 o EGFR. Después, las células transfectadas o transducidas se devuelven al sujeto. Las células pueden ser cualquiera de una amplia serie de tipos que incluyen, sin limitación, células hematopoyéticas (por ejemplo, células de la médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, linfocitos T, o linfocitos B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales. queratinocitos, o células musculares.

Por ejemplo, si el antagonista de NLRR-1 o EGFR es un anticuerpo, el anticuerpo se administra mediante cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, por vía intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para el tratamiento inmunosupresor local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra de manera adecuada mediante infusión con pulsos, particularmente con dosis del anticuerpo que van disminuyendo. Preferentemente, la dosificación se administra mediante inyecciones, lo más preferente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es a corto plazo o

crónica.

5 En otro ejemplo, el compuesto antagonista de NLRR-1 o EGFR se administra por vía local, por ejemplo, mediante inyecciones directas, cuando el trastorno o localización del tumor lo permite, y las inyecciones se pueden repetir periódicamente. El antagonista de NLRR-1 o EGFR puede también administrarse sistémicamente al sujeto o directamente a las células tumorales, por ejemplo, a un tumor o un lecho tumoral tras la escisión quirúrgica del tumor, a fin de evitar o reducir la recurrencia local o la metástasis.

10 La administración de los agentes terapéuticos combinados se lleva a cabo durante un periodo de tiempo definido (normalmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada). Se pretende que el tratamiento combinado abarque la administración de estos agentes terapéuticos de una manera secuencial, esto es, donde cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de una manera sustancialmente simultánea.

15 El agente terapéutico se puede administrar mediante la misma ruta o mediante diferentes rutas. Por ejemplo, el antagonista de NLRR-1 en la combinación se puede administrar mediante inyección intravenosa mientras que el inhibidor de EGFR en la combinación se puede administrar por vía oral. Alternativamente, por ejemplo, ambos agentes terapéuticos se pueden administrar por vía oral, o ambos agentes terapéuticos se pueden administrar mediante inyección intravenosa, dependiendo de los agentes terapéuticos específicos, la secuencia en la que se administran los agentes terapéuticos varía también dependiendo de los agentes específicos.

20 Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (por ejemplo (0,1-20 mg/kg) de cada agente terapéutico es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea por ejemplo, en una o más administraciones independientes, o mediante infusión continua. una dosificación diaria típica puede variar entre aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 µg/kg o más, dependiendo de los factores anteriormente mencionados. Para administraciones repetidas durante varios días o un plazo más prolongado, dependiendo de la dolencia, el tratamiento está sostenido hasta que se trata el cáncer, tal como se ha medido mediante los métodos descritos anteriormente. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas terapéuticas. En un ejemplo, si el antagonista de NLRR-1 o EGFR es un anticuerpo, el anticuerpo de la invención se administra cada dos a tres semanas, a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. Un intervalo de dosis diaria de aproximadamente 5 mg/kg a 15 mg/kg, si el antagonista de NLRR-1 o EGFR es un compuesto de molécula pequeña oral, el fármaco se administra diariamente a un intervalo de dosificación entre aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Además, el compuesto oral de la invención se puede administrar tanto con un régimen intermitente de dosis alta tradicional, como usando dosis menores y más frecuentes sin descansos en el calendario (denominado tratamiento metronómico). Cuando se usa un régimen intermitente, por ejemplo, se puede administrar el fármaco diariamente durante dos o tres semanas seguido por un descanso semanal; o diariamente durante cuatro semanas seguido por un descanso de dos semanas, dependiendo de la dosis diaria y de la indicación concreta. El progreso del tratamiento de la invención se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

40 La presente solicitud contempla la administración del antagonista de NLRR-1 o EGFR mediante terapia génica. Véase, por ejemplo, el documento WO96/07321 publicado el 14 de marzo, de 1996 que se refiere al uso de la terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

45 Existen dos soluciones principales para introducir el ácido nucleico (contenido opcionalmente en un vector) en las células del paciente; *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, usualmente en el sitio donde se requiere el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, las células del paciente se eliminan, se introduce el ácido nucleico en estas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente tanto directa como, por ejemplo, encapsulado en membranas porosas que se implantan al paciente (véase *por ejemplo*, Patentes de los Estados Unidos N^{os} 4.892.538 y 5.283.187). Existen varias técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del hospedador previsto. Las técnicas adecuadas para la transferencia del ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación del fosfato de calcio, etc. Un vector usado comúnmente para la administración *ex vivo* del gen es un retrovirus.

60 Las técnicas de transferencia de ácidos nucleicos *in vivo* actualmente preferidas incluyen la transfección con vectores víricos (tales como adenovirus, virus del herpes simple I, o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (los lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). En algunas situaciones es deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que se dirija a las células diana, tales como un anticuerpo específico para una proteína de membrana superficial celular o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se emplean liposomas, se pueden usar proteínas que se unen a una proteína de membrana superficial celular asociadas con endocitosis para dirigir y/o facilitar la captación, *por ejemplo*, proteínas de la cápsida o sus fragmentos trópicos para un tipo de célula concreta, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en la ciclación, y proteínas que dirigen la localización intracelular y potencian la vida media intracelular. Se describe la técnica de la endocitosis mediada por receptor, por ejemplo, por

65

Wu y col., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987); y Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414 (1990). Para la revisión del gen marcador actualmente conocido y los protocolos de terapia génica, véase Anderson y col., Science 256:808-813 (1992). Véase también el documento WO 93/25673 y las referencias citadas en el anterior.

5 Artículos de fabricación

Se describe en el presente documento un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos o diagnosticar los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente, una marca y un prospecto en el envase. Los envases adecuados incluyen por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados a partir de varios materiales tales como vidrio o plástico. En un ejemplo, el recipiente mantiene una composición que es eficaz para tratar la dolencia y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un detenedor que se puede perforar mediante una aguja para inyección hipodérmica). En un ejemplo, al menos un agente activo en la composición es un antagonista de NLRR-1. En determinados ejemplos, la composición incluye además un antagonista de EGFR. En otro ejemplo, la composición incluye un antagonista de NLRR-1 y al menos una segunda molécula activa que incluye, pero no se limita a: un agente quimioterapéutico, una citoquina, una quimioquina, un agente antiangiogénico, un agente inmunosupresor, un agente citotóxico, y un agente inhibidor del crecimiento; La marca en, o asociada con, el recipiente indica que la composición se usa para tratar la dolencia de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, Disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Los artículos de fabricación pueden incluir además otros materiales deseables procedentes de puntos de venta comerciales y al usuario, que incluyen agentes activos adicionales, otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas. El artículo de fabricación puede incluir además instrucciones adicionales de que el antagonista de NLRR-1 se va a usar junto con un diagnóstico que ha identificado al paciente como que tiene un cáncer que no tiene EGFR amplificado. El artículo de fabricación puede incluir además instrucciones de que la composición es para el uso en pacientes cuyos cánceres son resistentes a los tratamientos dirigidos contra EGFR.

Depósito de material

Se han depositado cultivos del anticuerpo monoclonal mumab 3D1.6.9 con la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA, USA (ATCC) y se han designado PTA-8732.

Este depósito se ha realizado bajo las condiciones del Tratado de Budapest para el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a Fines del Procedimiento de Patente y las Regulaciones bajo el anterior (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de cultivos viables durante 30 años desde la fecha del depósito. Los organismos estarán disponibles de la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y la ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restringir de la progenie de los cultivos para el público tras la emisión de la patente de los Estados Unidos pertinente o tras estar abierta a consulta por el público de cualquier solicitud de patente de los Estados Unidos o extranjera, lo que sea que llegue primero, a lo determinado por el Comisionado de Patente y Marcas Comerciales de los Estados Unidos para tener derecho a lo anterior de acuerdo con el punto 122 de la Ley 35 del Código de Comercio de los Estados Unidos y las reglas del Comisionado relativas a lo anterior (que incluyen el punto 1.12 de la ley 37 del CFR con referencia concreta a 886 OG 638).

Con respecto a aquellas designaciones en las que se busca una patente europea, una muestra del microorganismo depositado estará disponible hasta que la publicación de la mención de la concesión de la patente europea o hasta la fecha en la cual la solicitud se ha refundido o retirado o cumple que se retire, solo mediante la distribución de dicha muestra a un experto nominado por la persona que se interesa por la muestra. (Regla 28(4) EPC)

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si los cultivos en depósito deben desaparecer, disminuir o destruirse cuando se cultivan en condiciones adecuadas, se sustituirán rápidamente tras la notificación con un espécimen viable del mismo cultivo. La disponibilidad de la cepa depositada no debe tomarse de alguna forma como una licencia para la práctica de la invención en infracción de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno con su normativa de patentes.

Se considera que la anterior memoria descriptiva escrita es suficiente para permitir a un experto en la materia practicar la invención. La presente invención no debe limitarse en su alcance a las consideraciones depositadas, debido a que se pretende que las realizaciones depositadas ilustren solo determinados aspectos de la invención y cualesquiera consideraciones que sean funcionalmente equivalentes estarán comprendidas en el alcance de la presente invención. El depósito del material en el presente documento no constituye una declaración de que la descripción escrita contenida en el presente documento es inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni es para considerarse como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representan. Así, diversas modificaciones de la invención además de las que se muestran y se describen en el presente documento se volverán evidentes para los expertos en la materia a partir de la anterior descripción.

Se incluyen los siguientes ejemplos para demostrar las realizaciones específicas de la presente invención. Los

expertos en la materia deberán apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan las técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención, y, por tanto, se puede considerar que constituyen los modos preferidos para su práctica. Sin embargo, la persona normalmente experta en la técnica deberá, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y obtener además un resultado igual o similar.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Análisis de micromatriz y RT-PCR

Análisis de micromatriz: Se analizó el transcrito de NLRR-1 en tejidos tumorales y normales en micromatrices Affymetrix tal como se describe por Tackels-Horne y col. (Tackels-Horne y col., 2001). Análisis de RT-PCR: Se obtuvieron tumores de próstata de Bio-Options (Fullerton, CA) y Ardais (Lexington, MA). Se procuraron muestras de mieloma múltiple consistentes en células CD138 purificadas utilizando perlas revestidas (Miltenyi Biotec Inc, Auburn, CA) de Cureline (South San Francisco, CA). Se extrajo el ARN utilizando el procedimiento normalizado del cloruro de cesio seguido por la extracción con fenol cloroformo. El ARN extraído se transcribió de manera inversa y se cuantificó utilizando el kit Taqman Gold (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) y los siguientes cebadores y sondas: cebador directo de NLRR-1: TCAATC CCACTAAATGAGCTGTA (SEC ID N°: 2), inverso: GTCTGCAGAACCATCTTTGTCT (SEC ID N°: 3), sonda: CCACCACTCATTAACCTCTGGGAAGG (SEC ID N°: 4); cebador directo de MUC1 TGGCAGCAGCCTCTCTTA (SEC ID N°: 5), inverso: CCCCTACAAGTTGGCAGAA (SEC ID N°: 6), sonda: CACAAACCCAGCAGTGGCAGC (SEC ID N°: 7); cebador directo de RPL19: GCGGATTCTCATGGAACACA (SEC ID N°: 8), inverso: GGTCAGCCAGGAGCTTCTTG (SEC ID N°: 9), sonda: CACAAGCTGAAGGCAGACAAGGCC (SEC ID N°: 10). Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado ADN genómico humano (BD Biosciences, San Jose, CA) se usó como patrón para convertir Ct (umbral del ciclo) para cuantificar y los datos se normalizaron para RPL19.

Construcciones y transfecciones del plásmido NLRR-1

Construcción NLRR-1.ECD.HIS para la expresión de CHO: Se generó el dominio extracelular etiquetado con His en el extremo C de la proteína NLRR-1 mediante técnicas de clonación normalizadas y se transfectó en células CHO utilizando Fugene 6 (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) según las instrucciones del fabricante.. Tras 48 horas de la transfección, se seleccionaron los clones de elevada expresión en medio que contenía 200 nM de metotrexato y sin GHT, se purificó la proteína NLRR-1 a partir del medio de cultivo con células CHO transfectadas utilizando una columna de superflujo Ni-NTA (Qiagen, Valencia, CA) para la generación de anticuerpos monoclonales. Construcción de NLRR-1.ECD.HIS para la expresión de Baculovirus: El dominio extracelular etiquetado con His en el extremo C de NLRR-1 se clonó en un vector de expresión pVL1393 modificado (BD Pharmingen, San José, utilizando técnicas de clonación normalizadas y expresadas en células SF9 de insectos. La proteína se purificó en una columna Q Sepharose para la producción de anticuerpos policlonales en conejos. Construcciones NLRR-1.YFP y NLRR-1ΔC: Se generaron construcciones de fusión de longitud completa y ΔC YFP solapando la clonación mediante PCR en el vector pEYFP-N1 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA), que codifica una proteína fluorescente verde amarillenta potenciada. Se transfectaron células HEK293 utilizando Polyfect (Qiagen) según las instrucciones del fabricante y células Cos-7 se transfectaron en serie dos veces utilizando Fugene 6 según las instrucciones del fabricante. NLRR-1ΔC se truncó en el aminoácido 681, borrando el motivo de endocitosis mediada por clatrina. (Figura 12A-B).

Generación de anticuerpos NLRR-1 y citometría de flujo

La proteína NLRR-1.ECD.HIS expresada y purificada de Baculovirus se usó para generar anticuerpos policlonales en conejos (Invitrogen). Cinco ratones Balb/c (Charles River Laboratories, Hollister, CA) se hiperinmunizaron con una proteína NLRR-1 extracelular humana etiquetada con polihistidina expresada en Baculovirus o CHO en adyuvante de Ribí (Ribí Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO) para la generación de anticuerpos monoclonales. Linfocitos B procedentes de estos ratones, todos los cuales demostraron títulos altos de anticuerpos dirigidos contra NLRR mediante ELISA directo y unión específica a NLRR expresado o transfectado en células 293, DP-12 CHO y células que expresan endógenamente LnCAP mediante citometría de flujo, con células de mieloma de ratón (X63.Ag8.653; American Type Culture Collection, Rockville, MD) utilizando un protocolo modificado análogo a uno anteriormente descrito (Kohler y Milstein, 1975; Hongo y col., 1995). Después de 10-12 días, se cosecharon los sobrenadantes y se seleccionaron para la producción de anticuerpos mediante ELISA y citometría de flujo. Se expandieron un total de ocho clones positivos, que mostraban una inmunounión más elevada tras el segundo ciclo de subclonación mediante dilución limitante, y se cultivaron para una caracterización adicional. Los sobrenadantes cosechados de cada linaje de hibridoma se purificaron mediante cromatografía de afinidad (Cromatografía líquida de proteína rápida Pharmacia [FPLC] Pharmacia, Uppsala, Suecia) utilizando un protocolo modificado análogo a uno anteriormente descrito (Hongo y col., 1995). Las preparaciones del anticuerpo purificado se filtraron a continuación

de forma estéril (0,2 μ l de tamaño de poro; Nalgene, Rochester NY) y se almacenaron a 4°C en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Se ensayaron anticuerpos monoclonales purificados mediante citometría de flujo en células HEK293 transfectadas transitoriamente con el vector o construcciones NLRR-1 YFP. Se tiñeron las células con anticuerpos monoclonales α -NLRR-1, se tiñeron las células con anticuerpos monoclonales -NLRR-1 seguido por anticuerpo secundario dirigido contra Ig α de ratón marcado con alexa 647 durante 30 minutos cada uno en hielo y se analizaron en FACScan (BD Biosciences). Las células se clasificaron en un difusor frontal (FSC), difusor lateral (SSC), yoduro de propidio (PI) e YFP y se analizaron con Flowjo (Treestar, Ashland, OR), (Figura 14),

Cultivo celular

Líneas de células NCI-H2009 de tumor humano, NCI-H647, NCI-H520, NCI-H1781, NCI-H226, y SK-MES-1 se mantuvieron en medio RPMI1640. Se mantuvieron células HEK293 en medio F12:DMEM 50:50 con un nivel elevado de glucosa. Se mantuvieron células CHO DP12 en medio F12:DMEM 50:50 con GHT. Se mantuvieron células Cos-7 en medio F12:DMEM 50:50. Todos los medios se complementaron con FBS al 10 %, L-glutamina y penicilina-estreptomicina.

Inmunofluorescencia

Se transfectaron transitoriamente células HEK293 con NLRR-1.YFP o NLRR- Δ 1C.YFP se sembraron en portas de vidrio de 8 cámaras. Se fijaron las células en paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para la tinción del anticuerpo dirigido contra NLRR-1 se permeabilizaron las células en tampón saponina al 0,4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se tiñeron las células con un anticuerpo policlonal dirigido contra α -NLRR-1 de conejo seguido por un anticuerpo secundario dirigido contra α -Cy-3 de conejo. Los portaobjetos se montaron con un medio de montaje Vectashield con Dapi (Vector Lab, Burlingame, CA). Se adquirieron imágenes utilizando un aumento de 60X en un microscopio equipado con una cámara. Se generaron imágenes superpuestas utilizando el software Adobe Photoshop.

Inmunohistoquímica

Se adquirieron micromatrices de tejidos de Cybrdi (Frederick, MD, Se llevó a cabo la retirada del antígeno mediante ebullición en Borg Decloaker, Reveal, o Universal Reveal (Biocare Medical, Concord, CA). Se usaron anticuerpo policlonal dirigido contra α -NLRR-1 y un anticuerpo del control dirigido contra Ig α de conejo a 6 μ g/ml. Se detectó la señal utilizando el sistema MACH 3 de Biocare Medical.

Inmunoprecipitación simultánea y análisis de transferencia de Western:

Se lisaron las células en hielo durante diez minutos en NP40 al 0,5 % en TBS con un cóctel inhibidor de la proteasa (Roche, Basilea, Suiza) y PMSF. Se cizalló el ADN a través de una aguja de calibre 18 y se eliminaron los desechos mediante centrifugación. Se preclararon los lisados con 10 μ g/ml de anticuerpo monoclonal dirigido contra -GP120 (Genentech, Inc) durante 30 minutos a 4C con rotación. Se incubaron los lisados preclarados con anticuerpo monoclonal dirigido contra α -NLRR-1, α -EGFR (Cell Signaling, Danvers, MA), o α -ragweed (Genentech Inc., South San Francisco, CA) anticuerpos a 10 μ g/ml durante 2 horas a 4C con rotación y se precipitaron con perlas de proteína G agarosa. Se lavaron los precipitados 4 veces en tampón de lisis y se resolvieron en gel Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se transfirieron las proteínas sobre una membrana PVDF (Invitrogen) y se detectaron mediante el análisis de la transferencia Western con anticuerpo policlonal dirigido contra α -NLRR-1 1/500 (Genentech Inc.); anticuerpo monoclonal dirigido contra α -ERBB2 a 1/1000 (LabVision, Fremont, CA), α -Her3 a 1/1000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), α -IGF1R a 1/1000 (Cell Signaling), y β -adaptina a 1/500 (Santa Cruz Biotechnology).

Ensayos de fosforilación de ERK (P-ERK) y fosforilación de AKT (P-AKT)

Se sembraron las células en placas de 60 mm a una confluencia 75-85 % y se dejaron recuperar durante la noche. Se cosecharon las células en Optimem I (Invitrogen) durante 6 a 8 horas antes de la incubación con anticuerpos a 2 μ g/ml en Optimem I durante la noche. Se estimularon las células con suero al 10 %, EGF, o TGF α a 37C y se colocaron inmediatamente en hielo. Se usó un rascador celular para cosechar las células en tampón fosfo (ortovanadato de sodio 1 mM, azida de sodio 1 mM, 1 μ g/ml de microcistina, 1mM de α -glicerol fosfato en PBS). Se fijaron las células en formaldehído al 1 % en tampón fosfo a 37C durante 10 minutos antes de la permeabilización en metanol al 90 % frío en hielo durante 20 minutos en hielo. Se tiñeron las células con anticuerpos PERK y P-AKT de Cell Signaling Technologies (Danvers, MA) que se dirigieron, seguido por anticuerpo secundario conjugado fluorescentemente dirigido contra Ig α de conejo o Ig α de ratón. Se recogieron 5.000 a 10.000 casos para la citometría de flujo y se clasificaron en FSC y SSC. Células HEK293 y Cos-7 transfectadas con construcciones YFP se privaron de alimento durante la noche tras estimulación, se cosecharon, y se tiñeron como anteriormente. Se recogieron 5.000 a 50.000 casos para la citometría de flujo y se clasificaron en FSC, SSC, e YFP.

Inactivación de ARNip de NLRR-1 y ensayos

Dharmacon diseñó y sintetizó el dúplete de ARNip de NLRR-1 (Lafayette, CO). La secuencia de sentido directo es GCCAGAACCUGAAAUUUACUU (SEC ID N°: 11) y la secuencia de sentido contrario es 5'-PGUAAAUUUCAGGUUCUGGCUU (SEC ID N°: 12). NCI-H2009, NCI-H647, NCI-H226, y se sembraron células SK-MES-1 a 2830/cm² y se sembraron células NCI-H520 y NCI-H1781 a 5660/cm². Se transfectaron 100nM de ARNip con DharmaFECT 4 durante 6 a 8 horas antes de que se sustituyera el transfectante con medio reciente. Se usó una secuencia de ARNip no dirigida (Dharmacon) como un control negativo. Se llevó a cabo la RT-PCR sobre ARN extraído de placas de 60mm utilizando RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. Citometría de flujo e inmunotransferencia de EGFR: después de la transfección del ARNip durante 24 horas, se cosecharon y tñieron las células con anticuerpo dirigido contra α -EGFR conjugado con PE (BD Pharmingen) y yoduro de propidio para el análisis de la citometría de flujo. Se recogieron 10.000 casos y se clasificaron las células en FSC, SSC, y PI. Para el análisis de la inmunotransferencia, se inmunotransfirieron los lisados con α -EGFR (MBL) o α , β -tubulina (Santa Cruz Biotechnology). Ensayo de proliferación: se llevó a cabo la inactivación del ARNip tal como se ha descrito en placas de 96 pocillos. Se evaluó el crecimiento celular después de 4 días mediante Cell Titer Glo (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Ensayo de apoptosis y sinergia con erlotinib: se llevó a cabo la transfección del ARNip tal como se ha descrito, en placas de 60 mm. A continuación se sembraron las células en placas de 96 pocillos a 1200/pocillo. Para el ensayo del erlotinib, se trataron las células con erlotinib diluido en medio que contenía 2 mg/ml de BSA. Para el ensayo de apoptosis con privación de alimento, se privaron de alimento las células con Optimem I. Para ambos ensayos, se midió la viabilidad celular con Cell Titer Glo (Promega, Madison, WI) y se midió la apoptosis con Caspasa-Glo 3/7 (Promega) después de 2 días. Se representaron gráficamente los datos como \pm desviación estándar media (SD) o error estándar (SE) tal como se ha indicado en las leyendas de las figuras.

Ejemplo 2

NLRR-1 se expresa en tumores de próstata y está asociado con enfermedad de grado alto

Se ha asociado la expresión de NLRR-1 con desarrollo temprano y neuroblastoma (Aubert y col., 2003; Haines y col., 2005; Hamano y col., 2004). Se ha descubierto que NLRR-1 se expresa en tumores de próstata, junto con otros varios tipos de tumor (Figura 1A, B, Figura 2A). La microdissección por captura láser y el perfilado de la expresión confirmaron la expresión en epitelio de próstata (Figura 1B) y la tinción de tumores de próstata con un anticuerpo policlonal específico del dominio extracelular de NLRR-1 reveló tinción de la membrana plasmática de tumores de próstata.

La expresión de NLRR-1 en tumores de próstata está asociado con enfermedad de grado alto, con mayores niveles de transcripción aparentes en casos con puntuación de Gleason de 7 y mayores, y menos transcrito en casos de Gleason < 7, neoplasia intraepitelial prostática, e hiperplasia prostática benigna. Una puntuación de Gleason más alta es uno de los parámetros clínicos asociados a un pronóstico peor en el cáncer de próstata (Andren y col., 2006b; Gleason y Mellinger, 1974). Como prueba independiente de la asociación entre NLRR-1 y enfermedad de alto grado y mal resultado, se realizaron la cuantificación del transcrito de MUC1 y NLRR-1 usando análisis mediante RT-PCR del ARN aislado de tumores de próstata (Figura 1D). MUC1 está asociado con un riesgo más elevado de muerte debida a cáncer de próstata, y con la evolución del cáncer de próstata, independientemente de otros parámetros (Andren y col., 2006b; Lapointe y col., 2004). La expresión de NLRR-1 y MUC1 estuvo fuertemente correlacionada, con un valor de r^2 de 0,93 (Figura 1C), respaldando adicionalmente la asociación entre una expresión elevada de NLRR-1 con una enfermedad de alto grado y mal resultado.

Ejemplo 3

NLRR-1 se expresa en muchos tumores diferentes y su expresión no se correlaciona con la expresión elevada de EGFR

El análisis del transcrito reveló que NLRR-1 se expresa no solo en tumores de próstata sino en una gama de tumores epiteliales, e incluso algunas neoplasias hematológicas agresivas tales como mieloma múltiple y linfoma de células del manto (Figura 2A,B; Figura 9A). En comparación, se detectó un transcrito de NLRR-3 en un subconjunto mucho más pequeño de muestras de tumores (Figura 9B): La expresión de NLRR-1 en los correspondientes tejidos normales estuvo más restringida, con poco o ningún transcrito detectado (Figura 2A). La inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal de NLRR-1 confirmó la expresión de la proteína en varios de estos diferentes tipos de tumor (de páncreas, mama, pulmón, y colon metastásico).

Estos datos indican que NLRR-1 facilita la ruta de señalización de EGFR y proporciona un medio para aumentar la activación de la ruta sin requerir la amplificación de EGFR. Como la expresión de uno u otro gen en tumores bastarían para la estimulación de la ruta, se podría esperar cierto modelo de expresión no correlacionado entre los tumores. Dicho modelo se observa, por ejemplo, para los transcritos de EGFR y ERBB2 (HER2), debido ampliamente a la amplificación de ERBB2 en un subconjunto de tumores de mama (Figura 2C), y también se

observó al comparar los datos de los transcritos de NLRR-1 y EGFR colectivamente en tumores de próstata, pulmón, mama, colon, pancreático, de riñón, estómago, endometrio y ovario (Figura 2D). La mayoría de tumores que expresan niveles elevados de EGFR mostraron poca o ninguna expresión de NLRR-1, y los tumores con niveles elevados de transcrito NLRR-1 tenían como máximo niveles moderados, y por lo general bajos, de EGFR. Otras proteínas tales como CBL y CDH1, que están asociadas con EGFR en una capacidad represora pero no están directamente implicadas en una señalización descendente (Levkowitz y col., 1998; Qian y col., 2004), no mostraron este modelo de correlación contraria del transcrito para datos de los mismos tumores (Figura 10A,B).

Ejemplo 4

NLRR-1 se asocia físicamente con EGFR y promueve la activación de la quinasa MAP

La posible interacción física entre NLRR-1 y EGFR se investigó mediante un análisis de inmunoprecipitación simultánea. Se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra NLRR-1 o EGFR para precipitar proteínas procedentes de líneas celulares que expresaban NLRR-1 de forma endógena, y se analizaron mediante inmunotransferencia para determinar la presencia de EGFR o NLRR-1. En la línea BT549 de tumor de mama, el tratamiento de las células con un anticuerpo monoclonal dirigido contra NLRR-1 precipitó simultáneamente EGFR de forma eficaz y, en el experimento recíproco, un anticuerpo dirigido contra EGFR pudo precipitar NLRR-1 (Figura 3A): Ninguna proteína precipitó cuando las células se trataron en las mismas condiciones con un anticuerpo dirigido contra una proteína irrelevante (ragweed). El análisis se extendió a la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H2009, que expresa niveles elevados de NLRR-1. Transferencias de sondeo de los lisados tratados con un anticuerpo dirigido contra NLRR-1 con anticuerpos dirigidos con NLRR-1, EGFR y ERBB2 produjeron bandas del tamaño adecuado, mientras que no se detectó señal de ERBB3 o de un receptor diferente miembro de la familia de la tirosina quinasa, IGF1R (Figura 3B). Estos datos sugieren que NLRR-1 se asocia físicamente bien directamente con EGFR o bien indirectamente mediante otros componentes del complejo de señalización de EGFR. También se esperaba una asociación entre NLRR-1 y la proteína clatrina formadora de revestimiento β -adaptina (AP2B1), debido al motivo de endocitosis mediada por clatrina conservado (Fukamachi y col., 2002), y esto también se observó por inmunoprecipitación simultánea en células NCI-H2009 y en análisis de inmunotransferencia (Figura 3B).

El papel de NLRR-1 en la estimulación de la señalización de la quinasa MAP se investigó usando NLRR-1 marcado con YFP en el extremo C. Las células transfectadas se clasificaron para determinar las células que expresaban YFP y se sometieron a citometría de flujo para determinar ERK fosforilado tras estimulación con cualquiera de EGF o $TGF\alpha$ (véase la Figura 11A,B para más datos sobre esta metodología. No se detectó señal de mejora en la estimulación con EGF de células Cos-7 (Figura 4A). Sin embargo, la estimulación con $TGF\alpha$ produjo un aumento significativo en la magnitud de la activación de la quinasa MAP en células transfectadas con NLRR-1, en comparación con los controles transfectados mediante vectores (Figura 4B). Estos hallazgos sugieren que NLRR-1 sirve como facilitador de la señalización de EGFR mediada por $TGF\alpha$.

NLRR-1 comparte una homología de secuencia significativa con NLRR-3, incluyendo una conservación completa de la región del extremo C que incluye el motivo de endocitosis mediado por clatrina que, en NLRR-3 es responsable de facilitar la señalización en respuesta a concentraciones bajas de EGF, supuestamente estimulando la agrupación de los componentes de la señalización en la membrana celular, y la señalización al complejo internalizado. La citometría de flujo de las construcciones de delección marcadas con YFP transfectadas a células normales indicó que el motivo de endocitosis en NLRR-1 sirve también para estimular la internalización de NLRR-1 (Figura 5A), aunque NLRR-1 siguió internalizado sin este motivo. Para resolver más directamente los efectos de la expresión de NLRR-1 sobre la internalización de EGFR en células tumorales, NLRR-1 se agotó con ARNip desactivado genéticamente en líneas celulares tumorales con expresión endógena (Figura 6A), y los niveles de la proteína EGFR en superficie se analizaron mediante citometría de flujo y se compararon con un control no dirigido por el ARNip (Figura 5B). En 3 líneas celulares tumorales con EGFR suficiente para una citometría de flujo cuantitativa (NCI-H2009, NCI-H226, NCI-H647), se detectó un aumento en la EGFR de la superficie en células en las que se había agotado NLRR-1, cuya magnitud fue mayor en células que expresaban el mayor nivel endógeno de NLRR-1 (NCI-H2009, Figura 6A; Figura 5B). Estos datos respaldan un papel de NLRR-1 para estimular la captación del complejo de señalización de EGFR. Los niveles de proteína total de EGFR permanecieron inalterados en las células con NLRR-1 agotado y las células agotadas de control, lo que indica que la disminución en la expresión de superficie no era resultado de una mayor degradación.

Ejemplo 5

NLRR-1 es importante para la viabilidad celular y la resistencia a la apoptosis en líneas celulares tumorales con expresión endógena

El papel de NLRR-1 en células tumorales se investigó adicionalmente con un panel de 5 líneas celulares de carcinoma de pulmón no microcítico donde NLRR-1 se expresaba de forma endógena con diferentes niveles de transcrito (NCI-H2009, NCI-H520, NCI-H647, NCI-H1781, NCI-H226; Figura 6A). La desactivación de NLRR-1 mediante ARNip dio como resultado defectos de proliferación similares en todas estas líneas, si se compara con un control sin dirección mediante ARNip, cuando se analizó mediante un ensayo cuantitativo de viabilidad celular

basado en ATP (Figura 6A, B). En cambio, no se observó un defecto significativo en la proliferación con el NLRR-1 desactivado mediante ARNip en SKMES1, una línea celular de carcinoma de pulmón que no expresa NLRR-1 (Figura 6A,B).

5 La activación de la ruta EGFR en células tumorales tiene consecuencias para muchos procesos celulares importantes, incluyendo la supervivencia celular. La señalización de EGFR se produce tanto en la superficie de la célula como a partir del complejo internalizado, y la señalización de EGFR asociada al endosoma se ha implicado en la estimulación de las rutas de transducción de la señal que conducen a la supervivencia celular (Wang y col., 2002).
 10 Dado el posible papel de NLRR-1 para estimular la agrupación y la internalización del complejo de señalización de EGFR, el defecto de viabilidad observado al desactivar NLRR-1 se investigó adicionalmente para determinar si la aparente reducción en la viabilidad era resultado solamente de un menor crecimiento, o si la muerte celular apoptótica estaba presente. NLRR-1 se desactivó genéticamente con ARNip, las células se sometieron a privación de alimento para estimular la apoptosis, y se midió la apoptosis mediante la actividad de la caspasa 3/7 y se normalizó para las células viables (Figura 6C).
 15 Todas las líneas celulares que expresaban NLRR-1 de forma endógena mostraron un aumento en la apoptosis tras la desactivación genética de NLRR-1 si se compara con un control con dirigido mediante ARN. Estos datos indican que NLRR-1 es importante para la viabilidad en estas líneas celulares tumorales con expresión endógena, y contribuye a la resistencia de la muerte celular apoptótica.

20 Ejemplo 6

Un anticuerpo monoclonal dirigido contra NLRR-1 atenúa la activación de la quinasa MAP y la quinasa PI3 en células tumorales

25 Tal como se demuestra en el presente documento, NLRR-1 promueve la activación de la ruta de la quinasa MAP, tal como se evalúa mediante la fosforilación de ERK, cuando se transfecta a células normales. Para investigar si NLRR-1 tiene un papel similar en células tumorales, la línea celular de carcinoma de pulmón NCI-H2009 se transfectó con anticuerpos, se estimularon con suero, EGF, o $TGF\alpha$, y se evaluó la fosforilación de ERK cuantitativamente durante un intervalo de 25 minutos mediante citometría de flujo. El anticuerpo monoclonal 3D1 dirigido contra NLRR-1 pudo reducir de manera significativa la magnitud de la fosforilación de ERK en respuesta tanto a suero como a $TGF\alpha$, (Figura 7A,B; Figura 11) cuando se compara con un anticuerpo de control dirigido contra una proteína irrelevante (Ragweed). En una evaluación de la solidez del ensayo, el análisis de células estimuladas con suero en varios ensayos realizados de forma independiente indicó que la atenuación de la fosforilación de ERK era reproducible (Figura 11B) y también evidente en una línea celular diferente positiva para NLRR-1, NCI-H520 (Figura 11C).
 30 Estos datos indican que NLRR-1 podría tener un papel importante en la activación de la ruta de la quinasa MAP en respuesta a la estimulación con $TGF\alpha$, y suero.

35 Consistente con la falta de efecto observado sobre la activación de ERK usando EGF en células normales transfectadas con NLRR-1, el anticuerpo 3D1 tuvo poco o ningún efecto en la señalización mediada por EGF en NCI-H2009 en concentraciones de 100 ng/ml y 1 ng/ml EGF (Figura 7C, D). La evidencia de una magnitud retrasada y reducida de la activación por ERK solo fue evidente a baja concentración de EGF (0,1 ng/ml; Figura 7E). Estos datos sugieren que cualquier papel que debería tener NLRR-1 en el estímulo de la activación de la quinasa MAP en respuesta a EGF solo es relevante a bajas concentraciones de EGF. Es posible que este resultado sea sin embargo fisiológicamente relevante para células tumorales en entornos con limitación del factor de crecimiento en el hospedador, y estos datos también son consistentes que la mayor activación de la ruta estimulada por el NLRR-3 homólogo, que solamente se observa a concentraciones muy bajas de EGF (Fukamachi y col., 2002).

40 La activación de EGFR también da como resultado una señalización a través de la ruta de la quinasa PU3, que puede desencadenar una cascada de respuestas que afectan al crecimiento celular, proliferación, supervivencia y motilidad, que contribuye a impulsar la progresión del tumor (Hennessy y col., 2005; Vivanco y Sawyers, 2002). El posible papel de NLRR-1 para estimular la ruta de señalización de PI3 en células tumorales también se investigó con el anticuerpo monoclonal 3D1 dirigido contra NLRR-1 y la citometría de flujo cuantitativa de AKT fosforilado después de tratamiento con suero al 10 %, $TGF\alpha$, y EGF. Concordante con las observaciones acerca de la activación de la quinasa MAP, 3D1 redujo la magnitud de la fosforilación de AKT en respuesta a la estimulación mediante $TGF\alpha$, o suero al 10 % (Figura 7F,G). De nuevo, se observó poco efecto de bloqueo con la estimulación de EGF (Figura 7H) y cierta evidencia de posible inhibición de la fosforilación solamente se detectó a una concentración muy baja de EGF (0,01 ng/ml, Figura 7I).

45 La atenuación de la activación de la quinasa MAP observada con el anticuerpo 3D1 dirigido contra NLRR-1 se comparó directamente con la generada por un inhibidor selectivo de EGFR, erlotinib ("Tarceva"). Las células NCI-H2009 se han caracterizado por ser sensibles a erlotinib, con una CI_{50} inferior o igual a 2 μ M (Yauch y col., 2005). Las células NCI-H2009 se estimularon con $TGF\alpha$ en presencia de 3D1, un anticuerpo de control dirigido contra una proteína irrelevante (Ragweed) y 0,25 μ M o 2,5 μ M de erlotinib. El anticuerpo 3D1 pudo atenuar la fosforilación de la quinasa MAP al menos tan bien como erlotinib 2,5 μ M (Figura 7J, K). Al dirigir NLRR-1 con un anticuerpo, se produjo un efecto similar al dirigir EGFR directamente con un inhibidor selectivo de la quinasa, estos datos indican que la expresión de NLRR-1 es importante para activación de la ruta en estas líneas celulares tumorales con expresión

endógena. La atenuación de la activación de la quinasa MAP en NCI-H520 con anticuerpo monoclonal de NLRR-1 (Figura 11C) indica que esto también es cierto para una línea celular resistente a erlotinib (Yauch y col., 2005).

Ejemplo 7

5 **El agotamiento de NLRR-1 en líneas de células de tumores de pulmón promueve la apoptosis tras el tratamiento con el inhibidor de EGFR Erlotinib.**

10 Una contribución de la señalización de EGFR a la neoplasia de las células tumorales es el estímulo de la supervivencia celular, y se ha demostrado que los inhibidores de EGFR aumentan la apoptosis de células tumorales (Chinnaiyan y col., 2005; Moyer y col., 1997; Ng y col., 2002; Sordella y col., 2004). En células tumorales de colon, el direccionamiento tanto de EGFR como de ERBB2 con inhibidores de molécula pequeña dio como resultado un efecto sinérgico en el aumento de la apoptosis (Zhou y Brattain, 2005). Algunas de las líneas celulares de tumor de pulmón utilizadas en este estudio, que expresan NLRR-1 de forma endógena, se habían clasificado como resistentes a erlotinib, con una CI_{50} de 8 μ M o mayor (Yauch y col., 2005). Se ha demostrado que erlotinib potencia la apoptosis en células tumorales en el tratamiento combinado (Chinnaiyan y col., 2005; Ng y col., 2002). Puesto que la desactivación genética de NLRR-1 en líneas celulares de tumor con expresión endógena da como resultado un aumento en la apoptosis, se llevó a cabo un estudio para determinar si se observaban cambios en la sensibilidad a la apoptosis en presencia de erlotinib con desactivación genérica de NLRR-1 en estas líneas celulares, por otra parte resistentes.

20 NLRR-1 se agotó usando desactivación genética mediante ARNip y las células se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de erlotinib. Algunas de estas líneas celulares mostraron un aumento en la apoptosis, tal como se evaluó mediante la actividad de la caspasa 3/7 (Figura 8). Fue evidente un significativo aumento en la sensibilidad para la línea de células NCI-H647 por otra parte resistente a erlotinib (Yauch y col., 2005) (Figura 8A), así como una sinergia entre la inactivación de NLRR-1 y erlotinib para las líneas de células resistentes NCI-H1781 (Figura 8B), NCI-H226 (Figura 8C), y también, posiblemente, en un grado inferior en NCI-H520 (Figura 8D). NCI-H2009, que es sensible a erlotinib (Yauch y col., 2005), no mostró ningún aumento en la apoptosis en células con agotamiento de NLRR-1 (Figura 8E). Tal como se esperaba, la línea celular tumoral de control SK-MES (sensible a erlotinib) negativa para NLRR-1 no mostró ningún aumento en la apoptosis tras la desactivación genética de NLRR-1 (Figura 8F). Estos datos respaldan los hallazgos de los autores, donde NLRR-1 tiene un papel significativo en la señalización de EGFR, y sugieren que NLRR-1 podría contribuir potencialmente a la insensibilidad descubierta en muchos tumores a los inhibidores de la quinasa EGFR tales como erlotinib.

Referencias

- 5 Andren, O., Fall, K., Andersson, S., Rubin, M.A., Karlsson, M., Bismar, T.A., Johansson, J., y Mucci, L. (2006a). Muc-1 gene is associated with prostate cancer progression: A 20-year follow-up of a population based study in Sweden. 2006 Prostate Cancer Symposium.
- 10 Andren, O., Fall, K., Franzen, L., Andersson, S.O., Johansson, J.E., and Rubin, M.A. (2006b). How well does the Gleason score predict prostate cancer death? A 20-year follow-up of a population based cohort in Sweden. *The Journal of urology* 175, 1337-1340.
- 15 Aubert, J., Stavridis, M.P., Tweedie, S., O'Reilly, M., Vierlinger, K., Li, M., Ghazal, P., Pratt, T., Mason, J.O., Roy, D., y col., (2003). Screening for mammalian neural genes via fluorescence-activated cell sorter purification of neural precursors from Sox1-gfp knock-in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Supl 1, 11836-11841.
- 20 Bormann, P., Roth, L.W., Andel, D., Ackermann, M., y Reinhard, E. (1999). zfNLRR, a novel leucine rich repeat protein is preferentially expressed during regeneration in zebrafish. *Mol Cell Neurosci* 13, 167-179.
- 25 Chinnaiyan, P., Huang, S., Vallabhaneni, H. G., Armstrong, E., Varambally, S., Tomlins, S.A., Chinnaiyan, A.M., y Harari, P.M. (2005). Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). *Cancer research* 65, 3328-3335.
- 30 Dziadziuszko, R., Witta, S.E., Cappuzzo, F., Park, S., Tanaka, K., Danenberg, P.V., Baron, A.E., Crino, L., Franklin, W.A., Bunn, P.A., Jr., y col., (2006). Epidermal growth factor receptor messenger RNA expression, gene dosage, and gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12, 3078-3084.
- 35 Eberhard, D.A., Johnson, B.E., Amler, L.C., Goddard, A.D., Heldens, S.L., Herbst, R.S., Ince, W.L., Janne, P.A., Januario, T., Johnson, D.H., y col., (2005). Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 23, 5900-5909. Ebner, R., y Derynck, R. (1991). Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha: differential intracellular routing and processing of ligand-receptor complexes. *Cell regulation* 2, 599-612.
- 40 El-Obeid, A., Hesselager, G., Westermarck, B., y Nister, M. (2002). TGF-alpha-driven tumor growth is inhibited by an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 349-358.
- 45 Fukamachi, K., Matsuoka, Y., Kitanaka, C. Kuchino, Y., y Tsuda, H. (2001). Rat neuronal leucine-rich repeat protein-3: cloning and regulation of the gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 257-263.
- 50 Fukamachi, K., Matsuoka, Y., Ohno, H., Hamaguchi, T., y Tsuda, H. (2002). Neuronal leucine-rich repeat protein-3 amplifies MAPK activation by epidermal growth factor through a carboxyl-terminal region containing endocytosis motifs. *J Biol Chem* 277, 43549-43552.
- 55 Gleason, D.F., y Mellinger, G.T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *The Journal of urology* 111, 58-64.
- 60 Haines, B.P., Gupta, R., Michael Jones, C. Summerbell, D., y Rigby, P.W. (2005). The NLRR gene family and mouse development: Modified differential display PCR identifies NLRR-1 as a gene expressed in early somatic myoblasts. *Dev Biol* 281, 145-159.
- 65 Hamano, S., Ohira, M., Isogai, E., Nakada, K., y Nakagawara, A. (2004). Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLRR) family genes and inverse association of expression of Nbla10449/hNLRR-1 and Nbla10677/hNLRR-3 with the prognosis of primary neuroblastomas. *Int J Oncol* 24, 1457-1466.
- 70 Han, S.W., Kim, T.Y., Hwang, P.G., Jeong, S., Kim, J., Choi, I.S., Oh, D.Y., Kim, J.H., Kim, D.W., Chung, D.H., y col., (2005). Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in no small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Clin Oncol* 23, 2493-2501.
- 75 Haugh, J.M., Huang, A.C., Wiley, H.S., Wells, A., y Lauffenburger, D.A. (1999a). Internalized epidermal growth factor receptors participate in the activation of p21 (ras) in fibroblasts. *J Biol Chem* 274, 34350-34360.
- 80 Haugh, J.M., Schooler, K., Wells, A., Wiley, H.S., y Lauffenburger, D.A. (1999b). Effect of epidermal growth factor receptor internalization on regulation of the phospholipase C-gamma1 signaling pathway. *J Biol Chem* 274, 8958-8965.
- 85 Hayata, T., Uochi, T., y Asashima, M. (1998). Molecular cloning of XNLRR-1, a Xenopus homolog of mouse neuronal leucine-rich repeat protein expressed in the developing Xenopus nervous system. *Gene* 221, 159-166.

- Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., y Mills, G.B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature reviews* 4, 988-1004.
- 5 Jhappan, C. Stahle, C. Harkins, R.N., Fausto, N., Smith, G.H., y Merlino, G.T. (1990). TGF alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell* 61, 1137-1146.
- 10 Jiang, D., Yang, H., Willson, J.K., Liang, J., Humphrey, L.E., Zborowska, E., Wang, D., Foster, J., Fan, R., and Brattain, M.G. (1998). Autocrine transforming growth factor alpha provides a growth advantage to malignant cells by facilitating re-entry into the cell cycle from suboptimal growth states. *J Biol Chem* 273, 31471-31479.
- 15 Lapointe, J., Li, C. Higgins, J.P., van de Rijn, M., Bair, E., Montgomery, K., Ferrari, M., Egevad, L., Rayford, W., Bergerheim, U., y col., (2004). Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 811-816.
- 20 Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger, B., y Yarden, Y. (1998). c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes & development* 12, 3663-3674.
- 25 Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M. Supko, J.G. Haluska, F.G., y col., (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350: 2129-2139.
- 30 Maeda, K., Kato, Y., y Sugiyama, Y. (2002). pH-dependent receptor/ligand dissociation as a determining factor for intracellular sorting of ligands for epidermal growth factor receptors in rat hepatocytes. *J Control Release* 82, 71-82.
- 35 Martinez-Arca, S., Bech-Serra, J.J., Hurtado-Kuttner, M., Borroto, A., y Arribas, J. (2005). Recycling of cell surface pro-transforming growth factor- α regulates epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem* 280, 36970-36977.
- 40 Moyer, J.D., Barbacci, E.G., Iwata, K.K., Arnold, L., Boman, B., Cunningham, A., DiOrio, C. Doty, J., Morin, M.J., Moyer, M.P., y col., (1997). Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer research* 57, 4838-4848.
- 45 Ng, S.S., Tsao, M.S. Nicklee, T., and Hedley, D.W. (2002). Effects of the epidermal growth factor receptor inhibitor OSI-774, Tarceva, on downstream signaling pathways and apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma. *Molecular cancer therapeutics* 1, 777-783.
- 50 O'Dwyer P, J., and Benson, A.B., 3rd (2002). Epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer. *Semin Oncol* 29, 10-17.
- 55 Oliveira, S., van Bergen en Henegouwen, P.M., Storm, G., y Schifflers, R.M. (2006). Molecular biology of epidermal growth factor receptor inhibition for cancer therapy. *Expert opinion on biological therapy* 6, 605-617.
- 60 Paez, J.G., Janne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., y col., (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497-1500.
- 65 Qian, X., Karpova, T., Sheppard, A.M., McNally, J., y Lowy, D.R. (2004). E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *The EMBO journal* 23, 1739-1748.
- Sato, Y., Takahashi, M., Shibukawa, Y., Jain, S.K., Hamaoka, R., Miyagawa, J., Yaginuma, Y., Honke, K., Ishikawa, M., y Taniguchi, N. (2001). Overexpression of N-acetylglucosaminyltransferase III enhances the epidermal growth factor-induced phosphorylation of ERK in HeLaS3 cells by up-regulation of the internalization rate of the receptors. *J Biol Chem* 276, 11956-11962.
- Scher, H.I., Sarkis, A., Reuter, V., Cohen, D., Netto, G., Petrylak, D., Lianes, P., Fuks, Z., Mendelsohn, J., y Cordon-Cardo, C. (1995). Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in the progression of prostatic neoplasms. *Clin Cancer Res* 1, 545-550.
- Schoeberl, B., Eichler-Jonsson, C. Gilles, E.D., y Muller, G. (2002). Computational modeling of the dynamics of the MAP kinase cascade activated by surface and internalized EGF receptors. *Nat Biotechnol* 20, 370-375.
- Sebastian, S., Settleman, J., Reshkin, S.J., Azzariti, A., Bellizzi, A., y Paradiso, A. (2006). The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochimica et biophysica acta* 1766, 120-139.

- 5 Shepherd, F.A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E.H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., y col., (2005). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353, 123-132.
- 10 Sordella, R., Bell, D.W., Haber, D.A., y Settleman, J. (2004). Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 305, 1163-1167.
- 15 Tackels-Horne, D., Goodman, M.D., Williams, A.J., Wilson, D.J., Eskandari, T., Vogt, L.M., Boland, J.F., Scherf, U., and Vockley, J.G. (2001). Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma and metastatic liver tumors by oligonucleotide expression profiling. *Cancer* 92, 395-405.
- 20 Taguchi, A., Wanaka, A., Mori, T., Matsumoto, K., Imai, Y., Tagaki, T., y Tohyama, M. (1996). Molecular cloning of novel leucine-rich repeat proteins and their expression in the developing mouse nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 35, 31-40.
- 25 Taniguchi, H., Tohyama, M., y Takagi, T. (1996). Cloning and expression of a novel gene for a protein with leucine-rich repeats in the developing mouse nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 36, 45-52.
- 30 Tsao, M.S. Sakurada, A., Cutz, J.C., Zhu, C.Q., Kamel-Reid, S., Squire, J., Lorimer, I., Zhang, T., Liu, N., Daneshmand, M., y col., (2005). Erlotinib in lung cancer molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 353, 133-144.
- 35 Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- 40 Wang, D., Li, W., Jiang, W., Humphrey, L.E., Howell, G.M., y Brattain, M.G. (1998). Autocrine TGFalpha expression in the regulation of initiation of human colon carcinoma growth. *J Cell Physiol* 177, 387-395.
- 45 Wang, Y., Pennock, S., Chen, X., y Wang, Z. (2002). Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival. *Mol Cell Biol* 22, 7279-7290.
- 50 Wells, A. (1999). EGF receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology* 31, 637-643.
- 55 Yauch, R.L., Januario, T., Eberhard, D.A., Cavet, G., Zhu, W., Fu, L., Pham, T.Q., Soriano, R., Stinson, J., Seshagiri, S., y col., (2005). Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 11, 8686-8698.
- 60 Zhou, Y., y Brattain, M.G. (2005). Synergy of epidermal growth factor receptor kinase inhibitor AG1478 and ErbB2 kinase inhibitor AG879 in human colon carcinoma cells is associated with induction of apoptosis. *Cancer research* 65, 5848-5856.

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de la proteína 1 neuronal con repeticiones ricas en leucina (NLRR-1) para su uso en un método para tratar el cáncer donde las células cancerosas expresan NLRR-1 y EGFR en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de dicho antagonista de NLRR-1, siendo dicho antagonista un anticuerpo dirigido contra NLRR-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
2. El antagonista de NLRR-1 para el uso de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
3. El antagonista de NLRR-1 para el uso de la reivindicación 2, donde el anticuerpo monoclonal es 3D1.6.9 producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732 de la ATCC.
4. El antagonista de NLRR-1 para el uso de la reivindicación 1, donde el anticuerpo compite por la unión con el anticuerpo monoclonal 3D1.6.9 producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732 de la ATCC.
5. El antagonista de NLRR-1 para el uso de la reivindicación 4, donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano, o anticuerpo humanizado,
6. El antagonista de NLRR-1 para el uso de la reivindicación 5, donde el anticuerpo quimérico o humanizado comprende un fragmento procedente del anticuerpo monoclonal 3D1.6.9 producido a partir de células de hibridoma que tienen el número de acceso PTA-8732 de la ATCC.
7. El antagonista de NLRR-1 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) no se amplifica en el cáncer.
8. El antagonista de NLRR-1 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, comprendiendo además el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de EGFR, donde dicho antagonista de EGFR es un anticuerpo dirigido contra EGFR o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una molécula pequeña que se une a EGFR.
9. El antagonista de NLRR-1 para el uso de la reivindicación 8, donde dicha molécula pequeña que se une a EGFR se selecciona entre el grupo que consiste de: OSI-774 (CP-358774, erlotinib, OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinilo]-, diclorhidrato, Pfizer Inc.); Iressa® (ZD1839, gefitinib, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metil-fenil-amino)-quinazolina, Zeneca); BIBX-1382 (N8-(3-cloro-4-fluoro-fenil)-N2-(1-metil-piperidin-4-il)-pirimido[5,4-d]pirimidina-2,8-diamina, Boehringer Ingelheim); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-feniletíl)amino]-1H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-4-[(1-feniletíl)amino]-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidina); CL-387785 (N-[4-[(3-bromofenil)amino]-6-quinazolinil]-2-butanamida); EKB-569 (N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-2-butanamida); lapatinib (Tykerb, GlaxoSmithKline); ZD6474 (Zactima, AstraZeneca); CUDC-101 (Curis); canertinib (CI-1033); AEE788 (6-[4-[(4-etil-1-piperazinil)metil]fenil]-N-[(1R)-1-feniletíl]-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-amina, WO2003013541, Novartis) y PK1166 4-[4-[(1R)-1-feniletíl]amino]-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol, documento WO9702266 de Novartis).
10. El antagonista de NLRR-1 para el uso de las reivindicaciones 8 o 9, donde (i) el cáncer es resistente a un antagonista de EGFR. o (ii) la administración del antagonista de NLRR-1 y del antagonista de EGFR aumenta la inhibición del crecimiento del cáncer en comparación con la administración del antagonista de EGFR sin la administración del antagonista de NLRR-1.
11. El antagonista de NLRR-1 para el uso de las reivindicaciones 8 o 9, donde la molécula pequeña es erlotinib.
12. El antagonista de NLRR-1 para el uso de la reivindicación 11, donde el cáncer es resistente a erlotinib.
13. El antagonista de NLRR-1 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de páncreas y cáncer de ovario.
14. Un método para identificar pacientes que podrían beneficiarse (i) de un antagonista de NLRR-1, o (ii) una combinación de un antagonista de NLRR-1 y un antagonista de EGFR, que comprende comparar el nivel de NLRR-1 presente en una población de células del ensayo aislada de un paciente y una población de células de referencia, donde para (ii) la población de células del ensayo no comprende la amplificación de EGFR, donde un aumento en el nivel de expresión de NLRR-1 en la población de células del ensayo indica que el paciente podría beneficiarse de dicho tratamiento con un antagonista de NLRR1 o dicho tratamiento combinado de un antagonista de NLRR-1 y un antagonista de EGFR, y donde dicho antagonista de NLRR-1 es como se define en la reivindicación 1 y dicho antagonista de EGFR es como se define en las reivindicaciones 8 o 9.

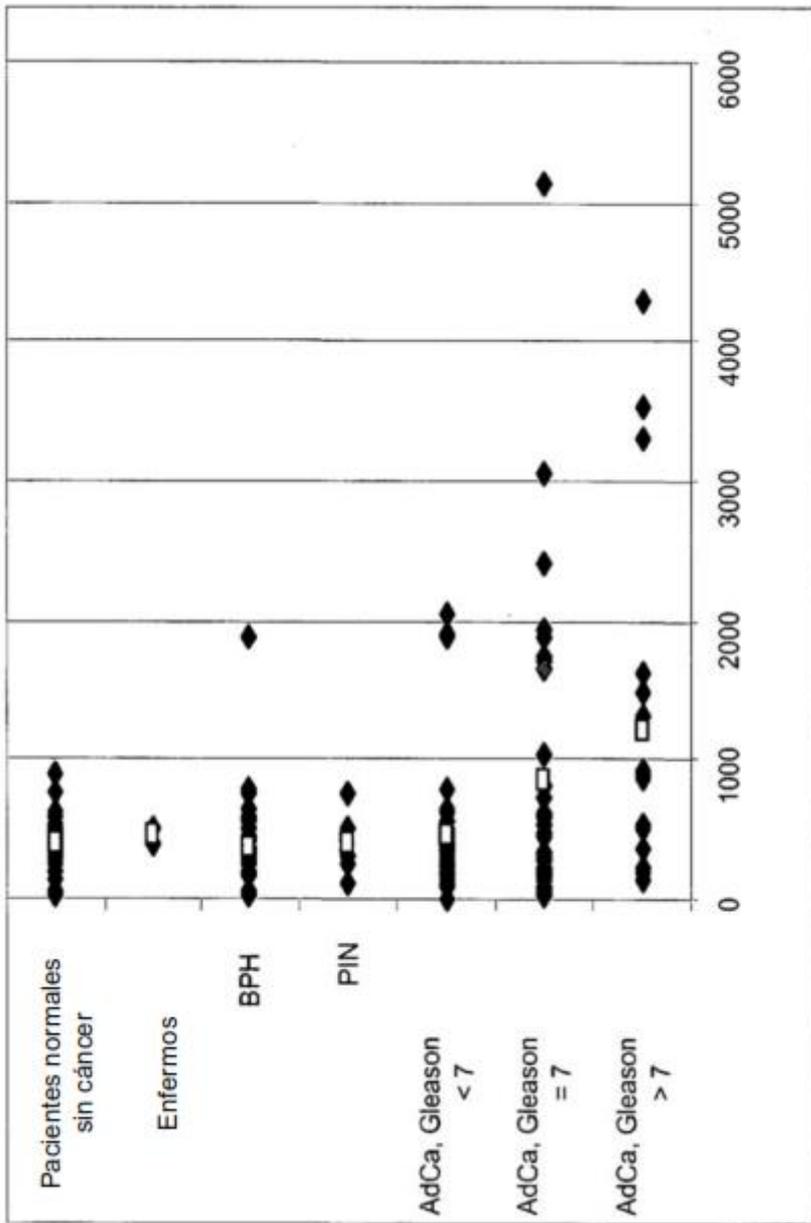


Figura 1A

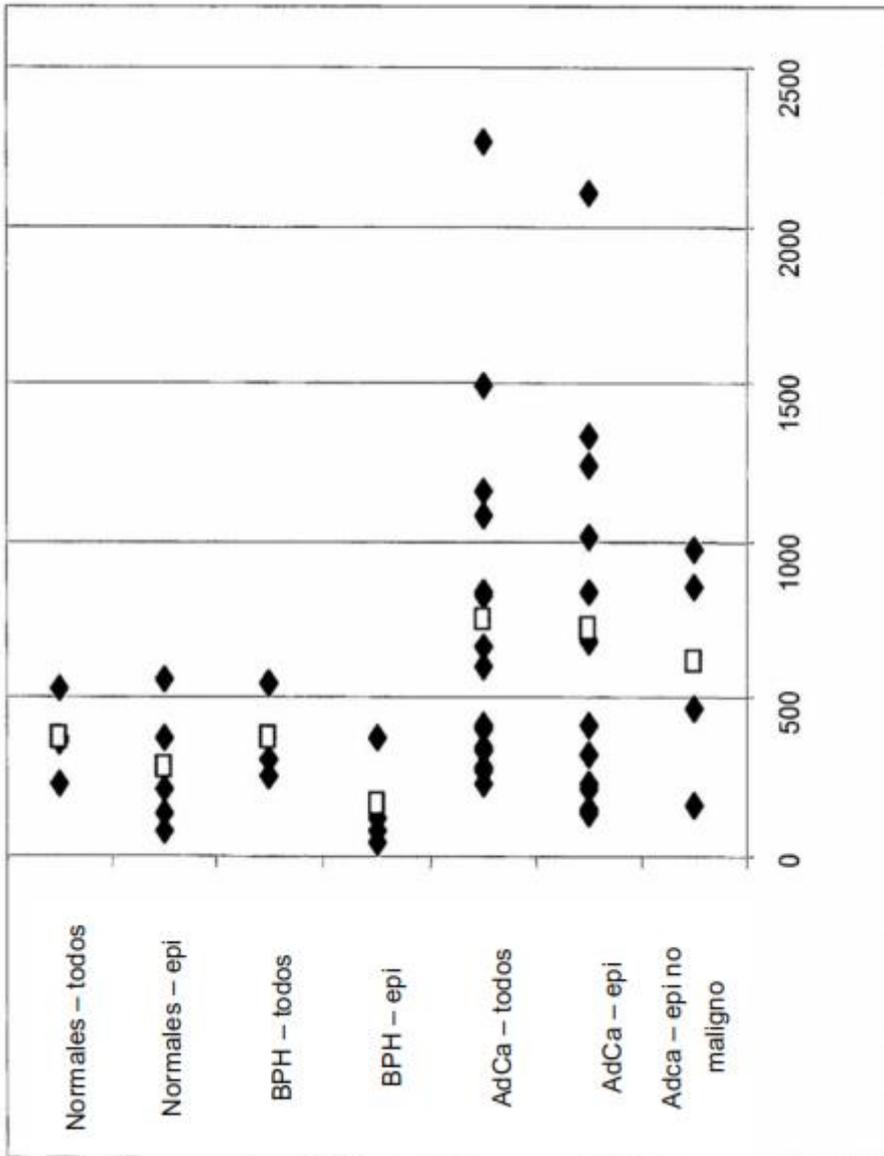


Figura 1B

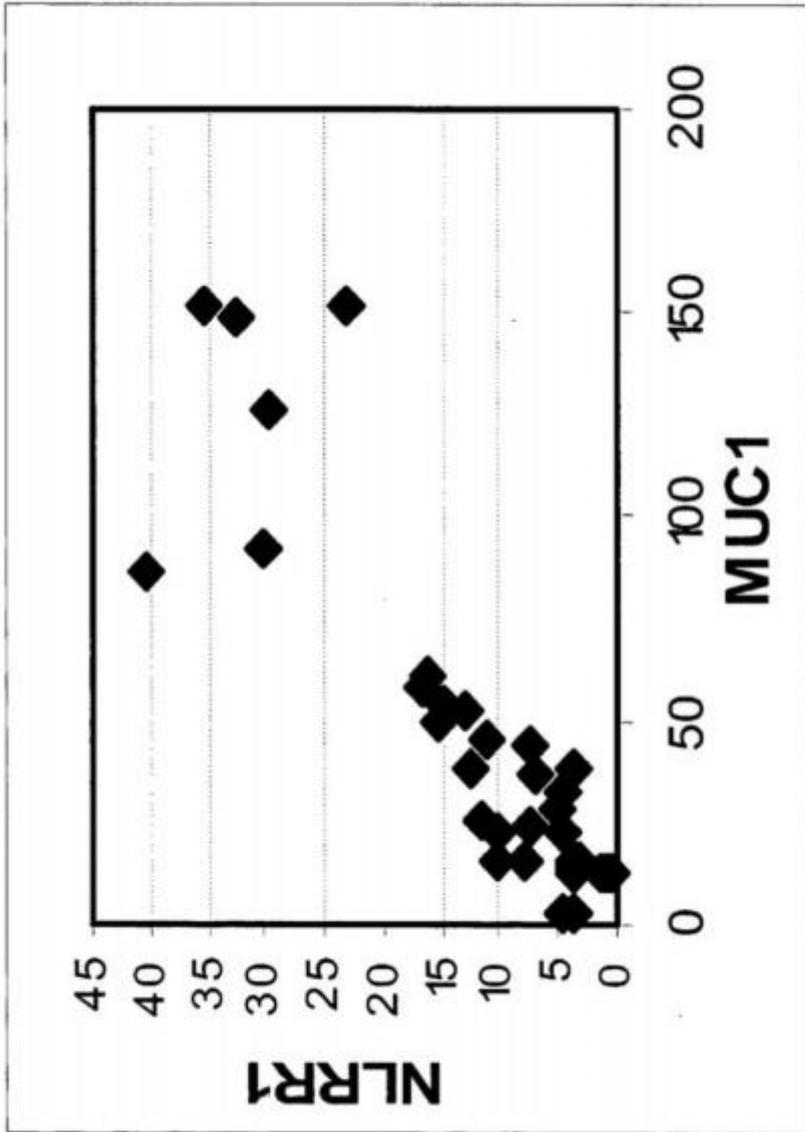


Figura 1C

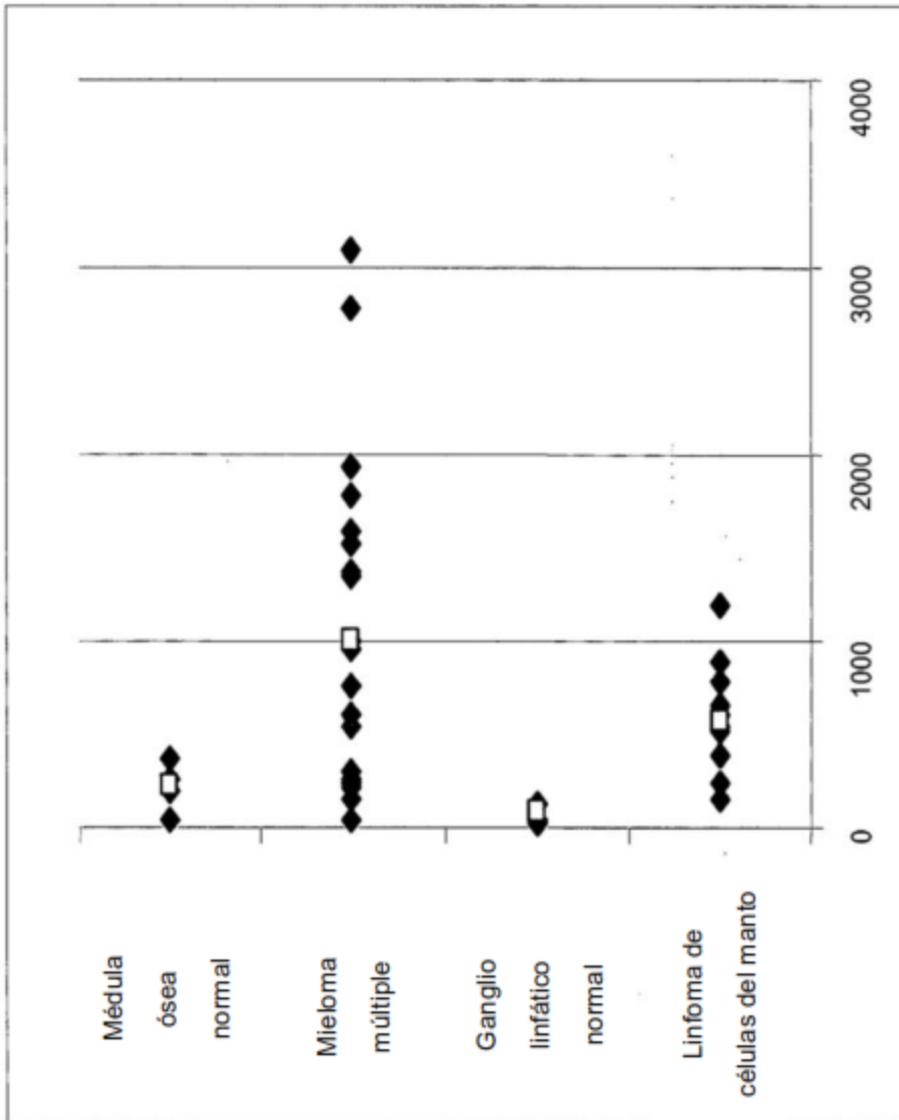


Figura 2B

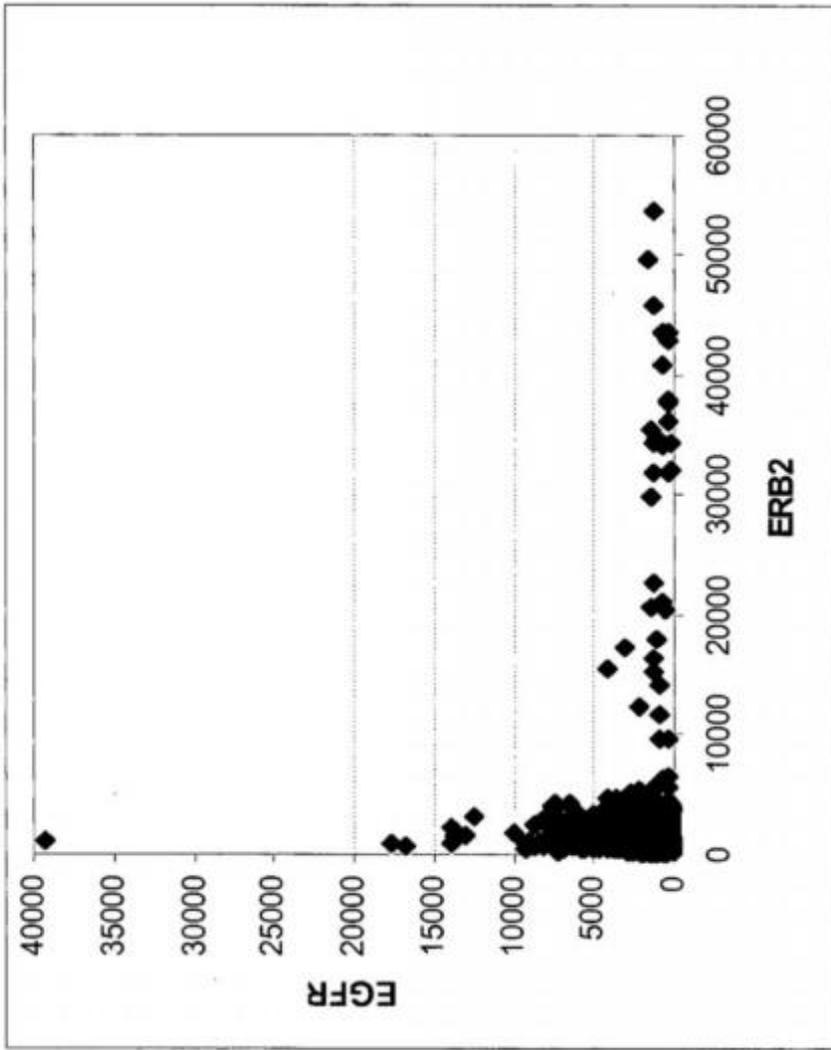


Figura 2C

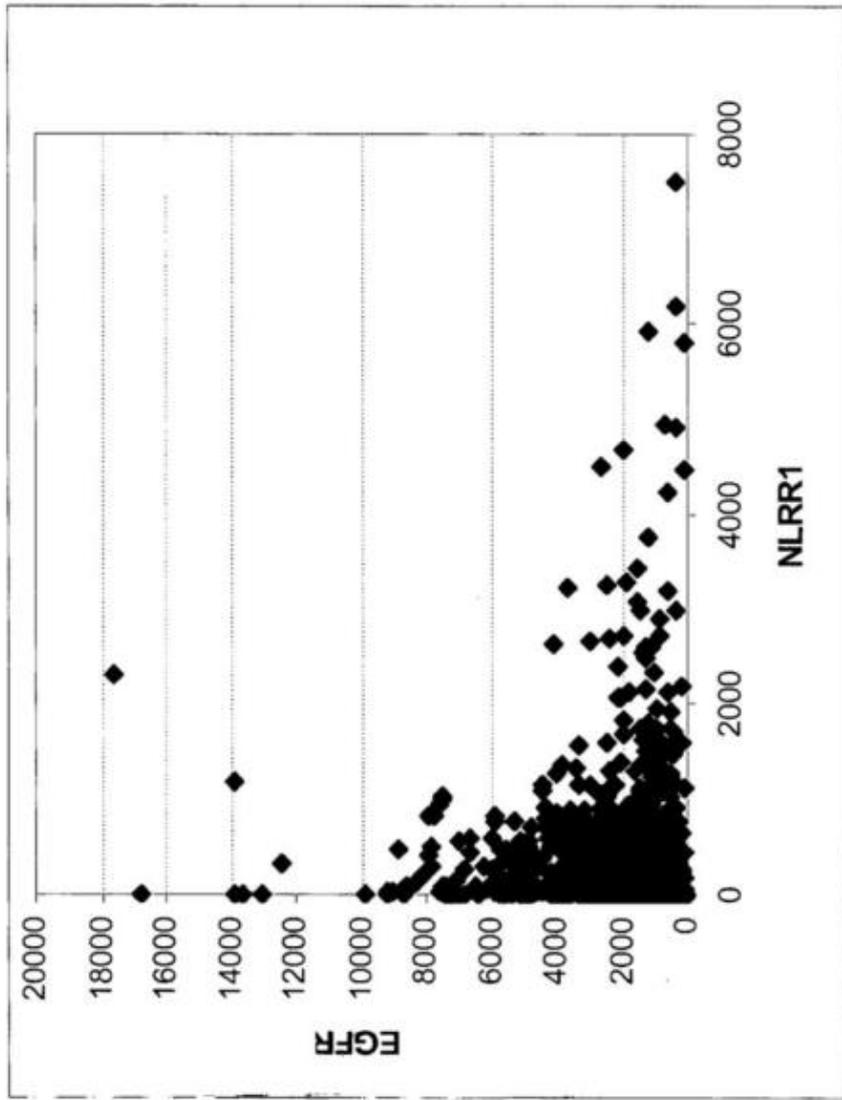


Figura 2D

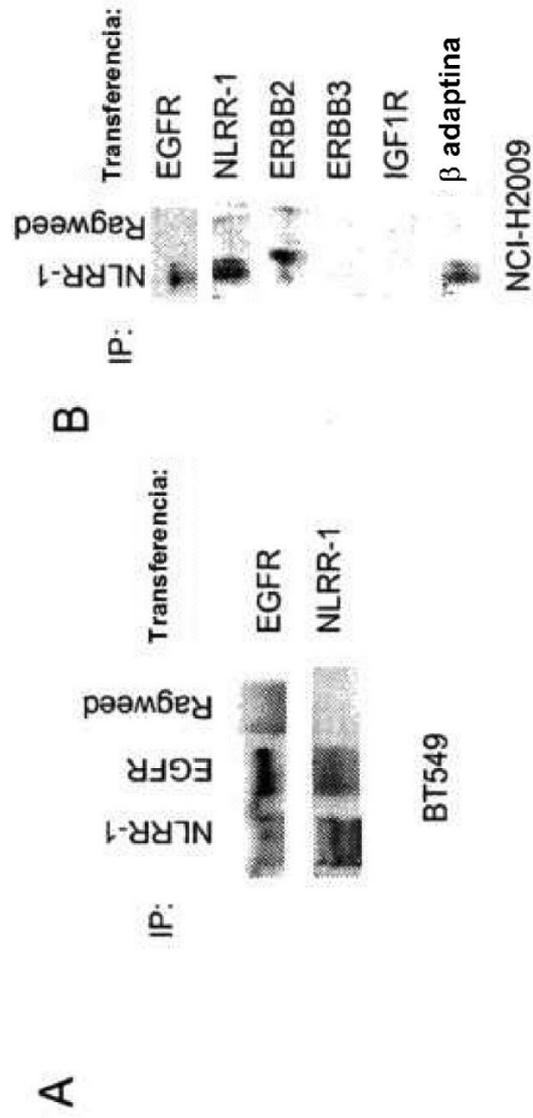


Figura 3

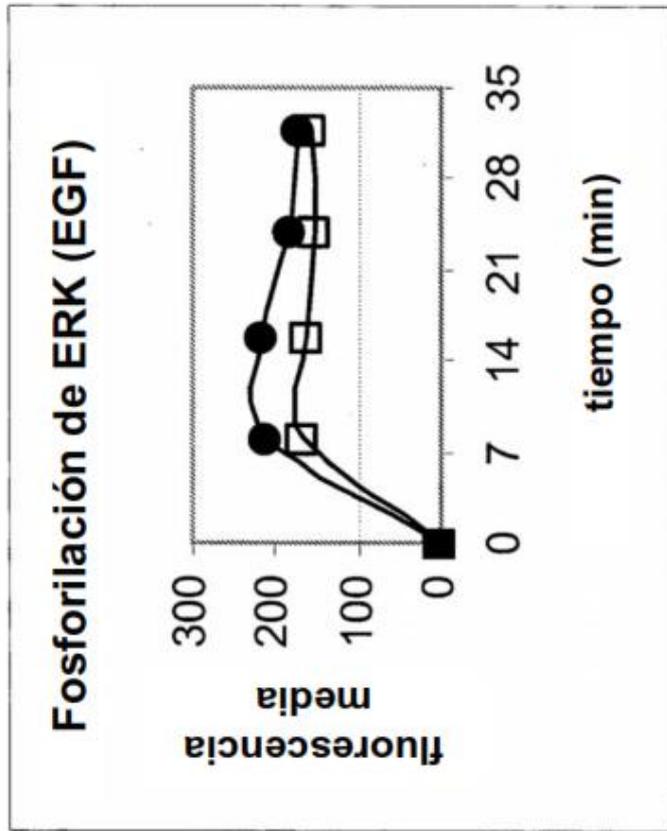


Figura 4A

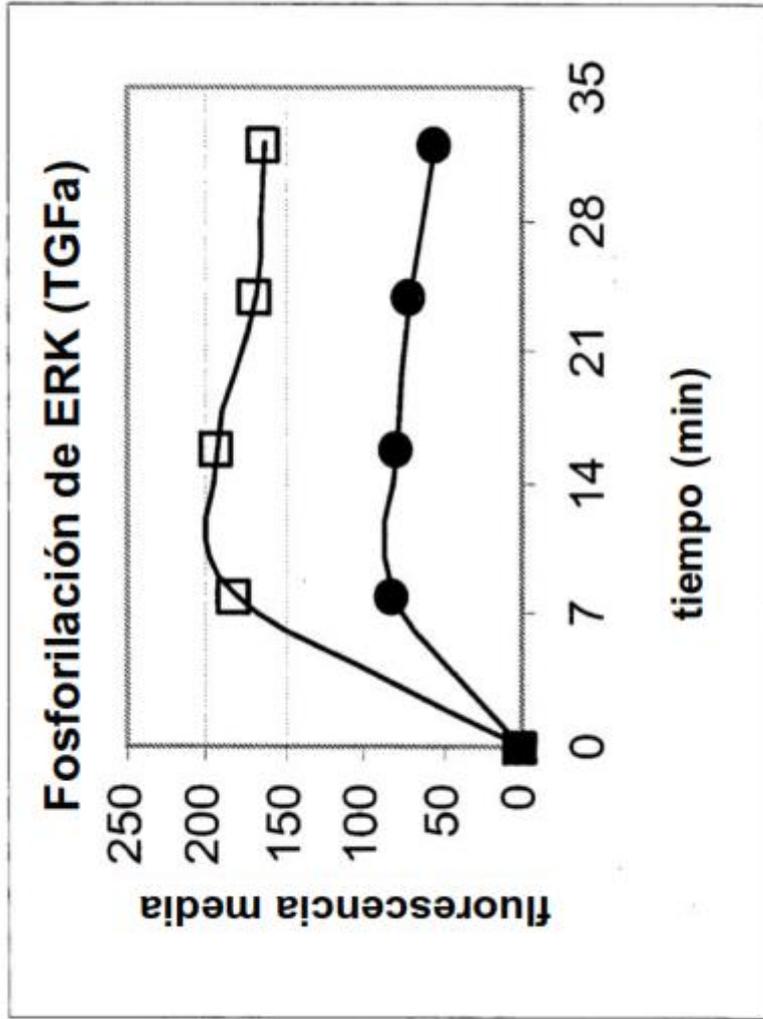


Figura 4B

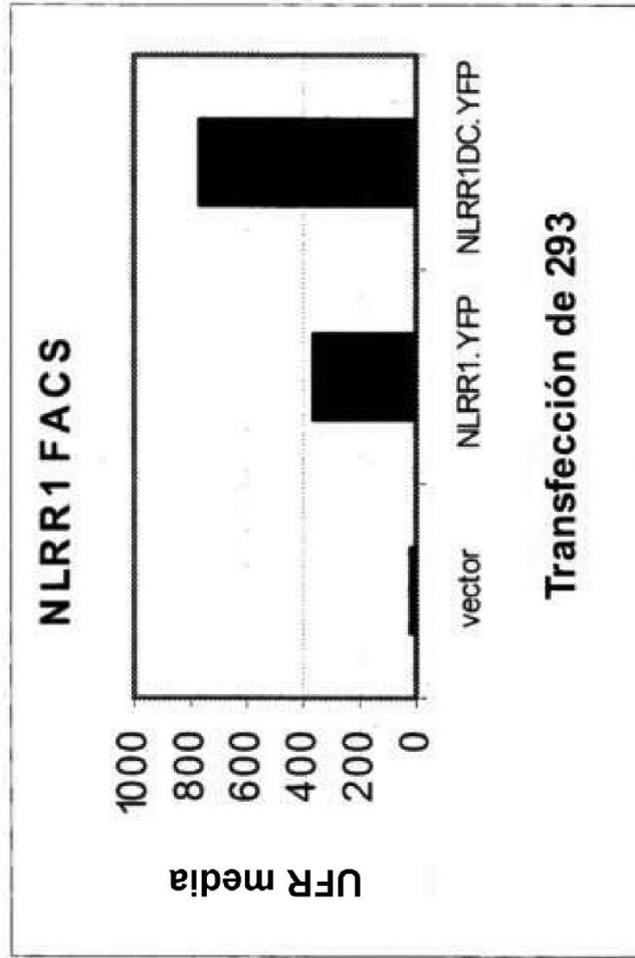


Figura 5A

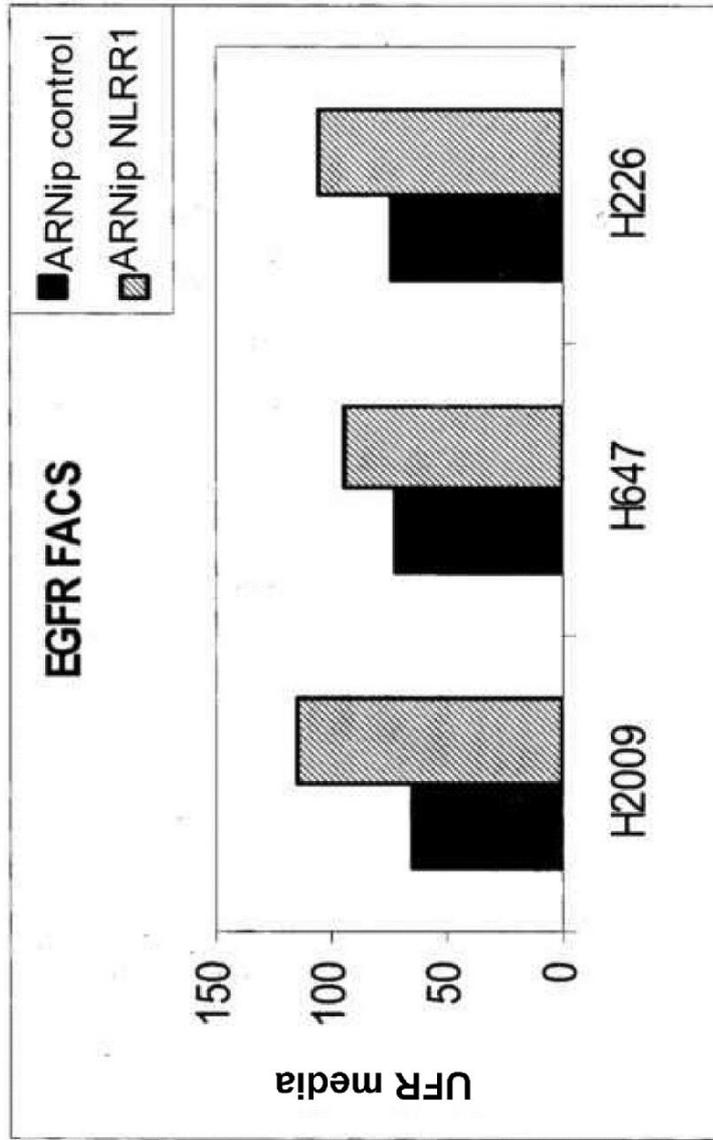


Figura 5B

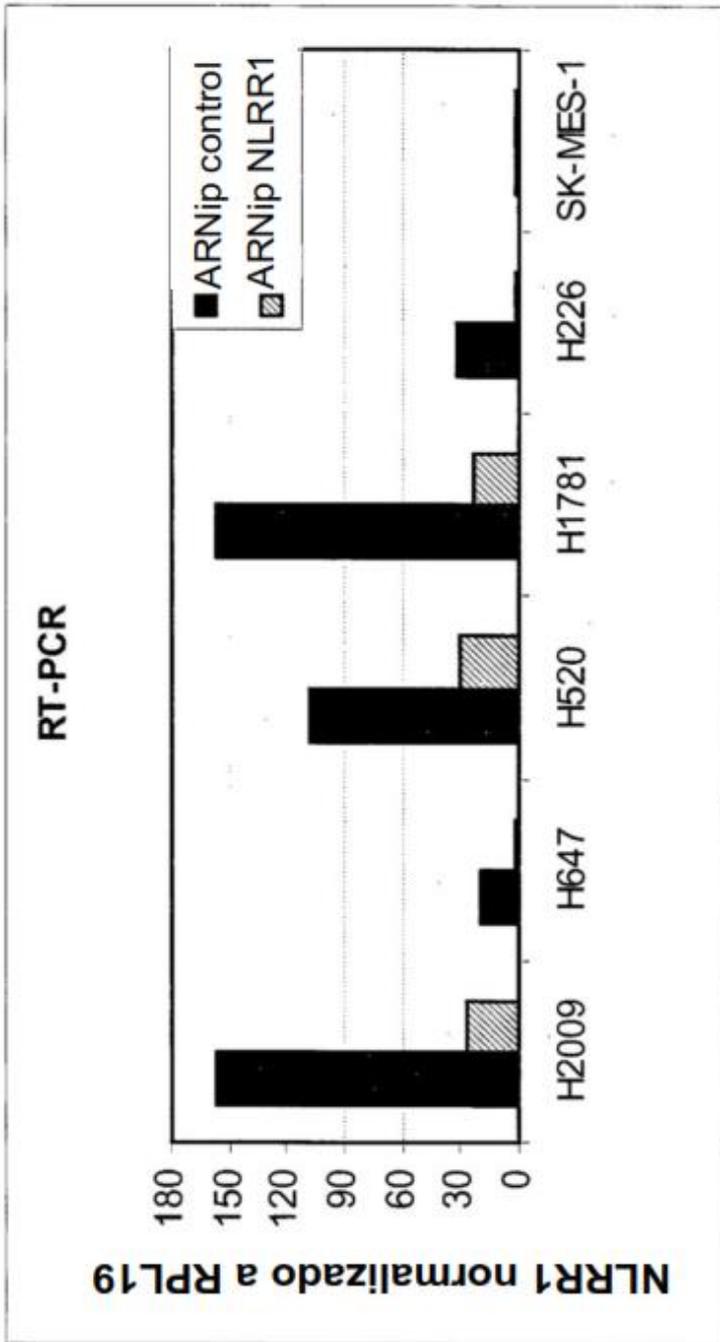


Figura 6A

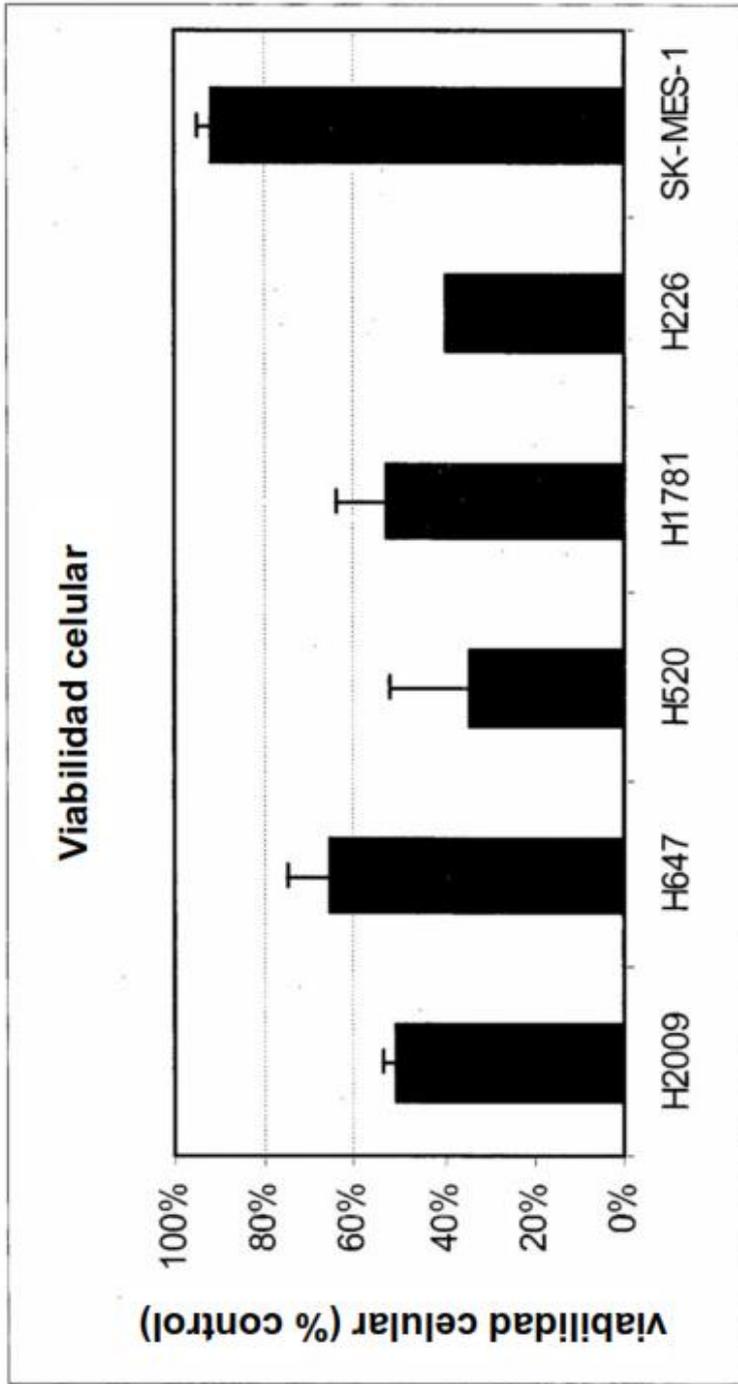


Figura 6B

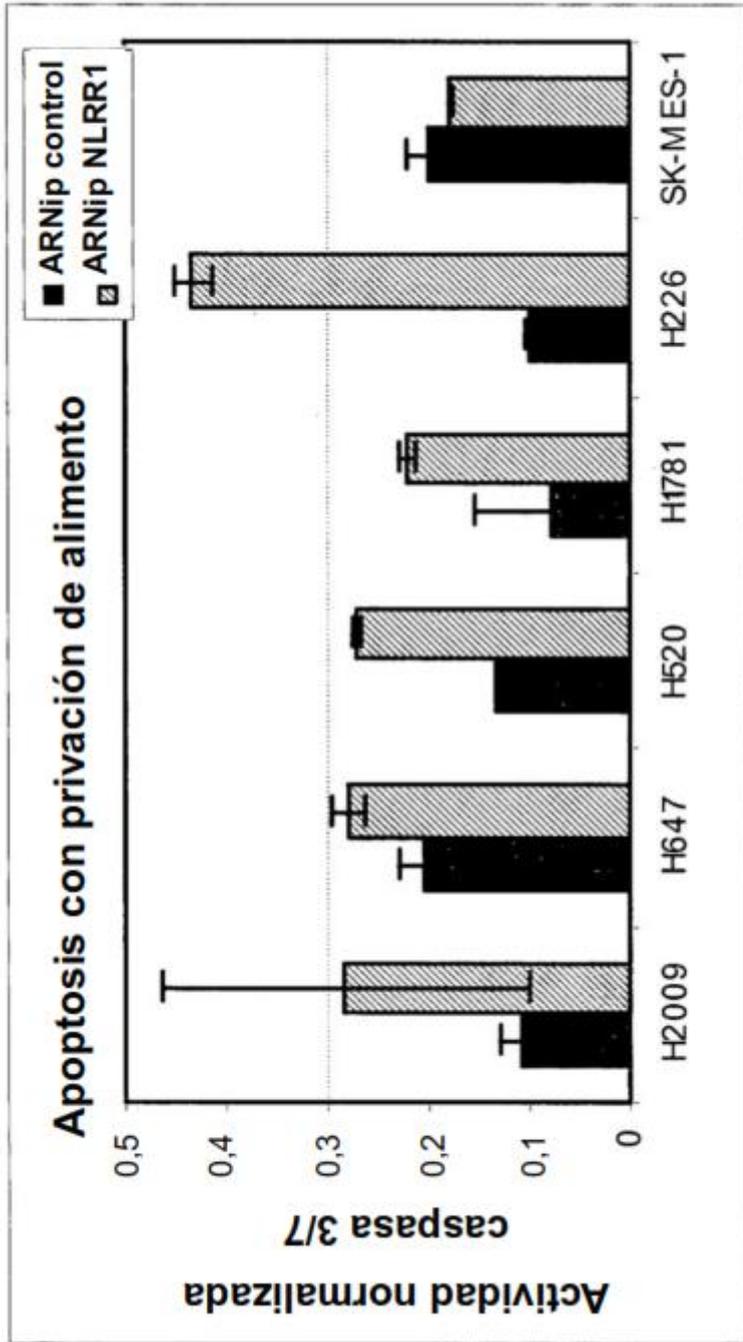


Figura 6C

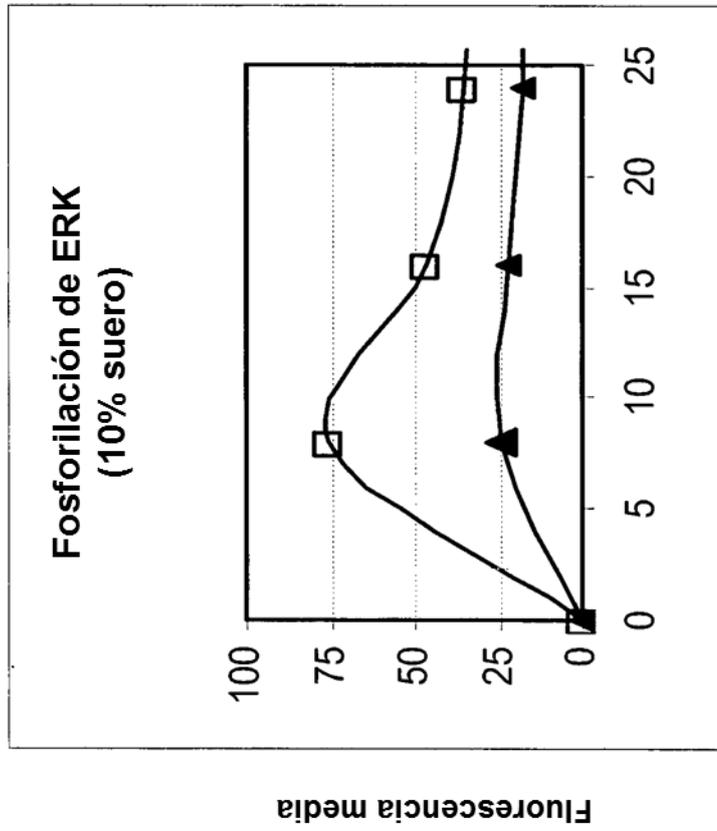
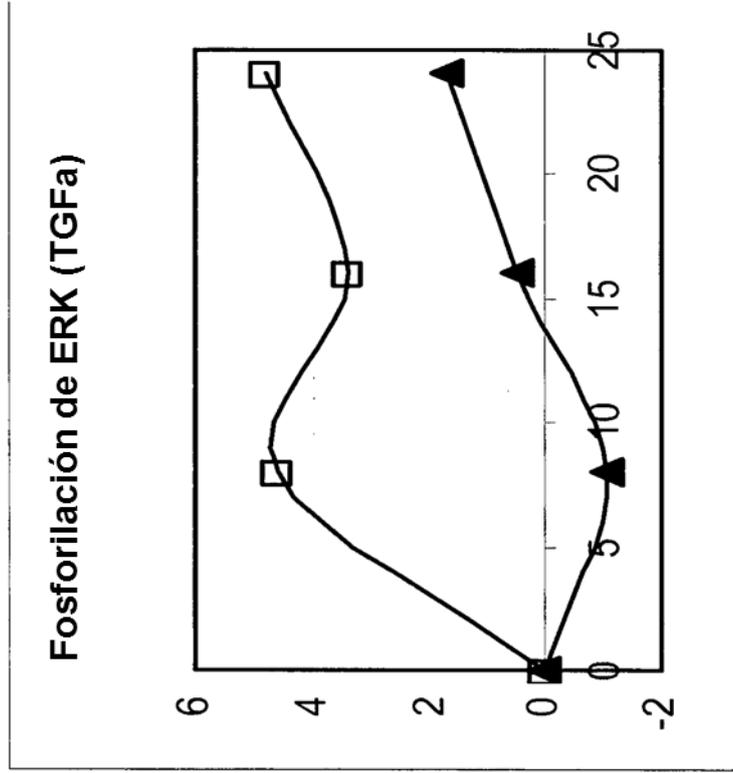
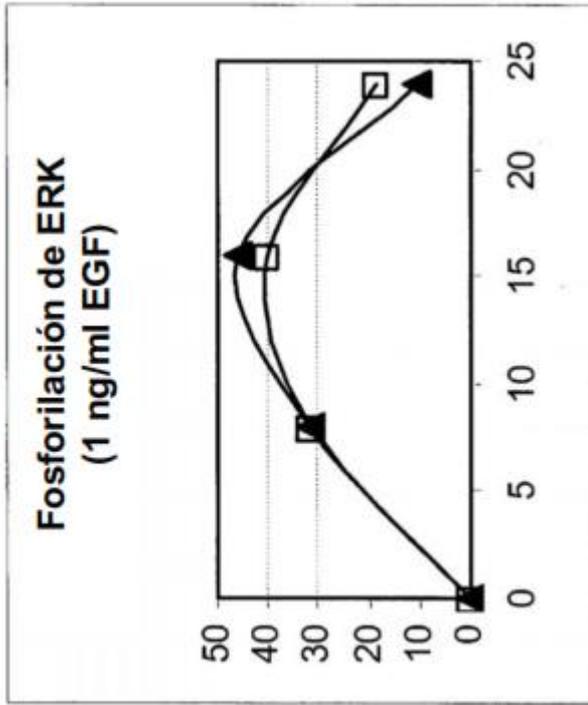


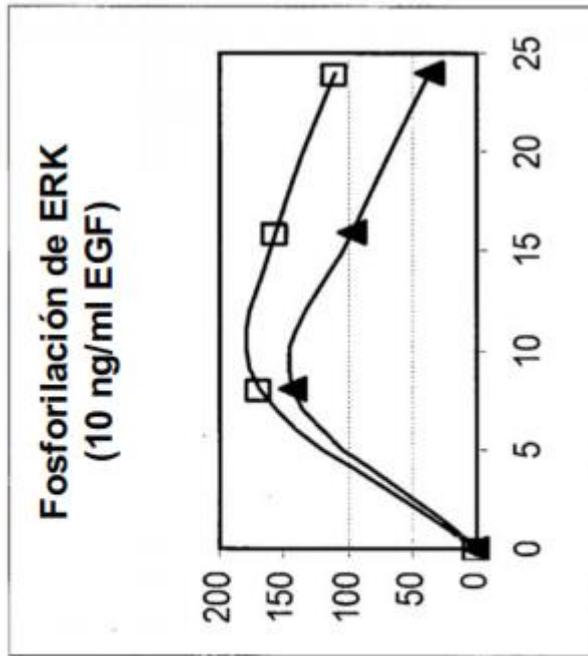
Figura 7B

Figura 7A



Tiempo (minutos)

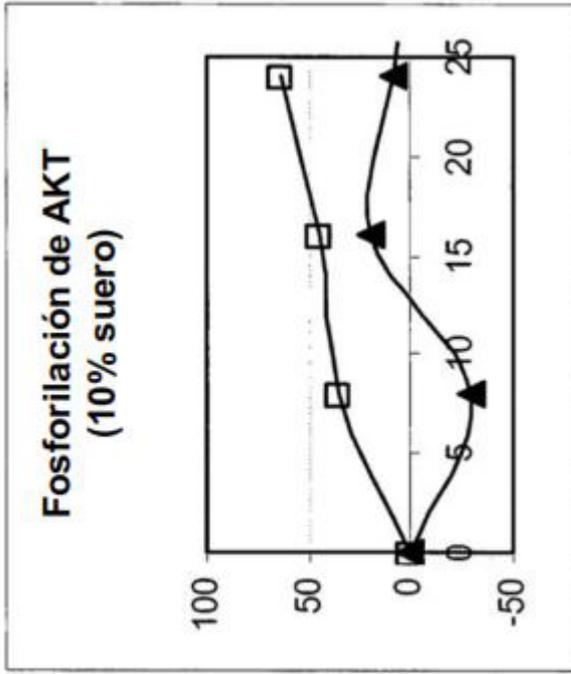
Figura 7D



Fluorescencia media

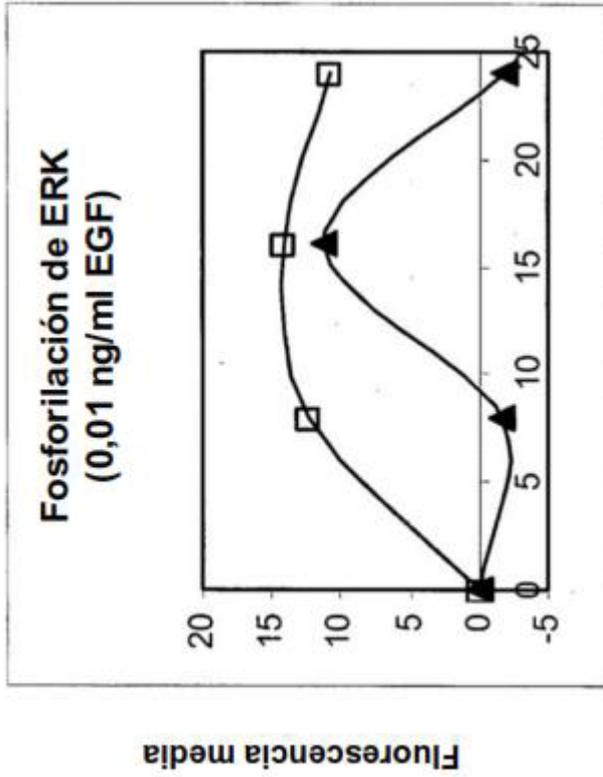
Tiempo (minutos)

Figura 7C



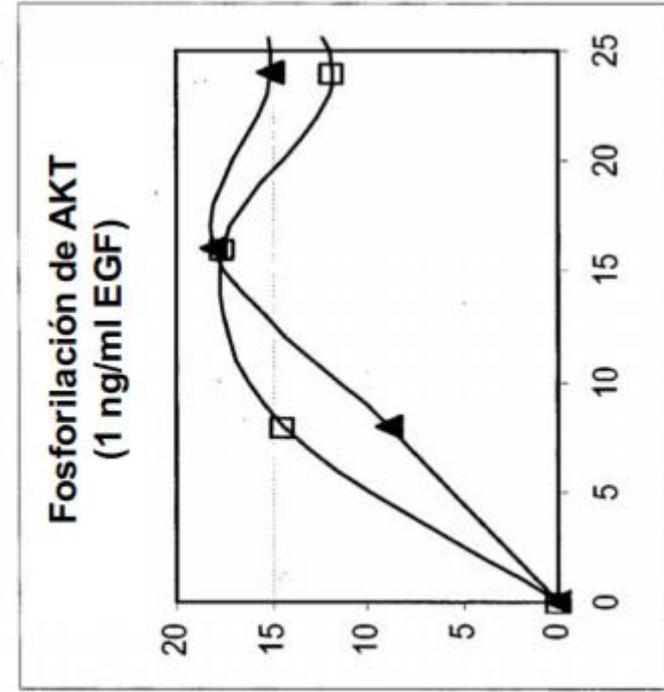
Tiempo (minutos)

Figura 7F



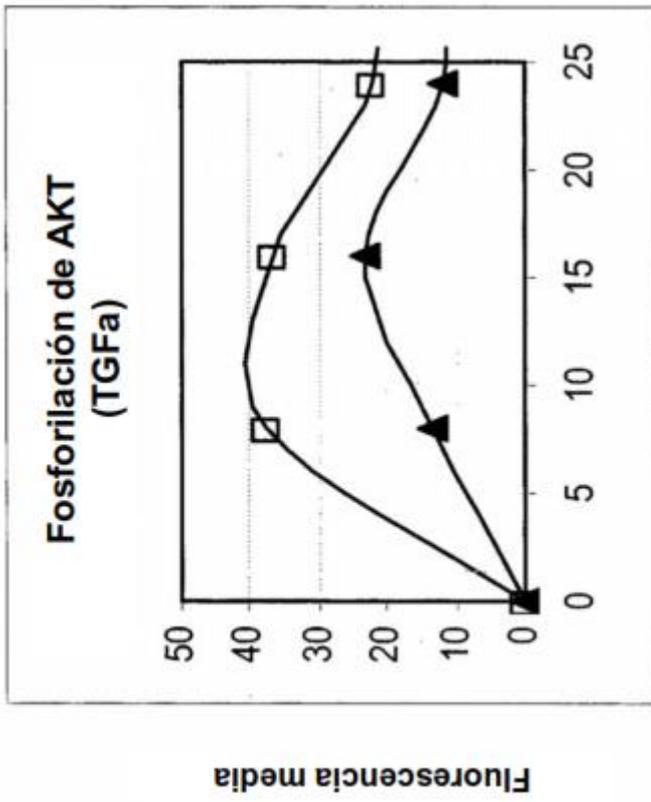
Tiempo (minutos)

Figura 7E



Tiempo (minutos)

Figura 7H



Fluorescencia media

Tiempo (minutos)

Figura 7G

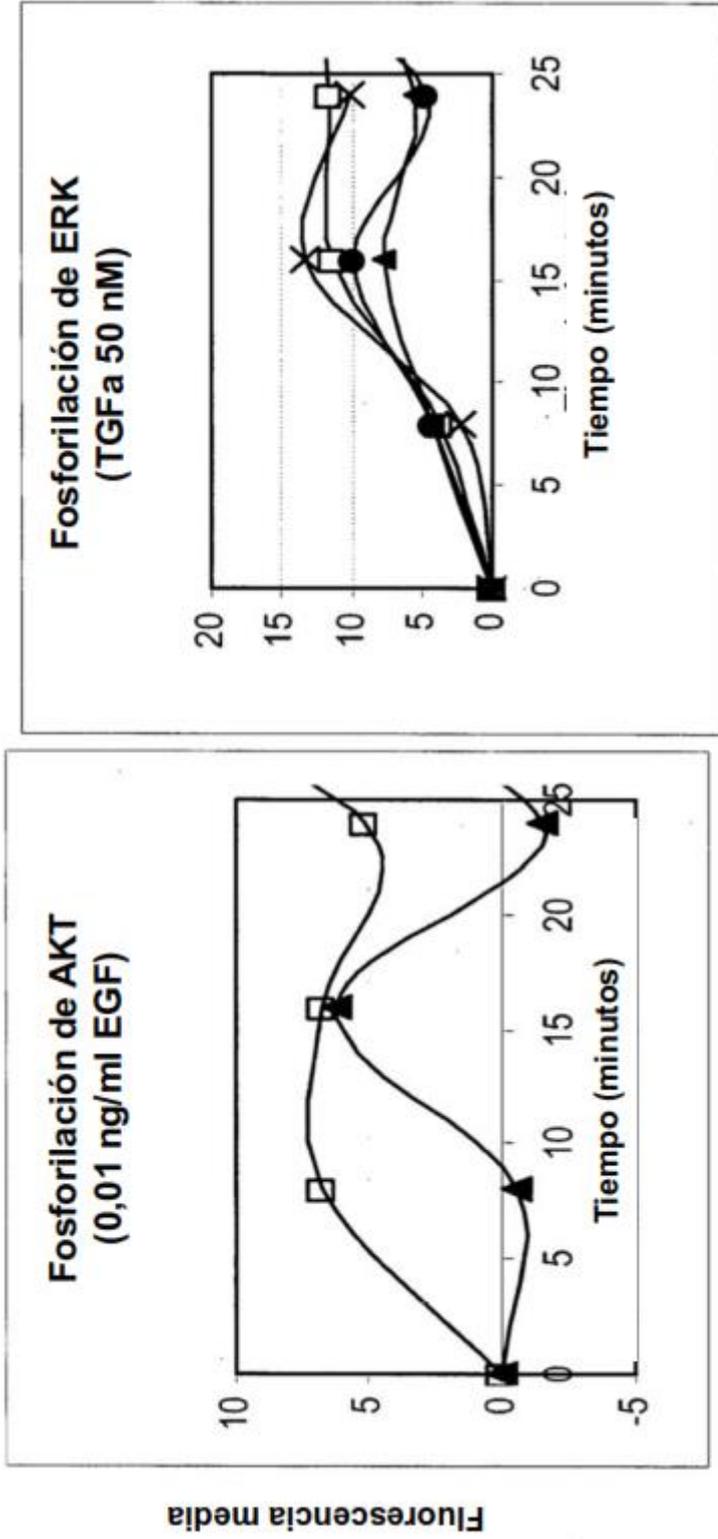


Figura 7J

Figura 7I

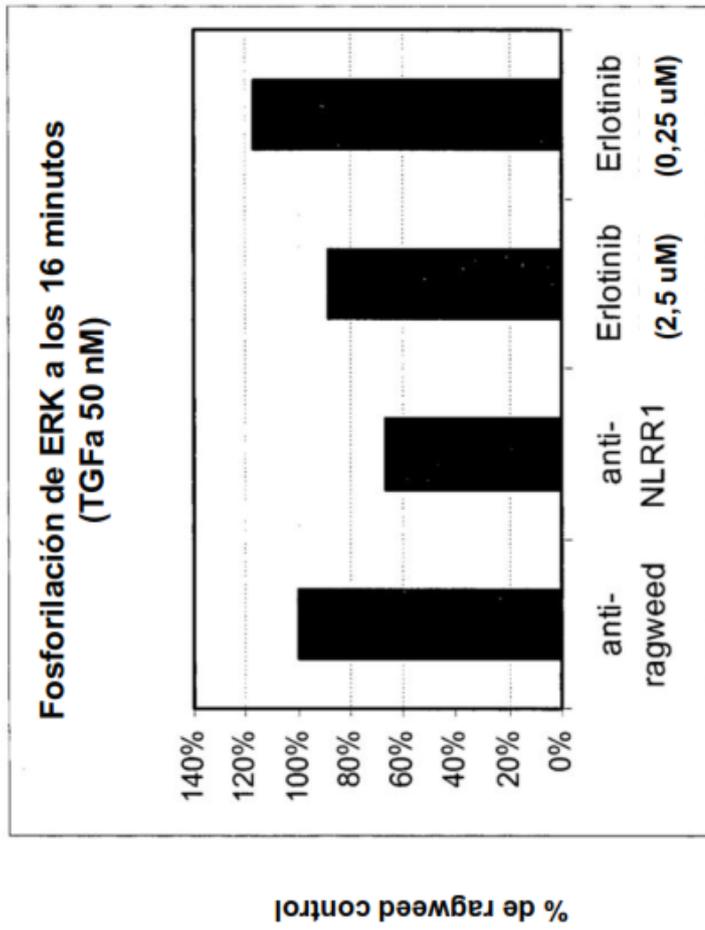
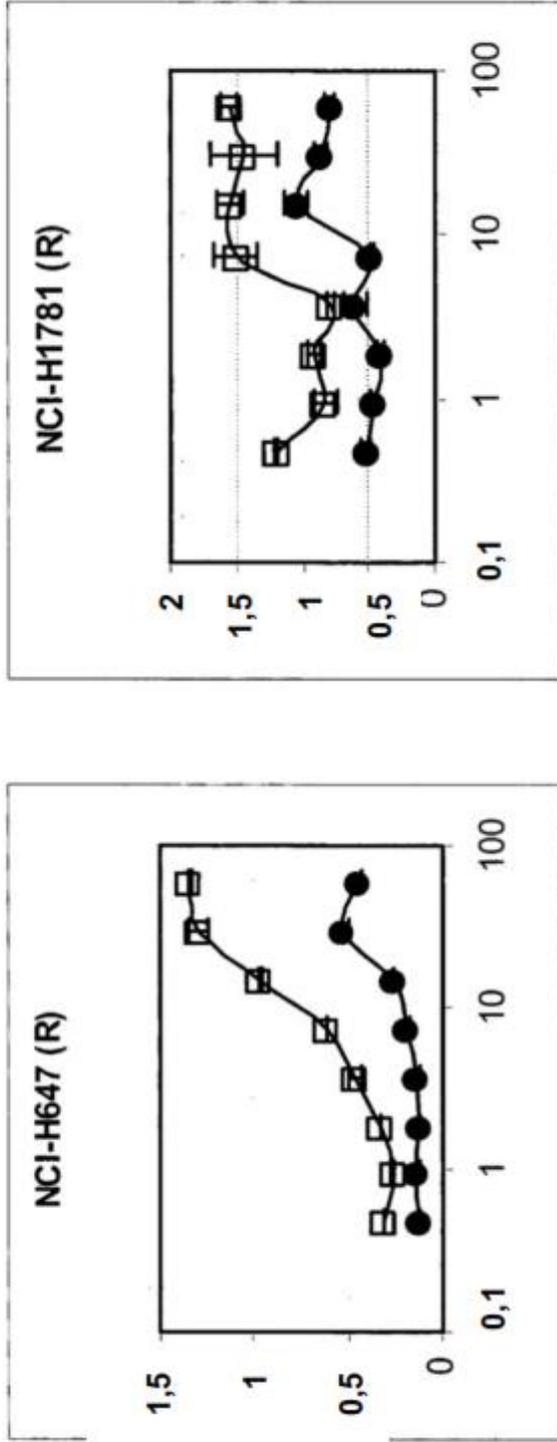


Figura 7K

Actividad caspasa 3/7 (normalizada para la viabilidad celular)



[Erlotinib] (μM)

Figura 8B

Figura 8A

Actividad caspasa 3/7 (normalizada para la viabilidad celular)

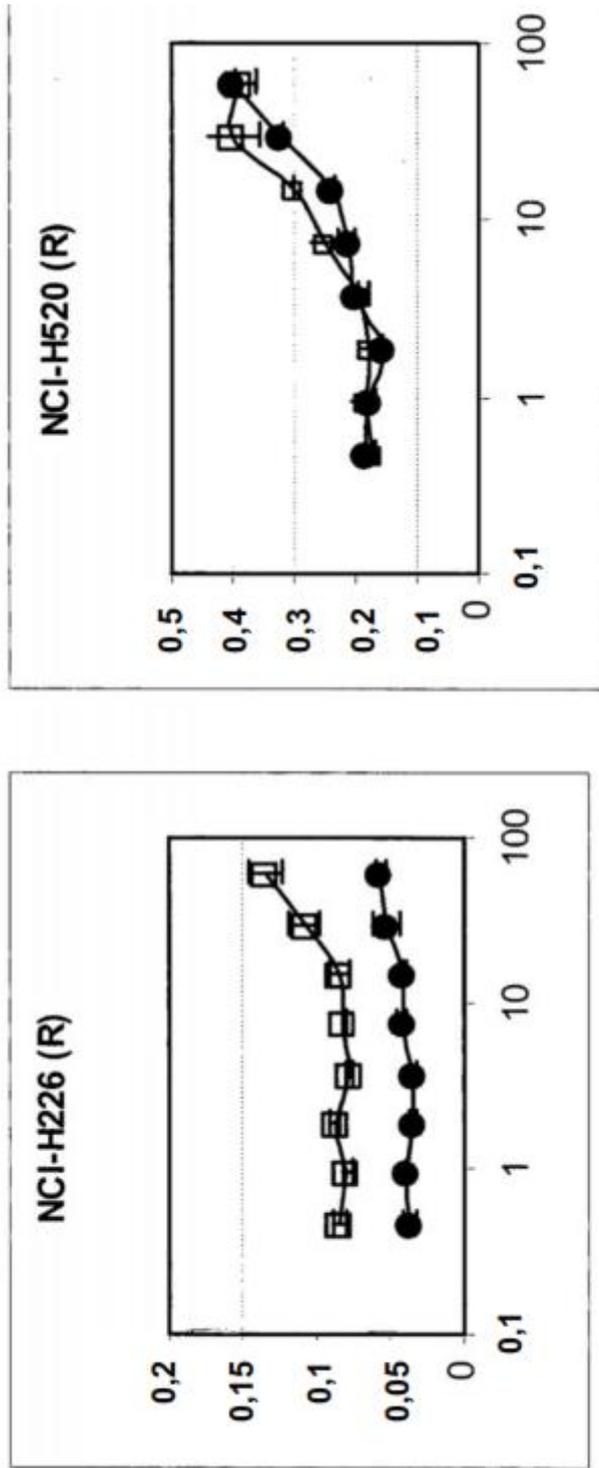


Figura 8D

Figura 8C

Actividad caspasa 3/7 (normalizada para la viabilidad celular)

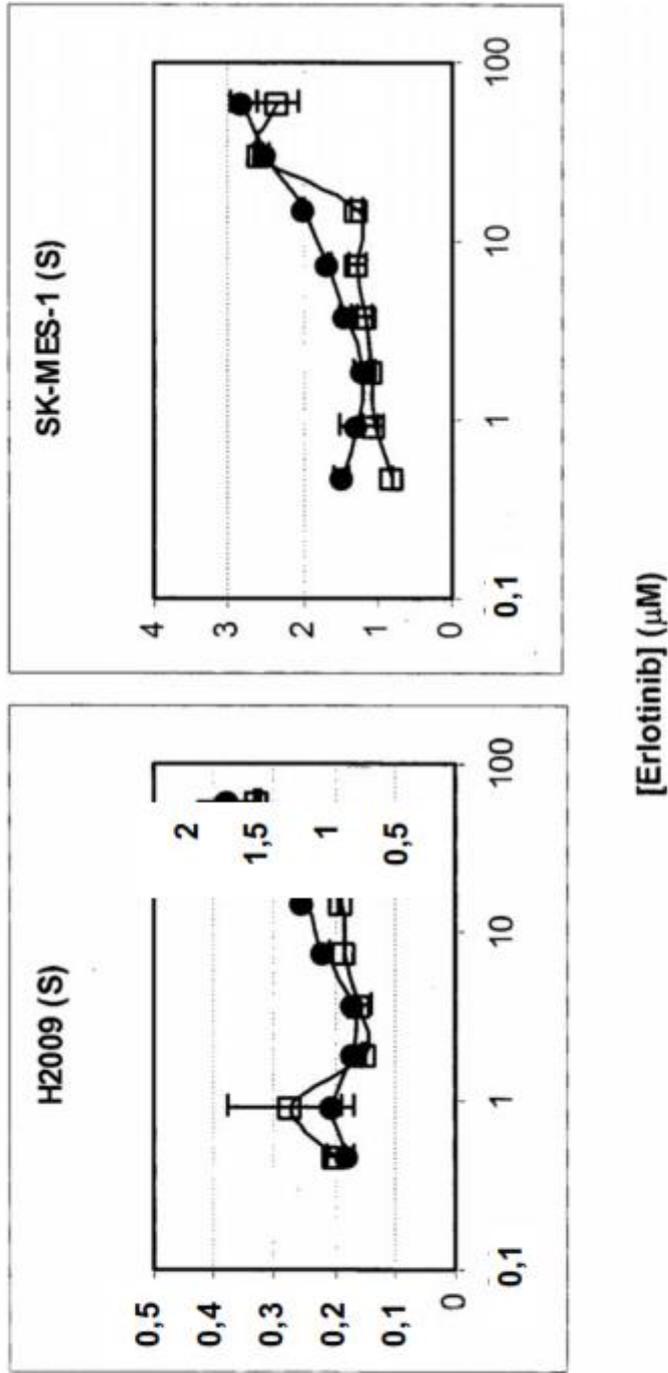


Figura 8E

Figura 8F

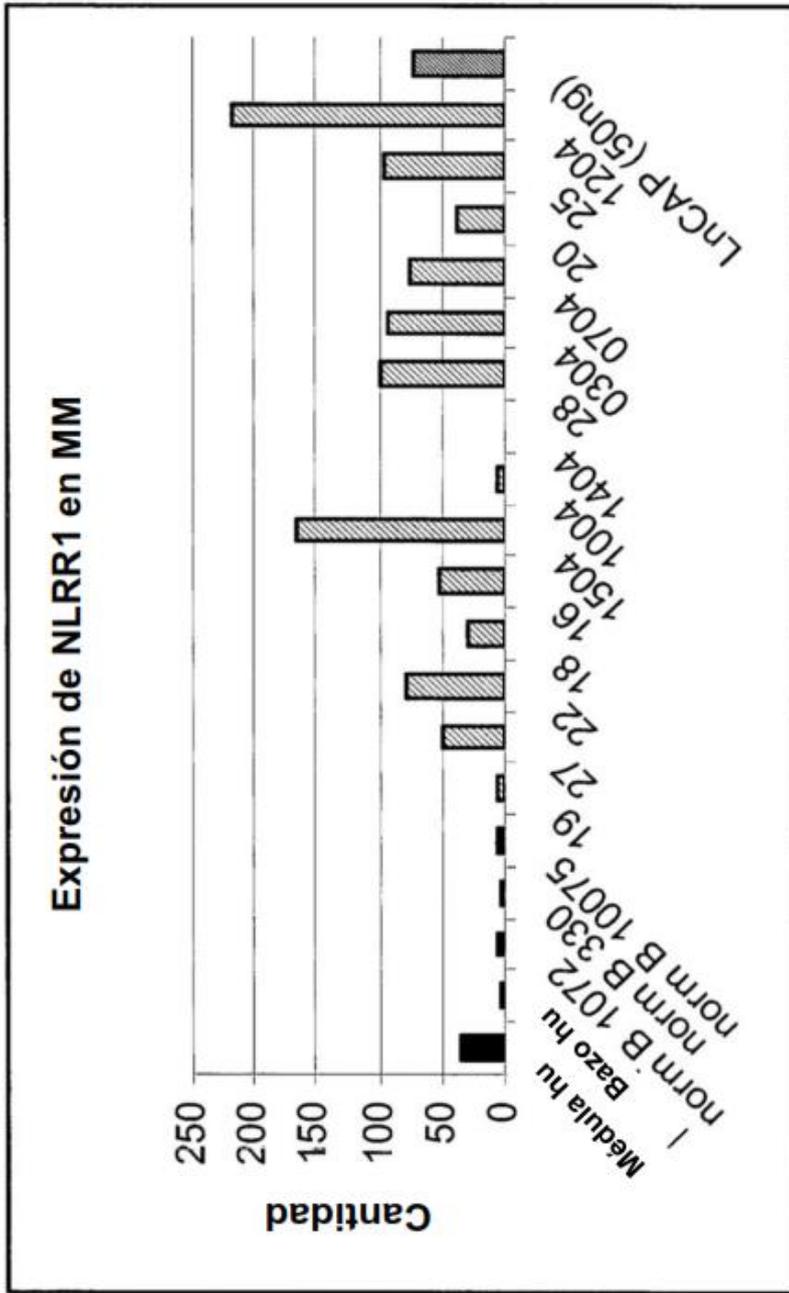


Figura 9A

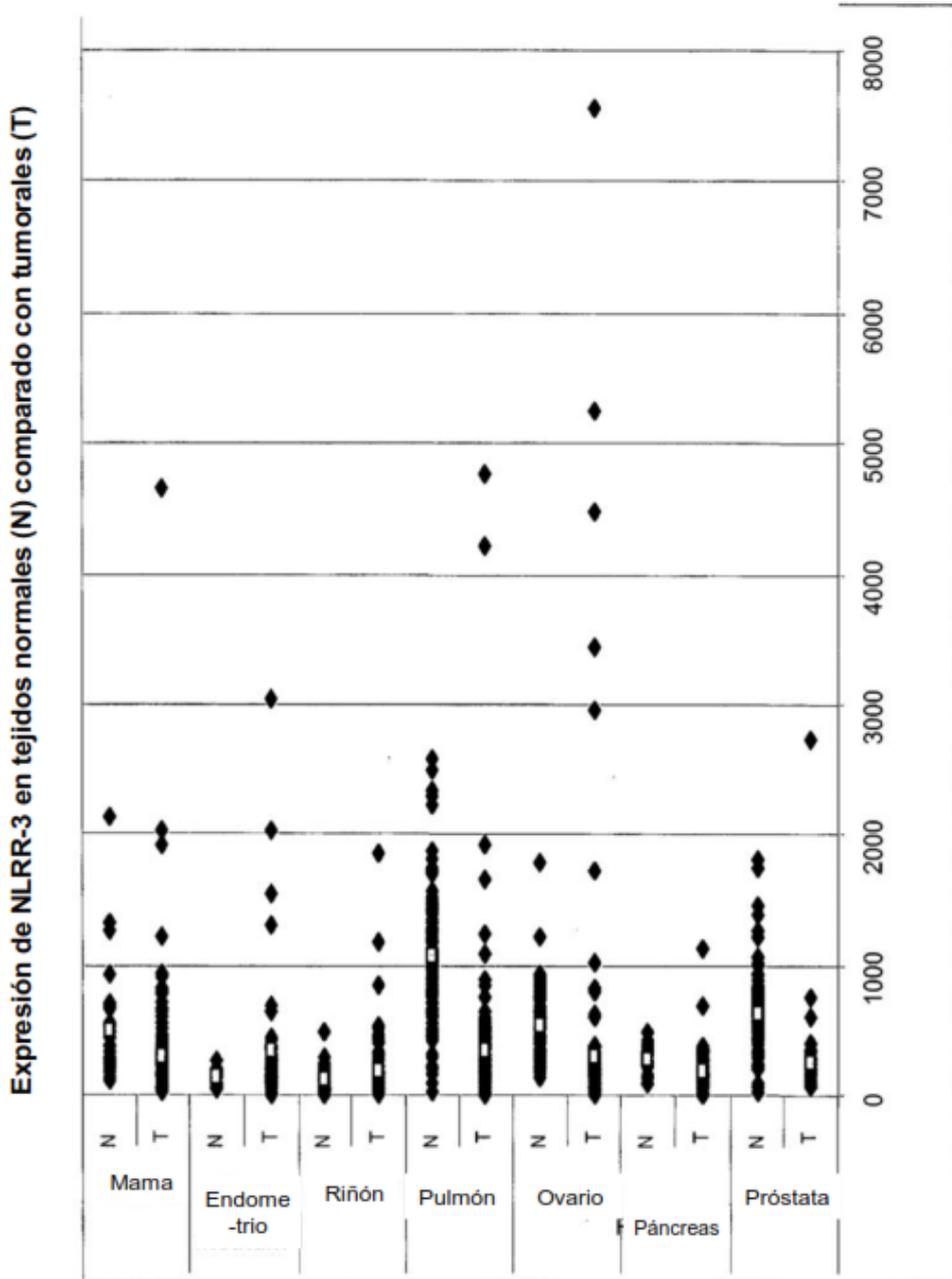


Figura 9B

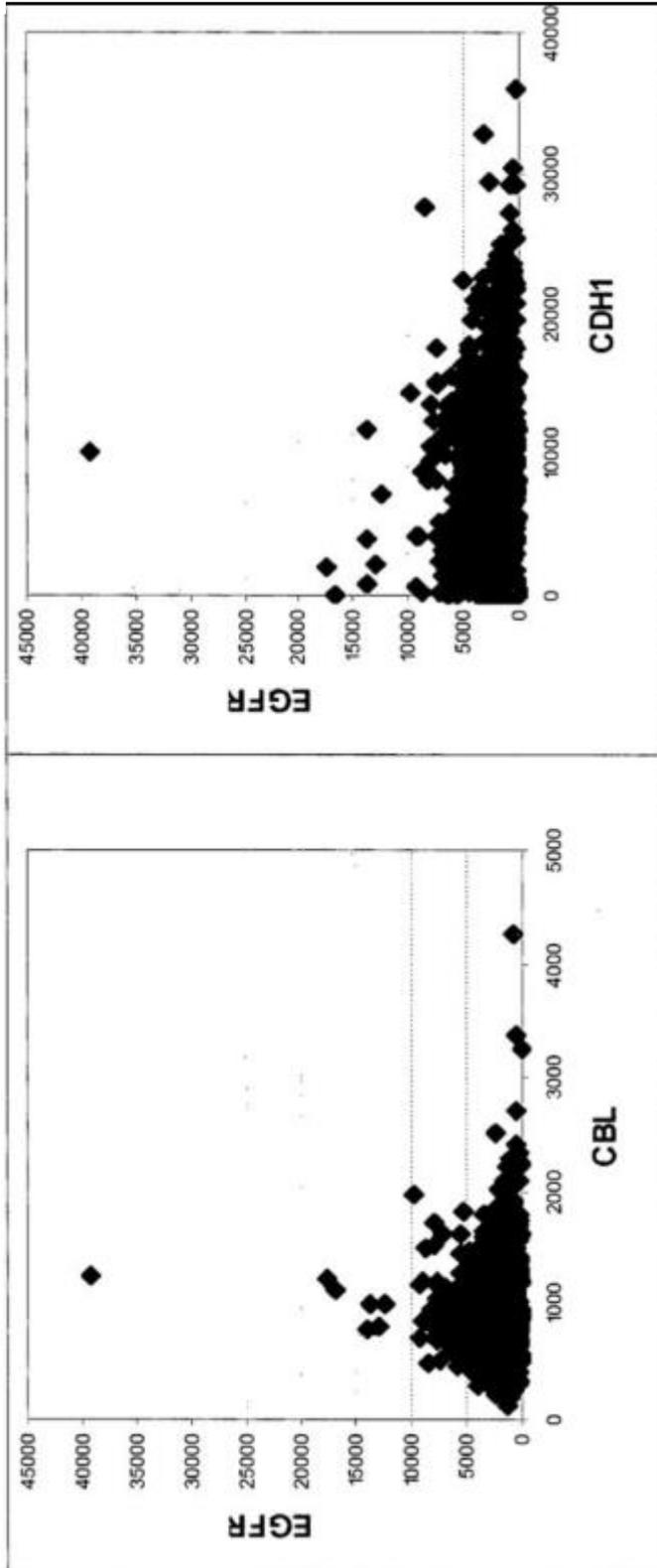


Figura 10A

Figura 10B

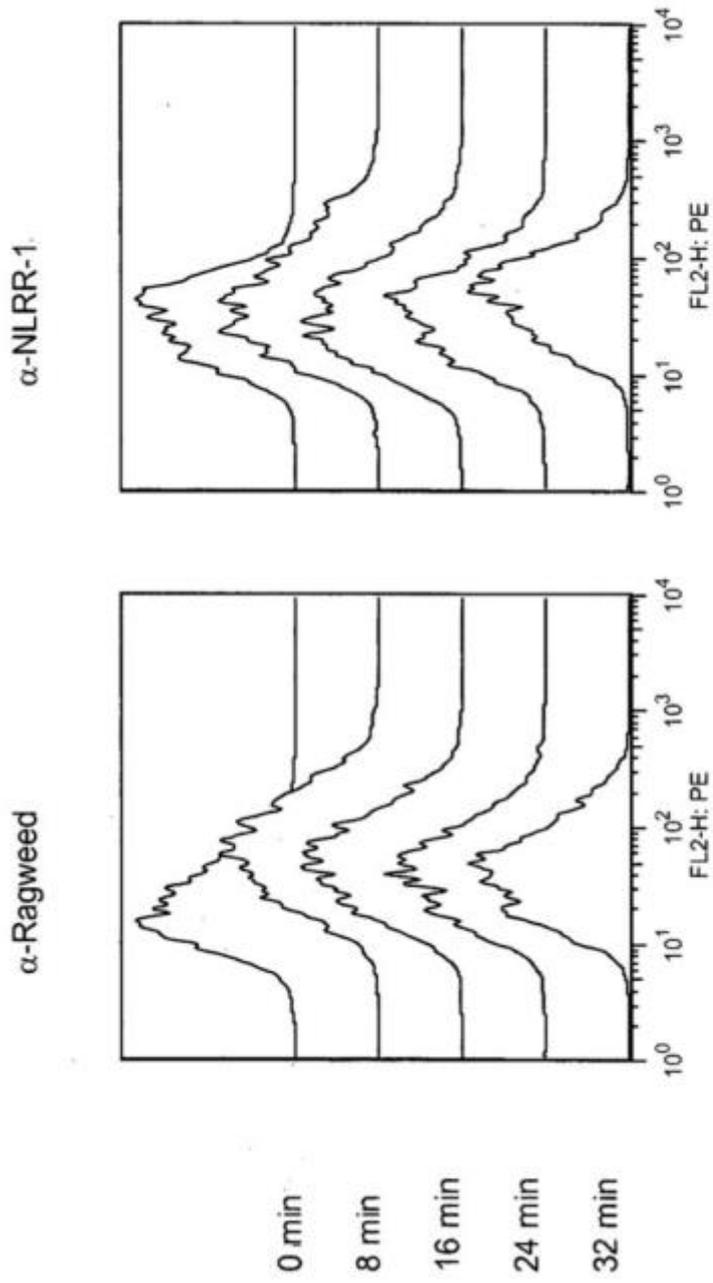


Figura 11A

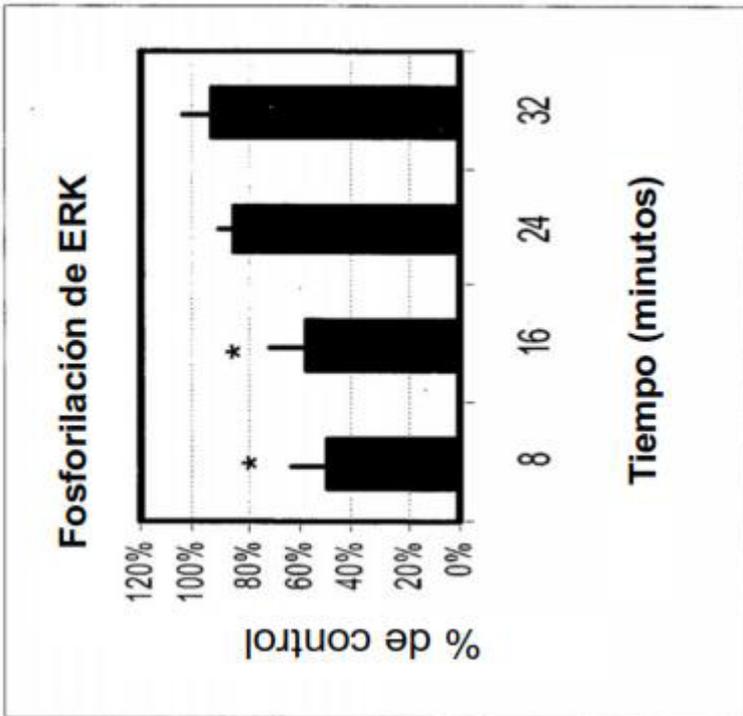


Figura 11B

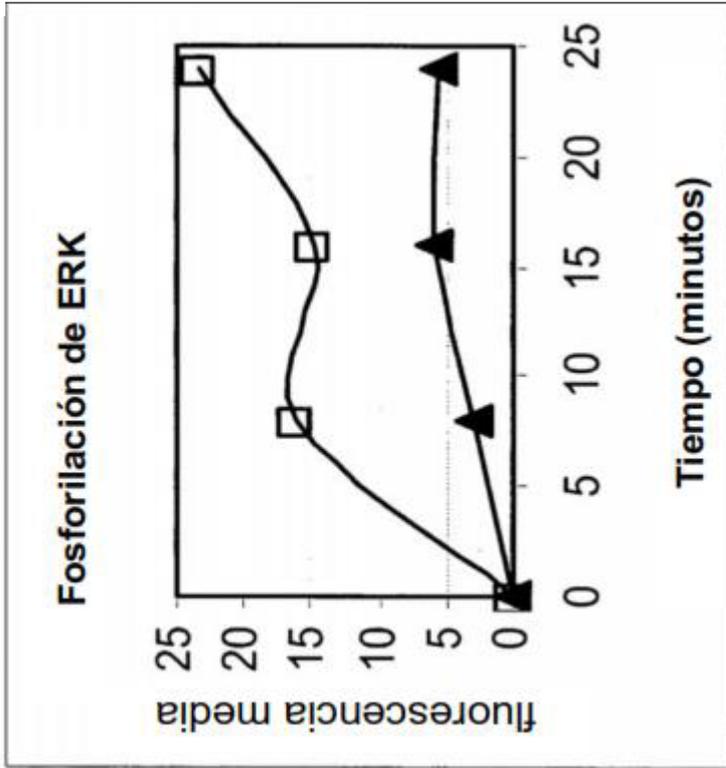


Figura 11C

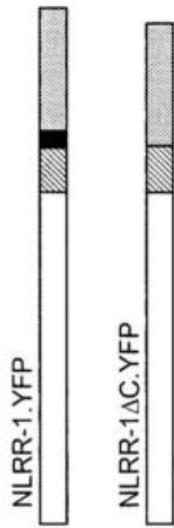


Figura 12A

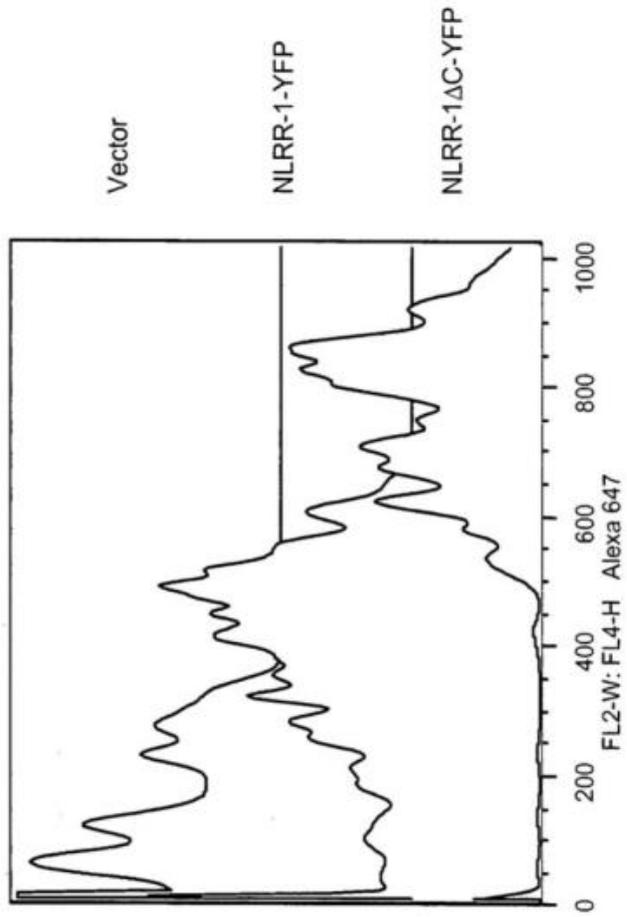


Figura 12B

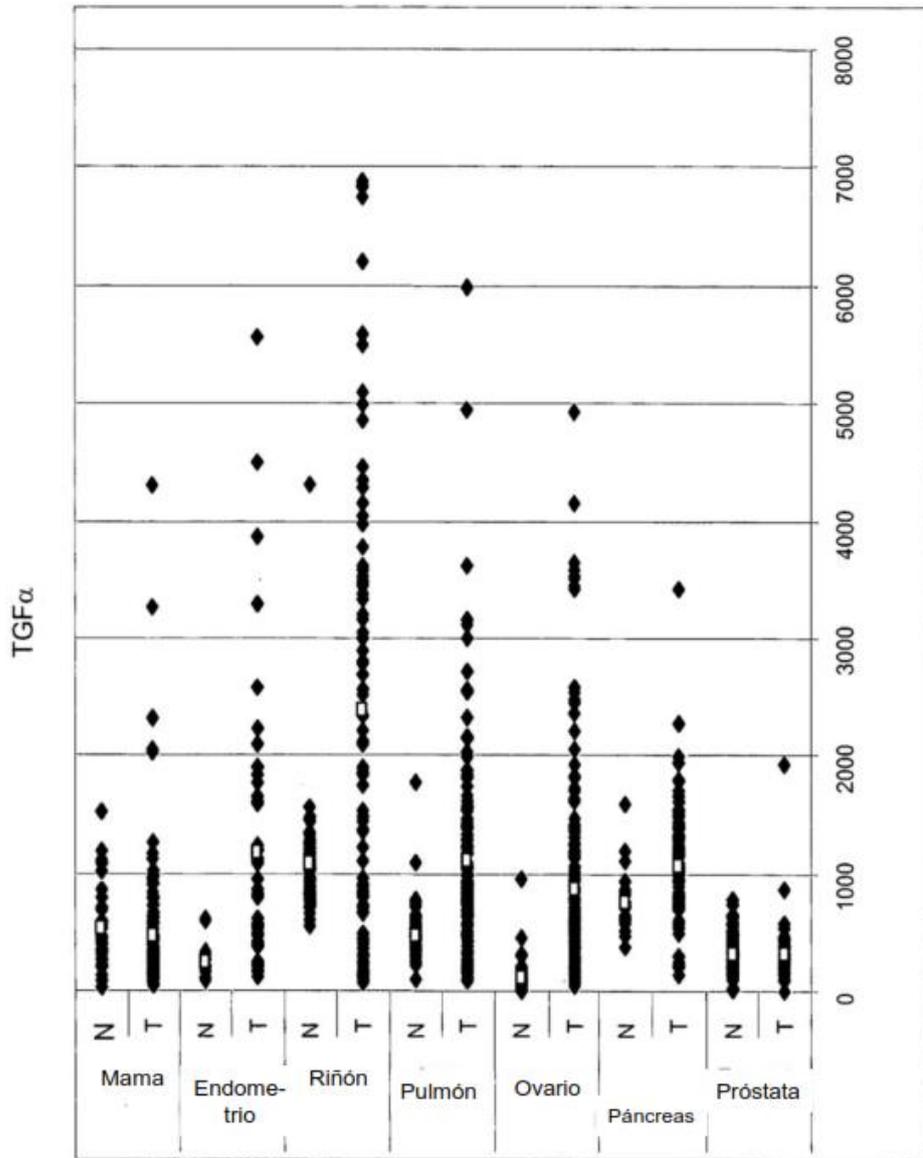


Figura 13A

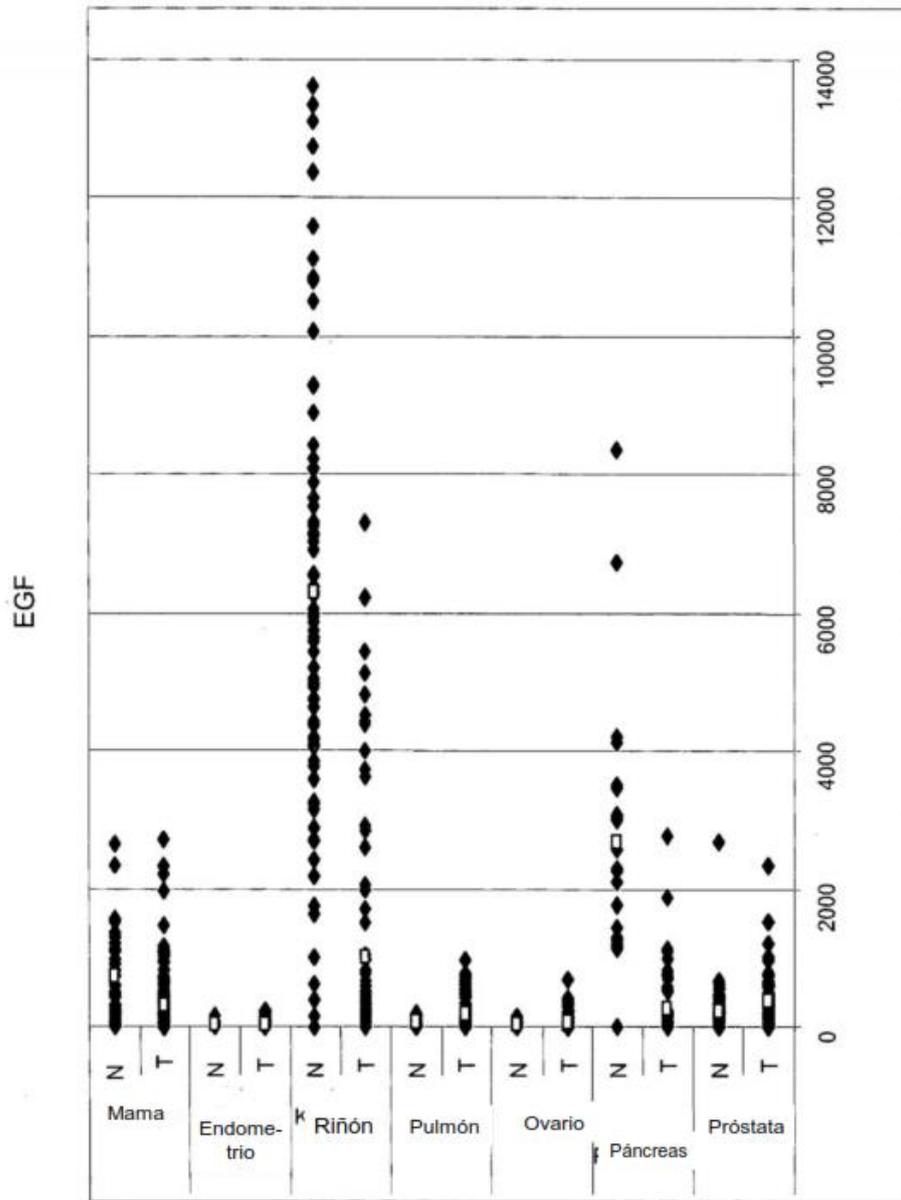


Figura 13B

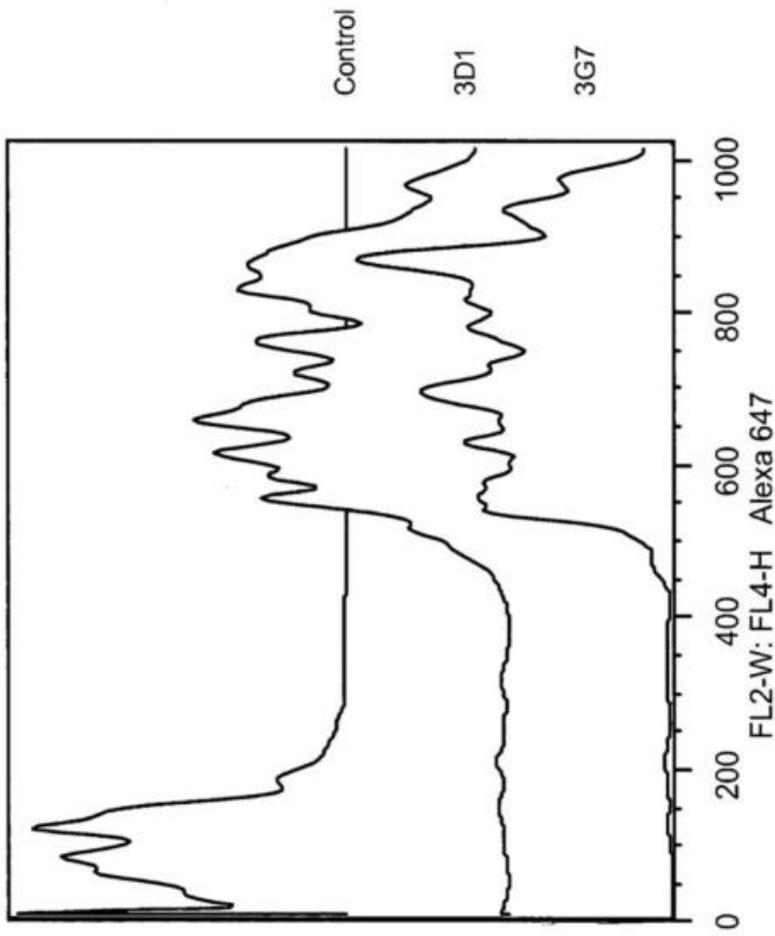


Figura 14

MARMSFVIAACQLVLGLLMTSLTESSIONSECPQLCVCEIRPWFTPQSTYREATTVDCNDLRL
 TRIPSNLSSDTQVLLQLSNNAIAKTVDELQQLFNLTELDIFSQNNFTNIKEVGLANLTQLTTLHL
 EENQITEMTDYCLQDLSNLQELYNHNQISTISAHAFAGLKNLLRLHLNSNKLKVIDSRWFDS
 TPNLEILMIGENPVIGILDMNFKPLANRSLVLAGMYLTDIPGNALVGLDSLESLSFYDNKLVK
 VPQLAQKVPNLKFLDLNKNPIHKIQEGDFKNMLRLKELGINNMGELVSVDRYALDNLPELT
 KLEATNPNKLSYIHRLAFRSVPALLESMLNNAIYQKTVESLPNLRREISIHSPNLRCDVCV
 IHWINSKTNIRFMEPLSMFCAMPPEYKGHQVKEVLQDSSEQCLPMISHDSFPNRLNVDIGT
 TVFLDCRAMAEPEPEIYWVTPIGNKITVETLSDKYKLSSEGTLEISNIQIEDSGRYTCVAQNV
 QGADTRVATIKVNGTLLDGTQVLKIYVKQTESHSILVSWKVNNSVMTSNLKSSATMKIDNPH
 ITYTARVPVDVHEYNLTHLQPSTDYEVCLTVSNIHQTKSCVNVTTKNAAFVAVDISDQETST
 ALAAVMGSMFAVISLAVYFAKRFKRKNYHSLKMYMQKTSSIPLNELYPPLINLWEGDSE
 KDKDGSADTKPTQVDTSRSYMW [SEQ ID NO: 1]

Figura 15