

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 519 348**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/475** (2006.01)

**C07K 14/71** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2011** **E 11706690 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014** **EP 2536748**

54 Título: **Antagonistas de neurregulina y uso de los mismos en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**18.02.2010 US 305878 P**

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

**06.11.2014**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (50.0%)**

**1 DNA Way**

**South San Francisco, CA 94080-4490 , US y**

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND**

**STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**JACKSON, ERICA y**

**SWEET-CORDERO, ERIC, ALEJANDRO**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 519 348 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 neurregulina y uso de los mismos en el tratamiento del cáncer

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento del cáncer con antagonistas de neurregulina.

### Antecedentes

La identidad y las propiedades de las células madre cancerosas (CSC) han sido un campo de estudio intenso en los recientes años. Se están acumulando evidencias de que los tumores son una mezcla heterogénea de células con diferentes propiedades biológicas. El aislamiento de distintas poblaciones celulares con la capacidad única de iniciar el crecimiento tumoral se ha presentado para numerosas neoplasias hematológicas y tumores sólidos. Sin embargo, han surgido inconsistencias en el uso de marcadores específicos de superficie celular para identificar de forma prospectiva las CSC. Por ejemplo, se ha informado de hallazgos dispares en el fenotipo de células madre para leucemias, cánceres pancreático, colorrectal, cerebral y de mama (Revisado en Brennan y Matsui 2009). Además, las estimaciones de frecuencia de CSC varían drásticamente entre tipos de pacientes y tumores. El papel de las CSC en el mantenimiento del crecimiento de un tumor establecido o en el reinicio de un tumor después de quimioterapia en un sitio primario o distante, sigue teniendo que determinarse.

Para la mayoría de los pacientes con cáncer, la recaída de la enfermedad después de quimioterapia es una causa principal de mortalidad. Por consiguiente, se necesita una mejor comprensión de las células que reinician el tumor (TRIC) responsables de la recaída para tratar mejor a los pacientes que han experimentado recidiva del cáncer después de responder inicialmente a tratamiento quimioterapéutico. Esto es particularmente relevante para cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) porque más de dos tercios de los pacientes con NSCLC no son candidatos para resección quirúrgica. La mayoría de los pacientes presentan enfermedad avanzada y se tratan con quimioterapia, radiación o una combinación de las dos (principio y práctica en cáncer de pulmón). Sin embargo, la tasa de supervivencia de 5 años para enfermedad localmente avanzada sigue en el 23,7 % y en el 3,5 % para enfermedad avanzada a pesar de buenas respuestas iniciales a la terapia (Homer et al. SEER).

Las disregulación de la señalización EGFR mediante sobre-expresión o mutaciones activadoras ha demostrado ser un evento frecuente en NSCLC (revisado en Dahabreh et al., 2010). EGFR es el miembro prototipo de la familia HER de tirosina quinasas, que incluye EGFR (Her1), Her2, Her3 y Her4. Her2 carece de un dominio de unión a ligando funcional (Graus-Porta 1997) y Her3 carece de actividad tirosina quinasa (Guy 1994), de modo que estos receptores deben actuar como heterodímeros. Recientes evidencias muestran que otros miembros de la familia Her también pueden desempeñar un papel en NSCLC. Sin embargo, sus contribuciones a la enfermedad están peor caracterizadas y los estudios a menudo se han centrado en sus interacciones con la activación de EGFR (Kuyama et al. 2008, Hirsch 2009, Zhou 2006, Johnson 2006, Ding 2008).

La neurregulina es un ligando para los receptores tirosina quinasa Her3 y Her4. Existen cuatro miembros conocidos de la familia de neurregulina, NRG1, NRG2, NRG3, y NRG4 (Falls 2003). El transcrito NRG1 experimenta corte y ajuste alternativo extensivo que produce al menos 15 isoformas diferentes. Todas las isoformas activas comparten un dominio tipo EGF que es necesario y suficiente para la actividad (Holmes 1992, Yarden 1991). La señalización autocrina de NRG1 ha demostrado regular la proliferación de células epiteliales de pulmón (Jinbo 2002) y desempeñar un papel en el desarrollo de los pulmones humanos (Patel 2000) y se ha implicado en la insensibilidad de NSCLC a inhibidores de EGFR (Zhou 2006).

Existe la necesidad de proporcionar agentes terapéuticos eficaces en el tratamiento de cánceres resistentes y pacientes que han experimentado una recidiva del cáncer.

Tsai Miaw-Sheue et al., ONCOGENE, 2003, vol, 22, nº 5, páginas 761-768, describen el uso de agonistas de NRG1 para el tratamiento de cáncer de mama. Menendez et al., J. CLIN. ONCOL, ASCO, vol. 24, nº 23, 2006, páginas 3735-3746, describen la inhibición del crecimiento de células tumorales de una línea celular cancerosa de crecimiento primario usando cisplatino y paclitaxel y el efecto de NRG1 antisentido.

### Sumario

La presente invención proporciona un antagonista de neurregulina 1 (NRG1) y un agente quimioterapéutico para su uso en un método para aumentar el tiempo hasta la recidiva del tumor en un paciente con cáncer, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz del antagonista de neurregulina 1 y agente quimioterapéutico al paciente, donde el agente quimioterapéutico es paclitaxel, cisplatino, o una combinación de paclitaxel y cisplatino, y donde el antagonista de neurregulina 1 es un anticuerpo anti-NRG1, un ARN, o una molécula receptora de NRG1 que se une a NRG1.

El cáncer puede ser cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer de vejiga, cáncer esofágico, cáncer de próstata, o cáncer colorrectal.

La molécula receptora puede ser una inmunoadhesina.

El ARN puede ser ARN antisentido, ARNi, ARNip, ARNhp o un aptámero de ARN

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Representación esquemática de un modelo in vivo para estudiar células reiniciadoras de tumor (TRIC).

Figura 2A. Modelo de xenoinjerto de NSCLC humano Calu3 en ratones desnudos atímicos donde la quimioterapia consistía en paclitaxel y cisplatino. Datos presentados como volumen medio del tumor  $\pm$  ETM, n=12 ratones/grupo.

Figura 2B. Modelo de xenoinjerto de NSCLC humano H441 en ratones desnudos atímicos donde la quimioterapia consistía en paclitaxel y cisplatino. Datos presentados como volumen medio del tumor  $\pm$  ETM, n=12 ratones/grupo.

Figura 2C. Modelo de mama humana KPL4 con trasplante ortotópico de células tumorales a la almohadilla de grasa mamaria de ratones SCID/beiz donde la quimioterapia consistía en paclitaxel. Datos presentados como volumen medio del tumor  $\pm$  ETM, n=12 ratones/grupo.

Figura 2D. Tratamiento de modelo de NSCLC en ratones modificados por ingeniería genética K-ras<sup>LSLG12D</sup>, CAG-LSL-GFP con cisplatino. Datos presentados como la cantidad promedio de células GFP positivas por pulmón  $\pm$  ETM, n=6 ratones/grupo.

Figura 3A. Se demostró el enriquecimiento de ARNm de NRG1 en TRIC en el modelo de xenoinjerto Calu3 por dos sondas independientes en un análisis de microserie. El enriquecimiento se validó por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) para NRG1a y NRG1b usando ARN aislado de muestras de tumor independientes.

Figura 3B. Enriquecimiento de ARNm de NRG1 en TRIC en el modelo de xenoinjerto H441 mostrado por dos diferentes sondas de microserie. Esto se validó por qPCR para NRG1a y NRG1b usando ARN de las mismas muestras tumorales usadas para el análisis de microserie.

Figura 3C. Enriquecimiento de ARNm de NRG1 en TRIC en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama KPL4 mostrado por dos diferentes sondas de microserie.

Figura 3D. Enriquecimiento de ARNm de NRG1 en TRIC en el modelo de NSCLC de ratón K-ras<sup>LSLG12D</sup> mostrado por una sonda de microserie y validado por qPCR.

Figura 4. El enriquecimiento de NRG1 es específico para células residuales como se evidencia por análisis qPCR de los niveles de ARNm de NRG1 de células tumorales en tumores de diversos tamaños y momentos después de quimioterapia.

Figura 5A. Gráfico que muestra las curvas de crecimiento tumoral para ratones con tumores de xenoinjerto Calu3-shNRG1 establecidos a los que se ha administrado vehículo (sacarosa) o dox (2 gm/l) en su agua para beber ad libitum. El volumen del tumor se midió dos veces a la semana mientras duró el estudio. Datos presentados como ajuste generado por el modelo de efectos mixtos lineales (LME) del volumen del tumor en el gráfico como splines cúbicos con nudos auto-determinados.

Figura 5B. Gráfico que muestra las curvas de crecimiento tumoral para ratones con tumores de xenoinjerto Calu3-shNRG1 establecidos tratados con quimio+sacarosa o quimio+dox. Datos presentados como ajuste generado por el modelo LME del volumen del tumor en el gráfico como splines cúbicos con nudos auto-determinados.

Figura 6A. Gráfico que muestra las curvas de crecimiento tumoral para ratones con tumores de xenoinjerto H441-shNRG1 establecidos tratados con sacarosa o dox (n=12 /grupo). Datos presentados como análisis de ajuste LME del volumen del tumor en el gráfico como splines cúbicos con nudos auto-determinados.

Figura 6B. Gráfico que muestra las curvas de crecimiento tumoral para ratones con tumores de xenoinjerto H441-shNRG1 establecidos tratados con quimio + sacarosa o quimio + dox (n=12/grupo). Datos presentados como análisis de ajuste LME del volumen del tumor en el gráfico como splines cúbicos con nudos auto-determinados.

Figura 7A. Gráfico que muestra las curvas de crecimiento tumoral para ratones con tumores de xenoinjerto H1299-shNRG1 establecidos tratados con sacarosa o dox (n=12 ratones/grupo). Datos presentados como

análisis de ajuste LME del volumen del tumor en el gráfico como splines cúbicos con nudos auto-determinados.

Figura 7B. Gráfico que muestra las curvas de crecimiento tumoral para ratones con tumores de xenoinjerto H1299-shNRG1 establecidos tratados con quimio+sacarosa o quimio+dox (n=12/grupo). Datos presentados como análisis de ajuste LME del volumen del tumor en el gráfico como splines cúbicos con nudos auto-determinados.

Figura 8A. Gráfico que muestra el volumen promedio del tumor +/- ETM para ratones LSL-K-ras<sup>G12D</sup>; p53<sup>F1</sup>/+ tratados con vehículo + IgG de control (n=6), cisplatino + IgG de control (n=6), o cisplatino + HER4ECD-Fc (n=8). Ragweed, anticuerpo IgG2a murino de control.

Figura 8B. Gráfico que muestra el cambio factorial diario en la carga tumoral por régimen de tratamiento con intervalos de confianza del 95 %.

Figura 8C. Gráfico que muestra el cambio porcentual promedio en la carga tumoral desde línea basal ± ETM para ratones LSL-K-ras<sup>G12D</sup>; p53<sup>F1/F1</sup> tratados con vehículo + IgG de control (n=10), cisplatino + IgG de control (n=11), cisplatino + HER4-ECD (n=8) o vehículo + HER4-ECD (n=7).

## Descripción detallada de realizaciones de la invención

### I. DEFINICIONES

Una "región flanqueante humana aceptora" para los propósitos de este documento es una región flanqueante que comprende la secuencia de aminoácidos de una región flanqueante de dominio variable de cadena ligera (VL) o una región flanqueante de dominio variable de cadena pesada (VH) derivada de una región flanqueante de inmunoglobulina humana o una región flanqueante consenso humana, como se define a continuación. Una región flanqueante humana aceptora "deriva de" una región flanqueante de inmunoglobulina humana o una región flanqueante consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios de secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, la cantidad de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o de 2 o menos. En algunas realizaciones, la región flanqueante humana aceptora VL es idéntica a la secuencia de la secuencia flanqueante de inmunoglobulina humana VL o secuencia flanqueante consenso humana.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). Salvo que se indique de otro modo, como se usa en este documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en este documento. Realizaciones ilustrativas específicas y ejemplares para medir la afinidad de unión se describen a continuación.

Un anticuerpo de "afinidad madurada" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo precursor que no posee dichas alteraciones, provocando dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

Las expresiones "anticuerpo anti-NRG" y "un anticuerpo que se une a NRG" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a NRG con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para abordar NRG. En una realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-NRG a una proteína no NRG no relacionada es menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a NRG medida, por ejemplo, por un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a NRG tiene una constante de disociación (Kd) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,01 \text{ nM}$ , o  $\leq 0,001 \text{ nM}$  (por ejemplo,  $10^{-8} \text{ M}$  o menos, por ejemplo de  $10^{-8} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ , por ejemplo de  $10^{-9} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ ). En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-NRG se une a un epítopo de NRG que está conservado entre NRG de diferentes especies.

El término "anticuerpo" en este documento se usa en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula diferente a un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al cual se une el anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, aunque sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de una única cadena (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición por un 50 % o más, y a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más. En este documento se proporciona un ensayo de competición ejemplar.

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en que una parte de la cadena pesada y/o ligera se obtiene de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se obtiene de una fuente o especie diferente.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento/proliferación celular no regulada. Ejemplos de cáncer incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin), blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma del endometrio o útero, carcinoma de glándulas salivares, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos, y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseída por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1 IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente.

La expresión, "agente citotóxico" como se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o evita una función celular y/o causa muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, aunque sin limitación, isótopos radioactivos (por ejemplo,  $\text{At}^{211}$ ,  $\text{I}^{131}$ ,  $\text{I}^{125}$ ,  $\text{Y}^{90}$ ,  $\text{Re}^{186}$ ,  $\text{Re}^{188}$ ,  $\text{Sm}^{153}$ ,  $\text{Bi}^{212}$ ,  $\text{P}^{32}$ ,  $\text{Pb}^{212}$  e isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos descritos a continuación.

"Funciones efectoras" se refiere a aquellas actividades biológicas que se pueden atribuir a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo de anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y activación de células B.

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

La expresión "región Fc" en este documento se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una parte de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. Salvo que se especifique de otro modo en este documento, la numeración de los restos de aminoácidos de la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado el índice EU, como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Flanqueante" o "FR" se refiere a restos del dominio variable diferentes a los restos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable generalmente consta de cuatro dominios FR; FR1, FR2, FR3, y FR4. Por consiguiente, las secuencias HVR y FR generalmente aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en este documento de forma intercambiable para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en este documento.

Las expresiones "célula hospedadora", "línea celular hospedadora", y "cultivo celular hospedador" se usan de forma intercambiable y hacen referencia a células en las cuales se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente de la cantidad de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula precursora, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica explorada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en este documento.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígenos no humanos.

Una "región flanqueante consenso humana" es una región flanqueante que representa los restos de aminoácidos que existen de forma más habitual en una selección de secuencias flanqueantes VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de las secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3. En una realización, para VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat et al., *supra*. En una realización, para VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat et al., *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende restos de aminoácidos de HVR no humanas y restos de aminoácidos de FR humanas. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha experimentado humanización.

La expresión "región hipervariable" o "HVR", como se usa en este documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). Generalmente, los anticuerpos nativos de cuatro cadenas comprenden seis HVR; tres en VH (H1, H2, H3), y tres en VL (L1, L2, L3). Las HVR generalmente comprenden restos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), siendo estas últimas de mayor variabilidad de secuencia y/o estando implicadas en el reconocimiento de antígenos. Bucles hipervariables ejemplares existen en los restos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Existen CDR ejemplares (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3) en los restos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2, y 95-102 de H3. (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR generalmente comprenden los restos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "restos determinantes de especificidad", o "SDR", que son restos que contactan con el antígeno. Los SDR están contenidos en regiones de las CDR llamadas CDR abreviadas, o a-CDR. Las a-CDR ejemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, y a-CDR-H3) existen en los restos de aminoácidos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2, y 95-102 de H3. (Véase Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)). Salvo que se indique de otro modo, los restos HVR y otros restos en el dominio variable (por ejemplo, restos FR) se numeran en este documento de acuerdo con Kabat et al., *supra*.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado a una o más moléculas heterólogas, incluyendo aunque sin limitación un agente citotóxico.

Un "individuo" o "sujeto" o "paciente" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, aunque sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos, y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En ciertas realizaciones, el individuo, sujeto, o paciente es un ser humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica a más del 95 % o 99 % de pureza determinada por, por ejemplo, electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, intercambio de iones o HPLC en fase inversa). Para una revisión de los métodos para la evaluación de la pureza de anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que

contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extra-cromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

"Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-NRG" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesada y ligera de anticuerpo (o fragmentos de las mismas), incluyendo la molécula o moléculas de ácido nucleico en un único vector o vectores diferentes, y estando presente dicha molécula o moléculas de ácido nucleico en una o más localizaciones en una célula hospedadora.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones de origen natural o surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes generalmente dichas variantes en cantidades minoritarias. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe entenderse como que requiere producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usarse de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por diversas técnicas, incluyendo aunque sin limitación el método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación en fagos, y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todo o parte de los loci de inmunoglobulina humana, describiéndose en este documento dichos métodos y otros métodos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

Un "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o radiomarcador. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

"Anticuerpos nativos" se refiere a moléculas de inmunoglobulina de origen natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están enlazadas por disulfuro. De N- a C-terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguida por tres dominios constantes (CH1, CH2, y CH3). Así mismo, de N- a C-terminal, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de cadena ligera, seguida por un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término "prospecto" se usa para hacer referencia a instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de indicaciones, utilización, dosificación, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

"Porcentaje ( %) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de restos aminoacídicos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos aminoacídicos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversos modos que pertenecen a las habilidades de la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible al público tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los especialistas en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para los propósitos de este documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se autorizó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha archivado con documentación del usuario en U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde está registrado con el Número de Registro de Copyright de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público en Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede recopilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debe recopilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se configuran por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que puede estar formulada de forma alternativa como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos B) se calcula del siguiente modo:

**100 veces la fracción X/Y**

donde X es la cantidad de restos aminoacídicos valorados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B, y donde Y es la cantidad total de restos aminoacídicos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A. Salvo que se indique específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en este documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma para que sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al cual se administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, diferente de un ingrediente activo, que es no tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, aunque sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizante, o conservante.

El término "NRG" como se usa en este documento, se refiere a cualquier neurregulina nativa (también conocida como heregulina) de cualquier fuente vertebrada, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), salvo que se indique de otro modo. El término abarca NRG no procesada "de longitud completa" así como cualquier forma de NRG que resulte de su procesamiento en la célula. El término también abarca variantes de origen natural de NRG, por ejemplo, variantes de corte y ajuste o variantes alélicas. Existen cuatro formas conocidas de NRG: NRG1 (Holmes, W.E. et al., Science 256:1205-1210 (1992)); NRG2 (Caraway, K.L. et al., Nature 387:512-516 (1997)); NRG3 (Zhang, E. et al., Proc Natl Acad Sci USA 94:9562-9567); y NRG4 (Harari, D. et al., Oncogene 18:2681-2689). Debido al corte y ajuste alternativo existen dos isoformas activas del dominio tipo EGF de NRG1 que es necesario para la unión del receptor, conocido como NRG1 alfa (NRG1 $\alpha$ ) y NRG1 beta (NRG1 $\beta$ ). Se muestran secuencias de NRG 1 humanas ejemplares en el Número de Acceso a GenBank BK000383 (Falls, D. L., Ex Cell Res, 284:14-30 (2003) y en la patente de Estados Unidos N° 5.367.060.

Como se usa en este documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "que trata") se refiere a intervención clínica en un intento por alterar el transcurso natural del individuo que se está tratando, y puede realizarse para profilaxis o durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, aunque sin limitación, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o paliación de la patología, y remisión o pronóstico mejorado. En la invención los antagonistas de NRG se usan para aumentar el tiempo hasta la recidiva del tumor. En ciertas realizaciones, el tratamiento provoca una reducción en la cantidad de o ausencia completa de células que reinician el tumor; una disminución en la cantidad de células que reinician el tumor en un tumor sólido con relación a las células en el tumor que no son células que reinician el tumor; y/o inhibición de la proliferación de células que reinician el tumor. En ciertas realizaciones, el tratamiento con un antagonista de NRG provoca un aumento en el tiempo hasta la recidiva del tumor de al menos 1,25, 1,50, 1,75, 2,0 veces mayor que el tiempo hasta la recidiva del tumor en ausencia de tratamiento con un antagonista de NRG.

Las expresiones "región variable" o "dominio variable" se refieren al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones flanqueantes (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt et al. Kuby Immunology, 6ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007)). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, pueden aislarse anticuerpos que se unen a un antígeno particular usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para explorar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).

El término "vector", como se usa en este documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que está ligada. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la cual se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los cuales están unidos de forma funcional. Dichos vectores se mencionan en este documento como "vectores de expresión".

**II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS**

La presente invención se basa en el hallazgo de que la señalización autocrina NRG desempeña un papel importante en la supervivencia y proliferación de una pequeña población de células tumorales después de quimioterapia en un tumor por lo demás quimiosensible. Estas células tumorales supervivientes, mencionadas en este documento como



"células reiniciadoras de tumor", o "TRIC", son responsables de la recaída y recidiva del cáncer en pacientes cuyo cáncer se trató previamente con un agente terapéutico.

La inhibición de la señalización NRG provoca el retardo o prevención de la recaída o recidiva del tumor después de tratamiento con un agente terapéutico.

Por consiguiente, la invención es como se define en las reivindicaciones, en particular proporcionando un antagonista de neurregulina 1 (NRG1) y un agente quimioterapéutico para su uso en un método para aumentar el tiempo hasta la recidiva del tumor en un paciente con cáncer, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz del antagonista de neurregulina 1 y agente quimioterapéutico al paciente, donde el agente quimioterapéutico es paclitaxel, cisplatino, o una combinación de paclitaxel y cisplatino, y donde el antagonista de neurregulina 1 es un anticuerpo anti-NRG1, un ARN, o una molécula receptora de NRG1 que se une a NRG1.

En ciertas realizaciones, el tiempo hasta la recidiva del tumor es al menos 1,25, 1,50, 1,75, 2,0, 2,5, 5,0, 10, 20, ó 50 veces mayor que el tiempo hasta la recidiva del tumor en ausencia del antagonista de neurregulina.

#### A. Antagonistas de NRG

Los antagonistas de NRG incluyen polipéptidos que se unen específicamente a NRG, anticuerpos contra NRG (anticuerpos anti-NRG), ARN, tal como ARNi, ARNip, ARNhp, etc., moléculas pequeñas, moléculas receptoras y derivados, tales como inmunoadhesinas, que se unen específicamente a NRG. (Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 6.696.290 y 7.659.368, las publicaciones de Estados Unidos 2010455093 y 20100278801) y proteínas de fusión. Los antagonistas de NRG también incluyen variantes antagonistas de polipéptidos NRG, aptámeros de ARN y peptidocuerpos contra NRG. Ejemplos de cada uno de éstos se describen a continuación. La invención emplea agonistas de NRG1 seleccionados entre un anticuerpo anti-NRG1, un ARN, y a una molécula receptora de NRG1 que se une a NRG1.

##### 1. Anticuerpos

Los anti-anticuerpos contra NRG que son útiles en los métodos de la invención incluyen cualquier anticuerpo que se una con suficiente afinidad y especificidad a NRG y pueda reducir o inhibir la señalización NRG. Se describen anticuerpos contra NRG en el documento WO1992020798, la patente de Estados Unidos N° 6.953.842, y la patente de Estados Unidos N° 6.252.051.

##### a) Afinidad de anticuerpo

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en este documento tiene una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,1 \text{ nM}$ ,  $\leq 0,01 \text{ nM}$ , o  $\leq 0,001 \text{ nM}$  (por ejemplo,  $10^{-8} \text{ M}$  o menos, por ejemplo de  $10^{-8} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ , por ejemplo, de  $10^{-9} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ ).

En una realización, la  $K_d$  se mide por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de Fab por antígenos se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con ( $^{125}\text{I}$ ) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, después capturando el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones del ensayo, se recubren placas multi-pocillo MICROTITER® (Thermo Scientific) durante una noche con  $5 \mu\text{g/ml}$  de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico  $50 \text{ mM}$  ( $\text{pH } 9,6$ ), y posteriormente se bloquean con albúmina sérica bovina al  $2 \%$  (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente  $23^\circ\text{C}$ ). En una placa no adsorbente (Nunc n° 269620), se mezcla [ $^{125}\text{I}$ ]-antígeno  $100 \text{ pM}$  o  $26 \text{ pM}$  con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). El Fab de interés después se incuba durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. Después de ello, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución después se retira y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 al  $0,1 \%$  (TWEEN-20®) en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden  $150 \mu\text{l/pocillo}$  de agente de centelleo (MICROSCINT-20™; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos de o igual al  $20 \%$  de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, la  $K_d$  se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIACORE®-2000 o a BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a  $25^\circ\text{C}$  con chips CM5 de antígeno inmovilizado a  $\sim 10$  unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico  $10 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 4,8$ , hasta  $5 \mu\text{g/ml}$  ( $\sim 0,2 \mu\text{M}$ ) antes de su inyección a un caudal de  $5 \mu\text{l/minuto}$  para conseguir

aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de la proteína acoplada. Después de la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie de factor dos de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 al 0,05 % (TWEEN-20™) (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación ( $k_{on}$ ) y velocidades de disociación ( $k_{off}$ ) se calculan usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno simple (BIACORE® Evaluation Software versión 3.2) por ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio ( $K_d$ ) se calcula como la proporción  $k_{off}/k_{on}$ . Véase, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación excede de  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación puede determinarse usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con interrupción de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-AMINCO™ (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

#### **b) Fragmentos de anticuerpo**

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en este documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, aunque sin limitación, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpo, véase Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003). Para una revisión de fragmentos scFv véase, por ejemplo, Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), pág. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las patentes de Estados Unidos N° 5.571.894 y 5.587.458. Para el análisis de fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> que comprenden restos del epítipo de unión al receptor de rescate y que tienen semi-vida aumentada in vivo, véase la patente de Estados Unidos N° 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, el documento EP 404,097; el documento WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de un único dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una parte del dominio variable de cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de un único dominio es un anticuerpo humano de un único dominio (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.248.516 B1).

Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse por diversas técnicas, incluyendo aunque sin limitación digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como producción por células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en este documento.

#### **c) Anticuerpos quiméricos y humanizados**

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en este documento es un anticuerpo quimérico. Ciertos anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo, o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo "de clase cambiada" en que la clase o subclase se ha cambiado de la del anticuerpo precursor. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad a seres humanos, reteniendo al mismo tiempo la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano precursor. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en que las HVR, por ejemplo, las CDR, (o partes de las mismas) se obtienen de un anticuerpo no humano, y las FR (o partes de las mismas) se obtienen de secuencias de anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos restos FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del cual se obtienen los restos HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad de anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y métodos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008), y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); patentes de Estados Unidos N° 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321, y 7.087.409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (que describen injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (que describen "recubrimiento"); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (que describen "redistribución de FR"); y Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) y Klimka et al., Br. J.

Cancer, 83:252-260 (2000) (que describen el enfoque de "selección guiada" para la redistribución de FR).

Las regiones flanqueantes humanas que pueden usarse para la humanización incluyen, aunque sin limitación: regiones flanqueantes seleccionadas usando el método de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)); regiones flanqueantes derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); y Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993)); regiones flanqueantes maduras humanas (somáticamente mutadas) o regiones flanqueantes de línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)); y regiones flanqueantes derivadas de bibliotecas de FR de selección (véase, por ejemplo, Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) y Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)).

#### **d) Anticuerpos humanos**

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en este documento es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen en líneas generales en van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) y Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008).

Los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a exposición antigénica. Dichos animales normalmente contienen todo o una parte de los loci de inmunoglobulina humana, que remplazan los loci de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los loci de inmunoglobulina endógena generalmente se han inactivado. Para una revisión de los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, véase Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005). Véanse también, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de Estados Unidos Nº 5.770.429 que describe la tecnología HUMAB®; la patente de Estados Unidos Nº 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE®, y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos Nº US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®. Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, por combinación con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también pueden prepararse por métodos basado en hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, por ejemplo, Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991).) Los anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridoma de células B humanas también se describen en Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3567-3562 (2006). Métodos adicionales incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nº 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (que describen hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005).

Los anticuerpos humanos también pueden generarse aislando secuencias de dominio variable de clon Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación en fagos derivadas de seres humanos. Dichas secuencias de dominio variable después pueden combinarse con un dominio constante humano deseado. A continuación se describen técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de bibliotecas de anticuerpos.

#### **e) Anticuerpos derivados de bibliotecas**

Los anticuerpos de la invención pueden aislarse explorando bibliotecas combinatorias para anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen diversos métodos en la técnica para generar bibliotecas de presentación en fagos y explorar dichas bibliotecas para anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos métodos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom et al. en Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen adicionalmente, por ejemplo, en McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004).

En ciertos métodos de presentación en fagos, se clonan por separado repertorios de genes VH y VL por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que después pueden explorarse para fagos de unión a antígeno como se describe en Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Los fagos normalmente presentan fragmentos de anticuerpos, como fragmentos Fv de una única cadena

(scFv) o como fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad contra el inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, puede clonarse el repertorio virgen (por ejemplo, de seres humanos) para proporcionar una fuente única de anticuerpos contra un amplio intervalo de no auto-antígenos y también auto-antígenos sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también pueden prepararse bibliotecas vírgenes de forma sintética clonando segmentos de gen V no reordenados de células madre, y usando cebadores de PCR que contienen secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen bibliotecas en fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente de Estados Unidos Nº 5.750.373, y las publicaciones de patente de Estados Unidos Nº 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de bibliotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humano en este documento.

#### **f) Anticuerpos multiespecíficos**

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en este documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es por NRG y la otra es por otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítomos diferentes de NRG. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos para células que expresan NRG. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, aunque sin limitación, co-expresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, Nature 305: 537 (1983)), el documento WO 93/08829, y Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)), y ingeniería de "piezas en espacios" (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos Nº 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también pueden prepararse modificando por ingeniería los efectos de orientación electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004A1); entrecruzando dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 4.676.980, y Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)); usando tecnología de "diacuerpo" para preparar fragmentos biespecíficos de anticuerpo (véase, por ejemplo, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros de Fv de una única cadena (sFv) (véase, por ejemplo Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

También se incluyen en este documento anticuerpos modificados por ingeniería con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo "anticuerpos Octopus" (véase, por ejemplo el documento US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento de este documento también incluye un "FAB de acción dual" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a NRG así como otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

#### **g) Variantes de anticuerpo**

En ciertas realizaciones, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en este documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede hacerse cualquier combinación de delección, inserción, y sustitución para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

#### **h) Variantes de sustitución, inserción y delección**

En ciertas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácido. Los sitios de interés para mutagénesis de sustitución incluyen HVR y FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 1 bajo el encabezado de "sustituciones conservativas". Se proporcionan cambios más sustanciales en la Tabla 1 bajo el encabezado de "sustituciones ejemplares", y como se describe a continuación adicionalmente en referencia a las clases de cadena lateral de aminoácido. Pueden introducirse sustituciones de aminoácido en un anticuerpo de interés y explorarse los productos para una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

**TABLA 1**

| <b>Resto original</b> | <b>Sustituciones ejemplares</b>     | <b>Sustituciones preferidas</b> |
|-----------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Ala (A)               | Val; Leu; Ile                       | Val                             |
| Arg (R)               | Lys; Gln; Asn                       | Lys                             |
| Asn (N)               | Gln; His; Asp, Lys; Arg             | Gln                             |
| Asp (D)               | Glu; Asn                            | Glu                             |
| Cys (C)               | Ser; Ala                            | Ser                             |
| Gln (Q)               | Asn; Glu                            | Asn                             |
| Glu (E)               | Asp; Gln                            | Asp                             |
| Gly (G)               | Ala                                 | Ala                             |
| His (H)               | Asn; Gln; Lys; Arg                  | Arg                             |
| Ile (I)               | Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina | Leu                             |
| Leu (L)               | Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile                             |
| Lys (K)               | Arg; Gln; Asn                       | Arg                             |
| Met (M)               | Leu; Phe; Ile                       | Leu                             |
| Phe (F)               | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr        | Tyr                             |
| Pro (P)               | Ala                                 | Ala                             |
| Ser (S)               | Thr                                 | Thr                             |
| Thr (T)               | Val; Ser                            | Ser                             |
| Trp (W)               | Tyr; Phe                            | Tyr                             |
| Tyr (Y)               | Trp; Phe; Thr; Ser                  | Phe                             |
| Val (V)               | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina | Leu                             |

Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con propiedades comunes de cadena lateral:

- 5        (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;  
           (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;  
           (3) ácidos: Asp, Glu;  
           (4) básicos: His, Lys, Arg;  
 10        (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;  
           (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

- 15        Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para estudio adicional tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en ciertas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad aumentada, inmunogenicidad reducida) relativas al anticuerpo precursor y/o tendrán sustancialmente retenidas ciertas propiedades biológicas del anticuerpo precursor. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo con afinidad madurada, que puede generarse de forma conveniente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de afinidad basadas en presentación en fagos tales como las descritas en este documento. En resumen, se muta uno o más restos HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se seleccionan para una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

- 25        Pueden hacerse alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones pueden hacerse en "puntos calientes" de HVR, es decir, restos codificados por codones que experimentan mutación a elevada frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)), y/o SDR (a-CDR), ensayándose la VH o VL variante resultante para la afinidad de unión. La maduración de afinidad por construcción y reelección de bibliotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom et al. en Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunas realizaciones de maduración de afinidad, se introduce diversidad en los genes variables elegidos para maduración por cualquiera de diversos métodos (por ejemplo, PCR propensa a errores, redistribución de cadena, o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Después se crea una biblioteca secundaria. La biblioteca después se explora para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otros métodos para introducir diversidad implican enfoques dirigidos a HVR, en que varios restos HVR (por ejemplo, 4-6 restos cada vez) se aleatorizan. Los restos HVR implicados en la unión a antígeno pueden identificarse específicamente, por ejemplo, usando mutagénesis por barrido con alanina o modelado. A menudo se abordan CDR-H3 y CDR-L3 en particular.

- 40        En ciertas realizaciones, pueden suceder sustituciones, inserciones, o deleciones dentro de una o más HVR siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden hacerse alteraciones conservativas (por ejemplo, sustituciones conservativas proporcionadas en este documento) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión en HVR. Dichas alteraciones pueden estar

fuera de los "puntos calientes" de HVR o SDR. En ciertas realizaciones de las secuencias VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está sin alterar, o contiene no more de una, dos o tres sustituciones de aminoácido.

Un método útil para la identificación de restos o regiones de un anticuerpo que pueden abordarse para mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido con alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este método, un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) se identifica y reemplaza por un aminoácido neutro cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno está afectada. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos adyacentes pueden abordarse o eliminarse como candidatos de sustitución. Pueden seleccionarse variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de un único aminoácido o múltiples aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un restos metionilo N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N- o C-terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semi-vida en suero del anticuerpo.

#### **i) Variantes de glucosilación**

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en este documento se altera para aumentar o disminuir el grado al cual está glucosilado el anticuerpo. La adición o delección de sitios de glucosilación en un anticuerpo puede conseguirse de forma convencional alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o elimine uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido al mismo puede alterarse. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero normalmente comprenden un oligosacárido ramificado, biantenar que está generalmente unido un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa, y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tronco" de la estructura oligosacárida biantenar. En algunas realizaciones, pueden hacerse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

En una realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser del 1 % al 80 %, del 1 % al 65 %, del 5 % al 65 % o del 20 % al 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, relativa a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) medida por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al resto de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración Eu de los restos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede estar localizado aproximadamente  $\pm 3$  aminoácidos cadena arriba o cadena abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones minoritarias de secuencia en anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación puede tener función ADCC mejorada. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos N° US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucosilados" o "deficientes en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células Lec13 CHO deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); solicitud de patente de Estados Unidos N° US 2003/0157108 A1, Presta, L; y documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares knockout, tales como células CHO knockout para el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8* (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); y documento WO2003/085107).

Se proporcionan adicionalmente variantes de anticuerpo con oligosacáridos biseccionados, por ejemplo, en que un oligosacárido biantenar unido a la región Fc del anticuerpo está diseccionado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Ejemplos de dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); patente de Estados Unidos N° 6.602.684 (Umana et al.); y documento US 2005/0123546 (Umana et al.). También se proporcionan

variantes de anticuerpo con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel et al.); documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

#### j) Variantes de región Fc

En ciertas realizaciones, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácido en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en este documento, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc humana de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, que lo hacen un candidato deseable para aplicaciones en que la semi-vida del anticuerpo *in vivo* es importante pero ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/eliminación de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión FcγR (por tanto probablemente carece de actividad ADCC), pero retiene la capacidad de unión FcRn. Las células primarias que median la ADCC, las células NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Se describen ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la patente de Estados Unidos N° 5.500.362 (véase, por ejemplo Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayo no radiactivos (véase, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radioactiva ACTITM para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y ensayo de citotoxicidad no radioactiva CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citolíticas naturales (NK). Alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También pueden realizarse ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y por tanto carece de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en el documento WO 2006/029879 y el documento WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También pueden realizarse determinación de unión a FcRn y eliminación/semin-vida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más restos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de Estados Unidos N° 6.737.056). Dichos mutantes Fc incluyen mutantes Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante Fc llamado "DANA" con sustitución de los restos 265 y 297 en alanina (patente de Estados Unidos N° 7.332.581).

Se describen ciertas variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a FcR. (Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.737.056; documento WO 2004/056312, y Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).)

En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácido que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración EU de restos).

En algunas realizaciones, se hacen alteraciones en la región Fc que provocan unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alterada (es decir, mejorada o disminuida), por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos N° 6.194.551, el documento WO 99/51642, e Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Se describen anticuerpos con semi-vidas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), en el documento US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en los mismos que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más restos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del resto de la región Fc 434 (patente de Estados Unidos N° 7.371.826).

Véase también Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); patente de Estados Unidos N° 5.648.260; patente de

Estados Unidos N° 5.624.821; y documento WO 94/29351 referentes a otros ejemplos de variantes de región Fc.

#### **k) Variantes de anticuerpo modificados por cisteína**

En ciertas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos modificados por cisteína, por ejemplo, "tioMAb", en que uno o más restos de un anticuerpo están sustituidos con restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos existen en sitios accesibles del anticuerpo. Mediante la sustitución de esos restos con cisteína, se posicionan de este modo grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y pueden usarse para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármaco o restos de fármaco enlazador, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en este documento. En ciertas realizaciones, uno cualquiera o más de los siguientes restos puede sustituirse con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Los anticuerpos modificados por cisteína pueden generarse como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 7.521.541.

#### **l) Derivados de anticuerpo**

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en este documento puede modificarse adicionalmente para que contenga restos no proteicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para derivatización del anticuerpo incluyen, aunque sin limitación, polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, aunque sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímeros de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, propilenglicol homopolímeros, copolímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos. El propionaldehído polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, la cantidad y/o tipo de polímeros usados para la derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, aunque sin limitación, la propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en un terapia bajo condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteico que pueden calentarse selectivamente por exposición a radiación. En una realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, aunque sin limitación, longitudes de onda que no dañan a células normales, pero que calientan el resto no proteico hasta una temperatura a la cual se eliminan células proximales al anticuerpo-resto no proteico.

#### **m) Métodos y composiciones recombinantes**

Pueden producirse anticuerpos usando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos N° 4.816.567. En una realización, se proporciona ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-NRG descrito en este documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En una realización adicional, se proporciona uno más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. En una de dichas realizaciones, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende VH del anticuerpo. En una realización, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo una célula de ovario de hámster chino (CHO) o célula linfóide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En una realización, se proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-NRG, donde el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, proporcionado anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o medio de cultivo de células hospedadoras).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-NRG, se aísla el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para su adicional clonación y/o expresión en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).



Las células hospedadoras adecuadas para clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas descritas en este documento. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos en bacterias, en particular cuando no son necesarias la glucosilación y la función efectora Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.648.237, 5.789.199, y 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pág. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*.) Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Además de procariotas, son hospedadores de clonación o expresión adecuados microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas fúngicas y de levadura cuyas vías de glucosilación se han "humanizado", provocando la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), y Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

También se obtienen células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo glucosilado de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que pueden usarse junto con células de insecto, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse cultivos de células vegetales como hospedadores. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978, y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También pueden usarse células de vertebrados como hospedadores. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 descritas, por ejemplo, en Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de sertoli de ratón (células TM4 descritas, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células renales de mono (CV1); células renales de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células renales caninas (MICK); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A); células pulmonares humanas (W138); células hepáticas humanas (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, descritas, por ejemplo, en Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR<sup>-</sup> (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas celulares hospedadoras de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pág. 255-268 (2003).

## n) Ensayos

Los antagonistas de NRG proporcionados en este documento pueden identificarse, seleccionarse por, o caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se ensaya para su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, por métodos conocidos tales como ELISA, transferencia de Western, etc.

En otro aspecto, se proporcionan ensayos para identificar antagonistas de NRG que tengan actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, inhibición de la señalización de receptor tirosina quinasa inducida por NRG, inhibición del crecimiento tumoral, inhibición de la proliferación celular, etc. También se proporcionan antagonistas que tienen dicha actividad biológica in vivo y/o in vitro.

En ciertas realizaciones, se ensaya un antagonista de la invención para dicha actividad biológica. En una realización, puede medirse la capacidad de un antagonista de inhibir la señalización de receptor tirosina quinasa inducida por NRG determinando el nivel de fosforilación inducida por NRG de los restos de tirosina de receptores tirosina quinasa en presencia y ausencia de un antagonista potencial de NRG. Holmes, et al. 1992. Lo siguiente es un ensayo ejemplar para determinar el estado de fosforilación de receptores tirosina quinasa. Se estimulan células que expresan Her2 y Her3 (tales como células Caov3, o células modificadas por ingeniería para expresar Her2 y Her3) con NRG 10 nM después de una pre-incubación de 60 minutos con el antagonista potencial de NRG o tampón (control). Se analizan lisados de células completas en una transferencia de Western sondeada con un anticuerpo anti-fosfotirosina para determinar el nivel de fosforilación de tirosina. Las transferencias pueden explorarse para cuantificar la señal anti-fosfotirosina. Los antagonistas de NRG reducirían el nivel de fosforilación de tirosina en comparación con el control de tampón. En una realización, el antagonista de NRG inhibe la señalización de tirosina quinasa inducida por NRG en al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % en comparación con un control no tratado.

En ciertas realizaciones, se ensaya un anticuerpo de la invención para su capacidad de inhibir el crecimiento o proliferación celular *in vitro*. Los ensayos para la inhibición del crecimiento o proliferación celular son bien conocidos en la técnica. Ciertos ensayos para la proliferación celular, ejemplificados por los ensayos de "eliminación celular" descritos en este documento, miden la viabilidad celular. Uno de dichos ensayos es el ensayo de viabilidad celular luminescente CellTiter-Glo™, que está disponible en el mercado en Promega (Madison, WI). Ese ensayo determina la cantidad de células viables en cultivo basándose en la cuantificación de ATP presente, que es una indicación de células metabólicamente activas. Véase Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, patente de Estados Unidos N° 6602677. El ensayo puede realizarse en formato de 96 o 384 pocillos, haciéndolo susceptible a exploración automática de alto rendimiento (HTS). Véase Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404. El procedimiento de ensayo implica añadir un único reactivo (reactivo CellTiter-Glo®) directamente a células cultivadas. Esto provoca la lisis celular y la generación de una señal luminescente producida por una reacción de luciferasa. La señal luminescente es proporcional a la cantidad de ATP presente, que es directamente proporcional a la cantidad de células viables presentes en cultivo. Los datos pueden registrarse por un dispositivo de imágenes de luminómetro o cámara CCD. La producción de luminiscencia se expresa como unidades de luz relativas (RLU).

Otro ensayo para la proliferación celular es el ensayo "MTT", un ensayo colorimétrico, que mide la oxidación de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio en formazán por reductasa mitocondrial. Como el ensayo CellTiter-Glo™, este ensayo indica la cantidad de células metabólicamente activas presentes en un cultivo celular. Véase, por ejemplo, Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63, y Zhang et al. (2005) Cancer Res. 65:3877-3882.

En un aspecto, se ensaya un antagonista de NRG para su capacidad de inducir muerte celular *in vitro*. Los ensayos para la inducción de muerte celular son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, dichos ensayos miden, por ejemplo, pérdida de integridad de membrana indicada por captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripán (véase Moore et al. (1995) Cytotechnology, 17:1-11), o 7AAD. En un ensayo de captación de PI ejemplar, las células se cultivan en medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM):F-12 de Ham (50:50) suplementado con FBS inactivado por calor al 10 % (Hyclone) y L-glutamina 2 mM. Por tanto, el ensayo se realiza en ausencia de complemento y células efectoras inmunes. Las células se siembran a una densidad de  $3 \times 10^6$  por placa en placas de 100 x 20 mm y se dejan adherir durante una noche. El medio se retira y se reemplaza con medio fresco solamente o medio que contiene diversas concentraciones del anticuerpo o inmunoconjugado. Las células se incuban durante un periodo de tiempo de 3 días. Después del tratamiento, las monocapas se lavan con PBS y se desprenden por tratamiento con tripsina. Las células después se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C, el sedimento se resuspende en 3 ml de tampón de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  frío (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM) y se dividió en alícuotas en tubos de 12 x 75 mm con tapa de filtro de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de grupos de células. Los tubos después reciben PI (10 µg/ml). Las muestras se analizan usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Los anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular determinados por captación de PI se identifican de este modo.

En un aspecto, se ensaya un antagonista de NRG para su capacidad de inducir apoptosis (muerte celular programada) *in vitro*. Un ensayo ejemplar para anticuerpos o inmunoconjugados que inducen apoptosis es un ensayo de unión a anexina. En un ensayo de unión a anexina ejemplar, las células se cultivan y siembran en placas como se ha analizado en el párrafo precedente. El medio se retira y reemplaza con medio fresco solamente o medio que contiene de 0,001 a 10 µg/ml del anticuerpo o inmunoconjugado. Después de un periodo de incubación de tres días, se lavan las monocapas con PBS y se desprenden por tratamiento con tripsina. Las células después se centrifugan, se resuspenden en tampón de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , y se dividen en alícuotas en tubos como se ha analizado en el párrafo precedente. Los tubos después reciben anexina marcada (por ejemplo, anexina V-FITC) (1 µg/ml). Las muestras se analizan usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (BD Biosciences). Los anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina relativos al control se identifican de este modo. Otro ensayo ejemplar para anticuerpos o inmunoconjugados que inducen apoptosis es un ensayo colorimétrico ELISA de ADN histona para detectar degradación internucleosómica del ADN genómico. Dicho ensayo puede realizarse usando, por ejemplo, el kit ELISA de detección de muerte celular (Roche, Palo Alto, CA).

Las células para su uso en cualquiera de los ensayos *in vitro* anteriores incluyen células o líneas celulares que expresan de forma natural NRG o que se han modificado por ingeniería para expresar NRG. Dichas células incluyen células tumorales que sobre-expresan NRG con relación a células normales del mismo origen tisular. Dichas células también incluyen líneas celulares (incluyendo líneas celulares tumorales) que expresan NRG y líneas celulares que normalmente no expresan NRG pero se han transfectado con ácido nucleico que codifica NRG.

En un aspecto, se ensaya un antagonista de NRG para su capacidad de inhibir el crecimiento o proliferación celular *in vivo*. En ciertas realizaciones, se ensaya un antagonista de NRG para su capacidad de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*. Pueden usarse sistemas de modelo *in vivo*, tales como modelos de xenoinjerto, para dicho ensayo. En un sistema de xenoinjerto ejemplar, se introducen células tumorales humanas en un animal no humano adecuadamente inmunocomprometido, por ejemplo, un ratón "desnudo" atímico. Se administra un anticuerpo de la invención al animal. Se mide la capacidad del anticuerpo de inhibir o disminuir el crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones del sistema de xenoinjerto anterior, las células tumorales humanas son células tumorales de un paciente humano. Dichos modelos de xenoinjerto están disponibles en el mercado en Oncotest GmbH (Frieburg,

Alemania). En ciertas realizaciones, las células tumorales humanas son células de una línea celular tumoral humana. En ciertas realizaciones, las células tumorales humanas se introducen en un animal no humano adecuadamente inmunocomprometido por inyección subcutánea o por trasplante en un sitio adecuado, tal como una almohadilla de grasa mamaria.

En ciertas realizaciones, el antagonista de NRG inhibe la proliferación celular en al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % en comparación con un control no tratado. En otras realizaciones, el antagonista de NRG inhibe el crecimiento tumoral en al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % en comparación con un control no tratado.

## **2. Polipéptidos de unión a NRG**

Pueden usarse polipéptidos de unión a NRG o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a NGR en los métodos de la invención, por ejemplo, para unirse a y secuestrar la proteína NGR, evitando de este modo la señalización. Preferiblemente, los polipéptidos NRG o fragmentos de los mismos, son una forma soluble. En algunas realizaciones, una forma soluble del polipéptido ejerce un efecto inhibitor sobre la actividad biológica de la NGR por unión a NGR, evitando de este modo su asociación con sus compañeros naturales de unión.

## **3. Aptámeros**

Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que forman estructuras terciarias que se unen específicamente a una molécula diana, tal como un polipéptido NRG. La generación y uso terapéutico de aptámeros están bien establecidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.475.096. Puede encontrarse información adicional sobre aptámeros en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 20060148748.

## **4. Peptidocuerpo**

Un peptidocuerpo es una secuencia peptídica ligada a una secuencia de aminoácidos que codifica un fragmento o parte de una molécula de inmunoglobulina. Los polipéptidos pueden obtenerse de secuencias aleatorizadas seleccionadas por cualquier método para unión específica incluyendo, aunque sin limitación, tecnología de presentación en fagos. En una realización preferida, el polipéptido seleccionado puede ligarse a una secuencia de aminoácidos que codifica la parte Fc de una inmunoglobulina. Los peptidocuerpos que se unen específicamente a y antagonizan NRG también son útiles en los métodos de la invención.

## **5. Ácidos nucleicos antagonistas**

Otros antagonistas de NRG son construcciones de ARN o ADN antisentido preparadas usando tecnología antisentido, donde, por ejemplo, una molécula de ARN o ADN antisentido actúa bloqueando directamente la traducción de ARNm por hibridación con ARNm diana y evitando la traducción de proteínas. La tecnología antisentido puede usarse para controlar la expresión génica a través de formación de triple hélice o ADN o ARN antisentido, que están basados ambos métodos en la unión de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, la parte codificante 5' de la secuencia polinucleotídica, que codifica el polipéptido NRG maduro en este documento, puede usarse para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice - véase Lee et al., Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney et al., Science, 241: 456 (1988); Dervan et al., Science, 251:1360 (1991)), evitando de este modo la transcripción y la producción del polipéptido NRG. El oligonucleótido de ARN antisentido hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido NRG (antisentido - Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también pueden suministrarse a células de modo que el ARN o ADN antisentido pueda expresarse *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido NRG. Cuando se usa ADN antisentido, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre aproximadamente -10 y +10 posiciones de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

Los ARN interferentes pequeños (ARNip) son moléculas de ARN bicatenarias generalmente de menos de 30 nucleótidos de longitud que reducen la expresión de un gen diana. Los ARNip han demostrado ser útiles como herramienta en estudios de modulación de la expresión génica donde han fallado los antagonistas tradicionales tales como moléculas pequeñas o anticuerpos. (Shi Y., Trends in Genetics 19(1):9-12 (2003)). Los ARN bicatenarios sintetizados *in vitro* que son de 21 a 23 nucleótidos de longitud pueden actuar como ARN interferentes (ARNi) y pueden inhibir específicamente la expresión génica (Fire A., Trends in Genetics 391: 806-810 (1999)). Estos ARNi actúan mediando la degradación de sus ARN diana. Como tienen por debajo de 30 nucleótidos de longitud, sin embargo, no activan un mecanismo de defensa antiviral celular. En algunas realizaciones de la invención, el ARNip tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con una parte de la secuencia codificante del polinucleótido que codifica NRG o su complemento.

## 6. Oligopéptidos

Los oligopéptidos de unión a NRG son oligopéptidos que se unen, preferiblemente de forma específica, a NRG como se describe en este documento. Los oligopéptidos de unión a NRG pueden sintetizarse químicamente usando metodologías conocidas de síntesis de oligopéptidos o pueden prepararse y purificarse usando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión a NRG habitualmente son de al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos oligopéptidos que son capaces de unirse, preferiblemente de forma específica, a una NRG como se describe en este documento. Los oligopéptidos de unión a NRG pueden identificarse sin experimentación excesiva usando técnicas bien conocidas. A este respecto, se aprecia que técnicas para explorar bibliotecas de oligopéptidos para oligopéptidos que sean capaces de unirse específicamente a una diana polipeptídica son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; publicaciones PCT N° WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen et al., en Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

A este respecto, la presentación en bacteriófagos (fagos) es una técnica bien conocida que permite explorar grandes bibliotecas de oligopéptidos para identificar miembros de esas bibliotecas que sean capaces de unirse específicamente a una diana polipeptídica. La presentación en fagos es una técnica por la cual se presentan polipéptidos variantes como proteínas de fusión a la proteína de cubierta en la superficie de las partículas de bacteriófago (Scott, J.K. y Smith, G. P. (1990) Science, 249: 386). La utilidad de la presentación en fagos recae en el hecho de que puede clasificarse de forma rápida y eficaz grandes bibliotecas de variantes proteicas selectivamente aleatorizadas (o ADNc clonados aleatoriamente) para aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con alta afinidad. La presentación de bibliotecas de péptidos (Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378) o proteínas (Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363) en fagos se ha usado para explorar millones de polipéptidos u oligopéptidos para aquellos con propiedades de unión específica (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668). La clasificación de bibliotecas en fagos de mutantes aleatorios requiere una estrategia para construir y propagar una gran cantidad de variantes, un procedimiento para purificación de afinidad usando el receptor diana, y un medio para evaluar los resultados de enriquecimientos de unión. Patentes de Estados Unidos N° 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, y 5.663.143.

También se describen métodos para generar bibliotecas de péptidos y explorar estas bibliotecas en las patentes de Estados Unidos N° 5.723.286, 5.432.018, 5.580.717, 5.427.908, 5.498.530, 5.770.434, 5.734.018, 5.698.426, 5.763.192, y 5.723.323.

## 7. Moléculas pequeñas

Las moléculas pequeñas de unión a NRG son moléculas orgánicas diferentes a oligopéptidos o anticuerpos definidos en este documento que se unen, preferiblemente de forma específica, a NRG como se describe en este documento. Las moléculas pequeñas orgánicas de unión a NRG pueden identificarse y sintetizarse químicamente usando metodología conocida (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas pequeñas orgánicas de unión a NRG habitualmente son de menos de aproximadamente 2000 dalton de tamaño, como alternativa de menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 ó 200 dalton de tamaño, donde dichas moléculas pequeñas orgánicas que son capaces de unirse, preferiblemente de forma específica, a NRG como se describe en este documento pueden identificarse sin experimentación excesiva usando técnicas bien conocidas. A este respecto, se aprecia que las técnicas para explorar bibliotecas de moléculas pequeñas orgánicas para moléculas que sean capaces de unirse a una diana polipeptídica son bien conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas pequeñas orgánicas de unión a NRG pueden ser, por ejemplo, aldehídos, cetonas, oximas, hidrazonas, semicarbazonas, carbazidas, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, hidrazinas N-sustituídas, hidrazidas, alcoholes, éteres, tioles, tioéteres, disulfuros, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, ureas, carbamatos, carbonatos, cetales, tiocetales, acetales, tioacetales, aril haluros, aril sulfonatos, alquil haluros, alquil sulfonatos, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, anilinas, alquenos, alquinos, dioles, amino alcoholes, oxazolidinas, oxazolininas, tiazolidinas, tiazolininas, enaminas, sulfonamidas, epóxidos, aziridinas, isocianatos, sulfonil cloruros, compuestos diazo, cloruros de ácidos, o similares.

## 8. Inmunoconjugados

También se describen en este documento inmunoconjugados que comprenden un antagonista de NRG de este documento conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de los mismos), o isótopos radiactivos.

Un inmunoconjugado puede ser un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) en que se conjuga un anticuerpo con uno o más fármacos, incluyendo aunque sin limitación un maitansinoide (véanse las patentes de Estados Unidos N° 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como los restos DE y DF del fármaco monometilauristatina (MMAE y MMAF) (véanse las patentes de Estados Unidos N° 5.635.483 y 5.780.588, y 7.498.298); una dolastatina; una caliqueamicina o derivado de la misma (véanse las patentes de Estados Unidos N° 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, y 5.877.296; Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); y Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (véase Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002); y la patente de Estados Unidos N° 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

Como alternativa, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo descrito en este documento conjugado con una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, incluyendo aunque sin limitación la cadena de difteria A, fragmentos activos no de unión de la toxina diftérica, la cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena de ricina A, la cadena de abrina A, la cadena de modicina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos.

Como alternativa, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo descrito en este documento conjugado con un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Están disponible diversos isótopos radiactivos para la producción de radioconjugados. Ejemplos incluyen  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios de centelleografía, por ejemplo  $Tc^{99m}$  o  $^{112}In$ , o un marcador de espín para imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocidas como imágenes de resonancia magnética, mri), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Pueden prepararse conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico usando diversos agentes bifuncionales de acoplamiento proteico tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), di-isocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético marcado con Carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador inestable en ácido, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotoinestable, enlazador dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); patente de Estados Unidos N° 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC en este documento contemplan expresamente, aunque sin limitación, conjugados preparados con reactivos reticulantes incluyendo, aunque sin limitación, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles en el mercado (por ejemplo, en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EEUU).

## B. Métodos y composiciones para diagnóstico y detección

Los antagonistas de NRG proporcionados en este documento son útiles para detectar la presencia de NRG en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en este documento abarca detección cuantitativa o cualitativa. Una muestra biológica puede comprender una célula o tejido, tal como tejido pulmonar o tejido de mama.

También se proporciona un anticuerpo anti-NRG para su uso en un método de diagnóstico o detección, que es un método para detectar la presencia de NRG en una muestra biológica. El método puede comprender poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-NRG como se describe en este documento en condiciones

permisivas para la unión del anticuerpo anti-NRG a NRG, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-NRG y NRG. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. Puede usarse un anticuerpo anti-NRG para seleccionar sujetos elegibles para terapia con un anticuerpo anti-NRG, por ejemplo donde NRG es un biomarcador para selección de pacientes.

Un paciente puede seleccionarse para tratamiento con un antagonista de NRG si el paciente tiene un cáncer que es o tiene probabilidad de llegar a ser resistente a terapia. La descripción proporciona un ensayo que determina si un paciente tiene un cáncer que es o tiene probabilidad de llegar a ser resistente a terapia. El ensayo puede comprender ensayar células tumorales tomadas del paciente para la expresión de NRG, donde la expresión de NRG es indicativa de que el paciente tiene un cáncer que es o tiene probabilidad de llegar a ser resistente a terapia. El paciente puede seleccionarse como uno que tiene un cáncer que es o tiene probabilidad de llegar a ser resistente a terapia si el nivel de expresión de NRG en el tumor es menor del nivel de expresión de NRG en las TRIC del tumor.

Puede seleccionarse un paciente para tratamiento con un antagonista de NRG si el paciente tiene un cáncer que tiene probabilidad de recaída después de tratamiento con un agente terapéutico. Un aspecto de la descripción proporciona un ensayo que determina si un paciente tiene un cáncer que tiene probabilidad de recaída después de tratamiento con un agente terapéutico. El ensayo puede comprender ensayar células tumorales tomadas del paciente para la expresión de NRG, donde la expresión de NRG es indicativa de que el paciente tiene un cáncer que tiene probabilidad de recaída después de tratamiento con un agente terapéutico. El paciente puede seleccionarse como uno que tiene un cáncer que tiene probabilidad de recaída después de tratamiento con un agente terapéutico si el nivel de expresión de NRG en el tumor es menor que el nivel de expresión de NRG en las TRIC del tumor.

Un ensayo de diagnóstico puede comprender determinar la expresión de neurregulina en una célula tumoral, usando, por ejemplo, inmunohistoquímica, hibridación *in situ*, o RT-PCR. Como alternativa, un ensayo de diagnóstico comprende determinar los niveles de expresión de neurregulina en una célula tumoral usando, por ejemplo, RT-PCR cuantitativa. Un ensayo de diagnóstico puede comprender adicionalmente determinar los niveles de expresión de neurregulina en comparación con un tejido de control tal como, por ejemplo, tejido adyacente no canceroso.

Pueden usarse anticuerpos anti-NRG marcados. Los marcadores incluyen, aunque sin limitación, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromofóricos, electrodenso, quimioluminiscentes, y radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, aunque sin limitación, los radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ , y  $^{131}\text{I}$ , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de Estados Unidos Nº 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, peroxidasa de rábano rusticano (HRP), fosfatasa alcalina, (3-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un colorante precursor tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables, y similares.

### C. Métodos y composiciones terapéuticas

La invención se define en las reivindicaciones.

El antagonista de NRG1 puede proporcionarse en una composición farmacéutica que contiene un vehículo, diluyente o excipiente terapéuticamente inerte. En un ejemplo, los compuestos pueden formularse por mezcla a temperatura ambiente al apropiado pH, y al grado deseado de pureza, con vehículos fisiológicamente aceptables, es decir, vehículos que son no tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas en una forma de administración galénica. El pH de la formulación depende principalmente del uso particular y la concentración de compuesto, pero preferiblemente varía en cualquier parte de aproximadamente 3 a aproximadamente 8. En un ejemplo, un compuesto se formula en un tampón acetato, a pH 5. En otra realización, los compuestos son estériles. El compuesto puede almacenarse, por ejemplo, en forma de una composición sólida o amorfa, como una formulación liofilizada o como una solución acuosa.

Las formulaciones farmacéuticas de un antagonista de NRG descrito en este documento se preparan mezclando dicho antagonista que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son generalmente no tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, aunque sin limitación: tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametONIO; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, butil o bencil alcohol; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteína, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como

polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares de este documento incluyen adicionalmente agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glucoproteínas de hialuronidasa solubles neutras-activas (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa humana soluble PH-20, tales como rHuPH20 (HYLEN-EX®, Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGP ejemplares y métodos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales tales como condroitinasas.

Se describen formulaciones liofilizadas de anticuerpo ejemplares en la patente de Estados Unidos N° 6.267.958. Las formulaciones acuosas de anticuerpo incluyen las descritas en la patente de Estados Unidos N° 6.171.586 y el documento WO2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón histidina-acetato.

Las composiciones se formulan, dosifican, y administran de un modo coherente con la buena práctica médica. Factores de consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el paciente particular que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, la programación de administración, y otros factores conocidos para los expertos médicos.

La composición farmacéutica (o formulación) para aplicación puede envasarse en diversos modos dependiendo del método usado para administrar el fármaco. Generalmente, un artículo para distribución incluye un recipiente que tiene depositada en el mismo la formulación farmacéutica en una forma apropiada. Los recipientes adecuados son bien conocidos para los especialistas en la técnica e incluyen materiales tales como frascos (plástico y vidrio), sobrecitos, ampollas, bolsas de plástico, cilindros metálicos, y similares. El recipiente también puede incluir un ensamblaje contra falsificaciones para evitar el acceso indiscreto a los contenidos del envase. Además, el recipiente tiene depositada sobre el mismo una etiqueta que describe los contenidos del recipiente. La etiqueta puede incluir también advertencias apropiadas.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen un compuesto, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

En un ejemplo, la cantidad farmacéuticamente eficaz del antagonista de NRG administrado por vía parenteral por dosis estará en el intervalo de aproximadamente 0,01-100 mg/kg, como alternativa de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal del paciente por día, siendo el intervalo inicial típico del compuesto usado de 0,3 a 15 mg/kg/día. En otra realización, las formas unitarias de dosificación oral, tales como comprimidos y cápsulas, preferiblemente contienen de aproximadamente 5-100 mg del compuesto de la invención.

Los antagonistas de NRG pueden administrarse por cualquier medio adecuado, incluyendo administración oral, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal, transdérmica, parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intradérmica, intratecal y epidural e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea.

La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se contemplan en este documento diversos programas de dosificación incluyendo aunque sin limitación administración única o múltiple sobre varios momentos puntuales, administración en bolo, e infusión por pulsos.

El antagonista de NRG puede administrarse en cualquier forma de administración conveniente, por ejemplo, comprimidos, polvos, cápsulas, soluciones, dispersiones, suspensiones, jarabes, pulverizaciones, supositorios, geles, emulsiones, parches, etc. Dichas composiciones pueden contener componentes convencionales en preparaciones farmacéuticas, por ejemplo, diluyentes, vehículos, modificadores de pH, edulcorantes, agentes de volumen, y agentes activos adicionales.

Una formulación típica se prepara mezclando un compuesto de la presente invención y un vehículo o excipiente. Los vehículos y excipientes adecuados son bien conocidos para los especialistas en la técnica y se describen en detalle en, por ejemplo, Ansel, Howard C., et al., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems.

Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004; Gennaro, Alfonso R., et al. Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; y Rowe, Raymond C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Chicago, Pharmaceutical Press, 2005. Las formulaciones también pueden incluir uno o más tampones, agentes estabilizantes, tensioactivos, agentes humectantes, agentes lubricantes, emulsionantes, agentes de suspensión, conservantes, antioxidantes, agentes opacificantes, emolientes, auxiliares de procesamiento, colorantes, edulcorantes, agentes perfumantes, agentes aromatizantes, diluyentes y otros aditivos conocidos para proporcionar una presentación elegante del fármaco (es decir, un compuesto de la presente invención o composición farmacéutica del mismo) o para ayudar en la fabricación del producto farmacéutico (es decir, medicamento).

Un ejemplo de una forma oral de dosificación adecuada es un comprimido que contiene aproximadamente 25 mg, 50 mg, 100 mg, 250 mg o 500 mg del compuesto de la invención compuesto con aproximadamente 90-30 mg de lactosa anhidra, aproximadamente 5-40 mg de croscarmelosa sódica, aproximadamente 5-30 mg de polivinilpirrolidona (PVP) K30, y aproximadamente 1-10 mg de estearato de magnesio. Los ingredientes en polvo primero se mezclan juntos y después se mezclan con una solución de PVP. La composición resultante puede secarse, granularse, mezclarse con el estearato de magnesio y comprimirse en una forma de comprimido usando equipos convencionales. Un ejemplo de una formulación de aerosol puede prepararse disolviendo el compuesto, por ejemplo 5-400 mg, de la invención en una solución tamponante adecuada, por ejemplo un tampón fosfato, añadiendo un tónico, por ejemplo una sal tal como cloruro sódico, si se desea. La solución puede filtrarse, por ejemplo, usando un filtro de 0,2 micrómetros, para retirar las impurezas y contaminantes.

Un ejemplo, por lo tanto, incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto, o un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Un ejemplo adicional incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto, o un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En el caso de un anticuerpo, el anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o sobre una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones diferentes, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas sobre varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento generalmente se sostendría hasta que suceda la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, puede administrarse una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) al paciente. Dichas dosis pueden administrarse de forma intermitente, por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga superior inicial, seguida de una o más dosis inferiores. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriores puede realizarse usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un antagonista de NRG.

Los antagonistas de NRG pueden usarse solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un antagonista de NRG puede co-administrarse con al menos un agente terapéutico adicional.

Un agente terapéutico adicional puede ser un agente que inhibe una vía de receptor tirosina quinasa. Como alternativa, el agente terapéutico adicional inhibe una vía HER. En una realización el agente terapéutico adicional es un inhibidor de EGFR, HER2, HER3, y/o HER4.

Como se usa en este documento, la expresión "inhibidor de EGFR" se refiere a compuestos que se unen a o interaccionan de otro modo directamente con EGFR y evitan o reducen su actividad de señalización, y se mencionan como alternativa como "antagonista de EGFR". Ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a EGFR. 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 Estados Unidos Nº 4.943.533, Mendelsohn et al.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano reconvertido (H225) (véase, el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo dirigido a EGFR completamente humano (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (patente de Estados Unidos Nº 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF o Panitumumab (véase el documento WO98/50433, Abgenix/Amgen); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo humanizado contra EGFR dirigido contra EGFR que compite con EGF y TGF-alfa por la unión a EGFR (EMD/Merck); anticuerpo contra EGFR humano, HuMax-EGFR (GenMab); 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); y mAb 806 o



mAb 806 humanizado (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR puede conjugarse con un agente citotóxico, generando de este modo un inmunocóncugado (véase, por ejemplo, el documento EP659.439A2, Merck Patent GmbH). Los antagonistas de EGFR incluyen moléculas pequeñas tales como compuestos descritos en las patentes de Estados Unidos N°: 5.616.582, 5.457.105, 5.475.001, 5.654.307, 5.679.683, 6.084.095, 6.265.410, 6.455.534, 6.521.620, 6.596.726, 6.713.484, 5.770.599, 6.140.332, 5.866.572, 6.399.602, 6.344.459, 6.602.863, 6.391.874, 6.344.455, 5.760.041, 6.002.008, y 5.747.498, así como las siguientes publicaciones PCT: WO98/14451, WO98/50038, WO99/09016, y WO99/24037. Antagonistas de EGFR de moléculas pequeñas particulares incluyen OSI-774 (CP-358774, erlotinib, TARCEVA® Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805 (CI 1033, 2-propenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[3-(4-morfolinil)propoxi]-6-quinazolinil]-, diclorhidrato, Pfizer Inc.); ZD1839, gefitinib (IRESSA™) 4-(3'-cloro-4'-fluoroanilino)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolina, AstraZeneca); ZM 105180 ((6-amino-4-(3-metilfenil-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-feniletil)amino]-1H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol); (R)-6-(4-hidroxifenil)-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-butenamida) (Wyeth); AG1478 (Pfizer); AG1571 (SU 5271; Pfizer); inhibidores duales de tirosina quinasa EGFR/HER2 tales como lapatinib (TYKERB®, GSK572016 o N-[3-cloro-4-[(3 fluorofenil) metoxi]fenil] 6[5[[[2metilsulfonil] etil] amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina; Glaxo-SmithKline).

Como se usa en este documento, la expresión "inhibidor de HER2" se refiere a compuestos que se unen o interaccionan de otro modo directamente con HER2 y evitan o reducen su actividad de señalización, y se mencionan como alternativa como "antagonista de HER2". Ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a HER2. Anticuerpos contra HER2 particulares incluyen pertuzumab y trastuzumab. Como se usa en este documento, la expresión "inhibidor de HER3" se refiere a compuestos que se unen o interaccionan de otro modo directamente con HER3 y evitan o reducen su actividad de señalización, y se mencionan como alternativa como "antagonista de HER3". Ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a HER3. Como se usa en este documento, la expresión "inhibidor de HER4" se refiere a compuestos que se unen o interaccionan de otro modo directamente con HER4 y evitan o reducen su actividad de señalización, y se mencionan como alternativa como "antagonista de HER4". Ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos y moléculas pequeñas que se unen a HER4.

Las publicaciones de patente relacionadas con anticuerpos contra HER incluyen: patente de Estados Unidos N° 5.677.171, patente de Estados Unidos N° 5.720.937, patente de Estados Unidos N° 5.720.954, patente de Estados Unidos N° 5.725.856, patente de Estados Unidos N° 5.770.195, patente de Estados Unidos N° 5.772.997, patente de Estados Unidos N° 6.165.464, patente de Estados Unidos N° 6.387.371, patente de Estados Unidos N° 6.399.063, documento US2002/019221A1, patente de Estados Unidos N° 6.015.567, patente de Estados Unidos N° 6.333.169, patente de Estados Unidos N° 4.968.603, patente de Estados Unidos N° 5.821.337, patente de Estados Unidos N° 6.054.297, patente de Estados Unidos N° 6.407.213, patente de Estados Unidos N° 6.719.971, patente de Estados Unidos N° 6.800.738, documento US2004/0236078A1, patente de Estados Unidos N° 5.648.237, patente de Estados Unidos N° 6.267.958, patente de Estados Unidos N° 6.685.940, patente de Estados Unidos N° 6.821.515, documento WO98/17797, patente de Estados Unidos N° 6.333.398, patente de Estados Unidos N° 6.797.814, patente de Estados Unidos N° 6.339.142, patente de Estados Unidos N° 6.417.335, patente de Estados Unidos N° 6.489.447, documento WO99/31140, documento US2003/0147884A1, documento US2003/0170234A1, documento US2005/0002928A1, patente de Estados Unidos N° 6.573.043, documento US2003/0152987A1, documento WO99/48527, documento US2002/0141993A1, documento WO01/00245, documento US2003/0086924, documento US2004/0013667A1, documento WO00/69460, documento WO01/00238, documento WO01/15730, patente de Estados Unidos N° 6.627.19681, patente de Estados Unidos N° 6.632.979B1, documento WO01/00244, documento US2002/0090662A1, documento WO01/89566, documento US2002/0064785, documento US2003/0134344, documento WO 04/24866, documento US2004/0082047, documento US2003/0175845A1, documento WO03/087131, documento US2003/0228663, documento WO2004/008099A2, documento US2004/0106161, documento WO2004/048525, documento US2004/0258685A1, patente de Estados Unidos N° 5.985.553, patente de Estados Unidos N° 5.747.261, patente de Estados Unidos N° 4.935.341, patente de Estados Unidos N° 5.401.638, patente de Estados Unidos N° 5.604.107, documento WO 87/07646, documento WO 89/10412, documento WO 91/05264, documento EP 412.116 B1, documento EP 494.135 B1, patente de Estados Unidos N° 5.824.311, documento EP 444.181 B1, documento EP 1.006.194 A2, documento US 2002/0155527A1, documento WO 91/02062, patente de Estados Unidos N° 5.571.894, patente de Estados Unidos N° 5.939.531, documento EP 502.812 B1, documento WO 93/03741, documento EP 554.441 B1, documento EP 656.367 A1, patente de Estados Unidos N° 5.288.477, patente de Estados Unidos N° 5.514.554, patente de Estados Unidos N° 5.587.458, documento WO 93/12220, documento WO 93/16185, patente de Estados Unidos N° 5.877.305, documento WO 93/21319, documento WO 93/21232, patente de Estados Unidos N° 5.856.089, documento WO 94/22478, patente de Estados Unidos N° 5.910.486, patente de Estados Unidos N° 6.028.059, documento WO 96/07321, patente de Estados Unidos N° 5.804.396, patente de Estados Unidos N° 5.846.749, documento EP 711.565, documento WO 96/16673, patente de Estados Unidos N° 5.783.404, patente de Estados Unidos N° 5.977.322, patente de Estados Unidos N° 6.512.097, documento WO 97/00271, patente de Estados Unidos N° 6.270.765, patente de Estados Unidos N° 6.395.272, patente de Estados Unidos N° 5.837.243, documento WO 96/40789, patente de Estados Unidos N° 5.783.186, patente de Estados Unidos N° 6.458.356, documento WO 97/20858, documento WO

97/38731, patente de Estados Unidos Nº 6.214.388, patente de Estados Unidos Nº 5.925.519, documento WO 98/02463, patente de Estados Unidos Nº 5.922.845, documento WO 98/18489, documento WO 98/33914, patente de Estados Unidos Nº 5.994.071, documento WO 98/45479, patente de Estados Unidos Nº 6.358.682 B1, documento US 2003/0059790, documento WO 99/55367, documento WO 01/20033, documento US 2002/0076695 A1, documento WO 00/78347, documento WO 01/09187, documento WO 01/21192, documento WO 01/32155, documento WO 01/53354, documento WO 01/56604, documento WO 01/76630, documento WO02/05791, documento WO 02/11677, patente de Estados Unidos Nº 6.582.919, documento US2002/0192652A1, documento US 2003/0211530A1, documento WO 02/44413, documento US 2002/0142328, patente de Estados Unidos Nº 6.602.670 B2, documento WO 02/45653, documento WO 02/055106, documento US 2003/0152572, documento US 2003/0165840, documento WO 02/087619, documento WO 03/006509, documento WO03/012072, documento WO 03/028638, documento US 2003/0068318, documento WO 03/041736, documento EP 1.357.132, documento US 2003/0202973, documento US 2004/0138160, patente de Estados Unidos Nº 5.705.157, patente de Estados Unidos Nº 6.123.939, documento EP 616.812 B1, documento US 2003/0103973, documento US 2003/0108545, patente de Estados Unidos Nº 6.403.630 B1, documento WO 00/61145, documento WO 00/61185, patente de Estados Unidos Nº 6.333.348 B1, documento WO 01/05425, documento WO 01/64246, documento US 2003/0022918, documento US 2002/0051785 A1, patente de Estados Unidos Nº 6.767.541, documento WO 01/76586, documento US 2003/0144252, documento WO 01/87336, documento US 2002/0031515 A1, documento WO 01/87334, documento WO 02/05791, documento WO 02/09754, documento US 2003/0157097, documento US 2002/0076408, documento WO 02/055106, documento WO 02/070008, documento WO 02/089842, documento WO 03/86467, y documento US 2010/0255010.

Un agente terapéutico adicional puede ser un agente quimioterapéutico. Un "agente quimioterapéutico" se refiere a un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®); alquil sulfonatos tales busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacina; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAM-TIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptofcinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiastatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como antibióticos enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omega11 (véase, por ejemplo, Nicolaou et al., Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); CDP323, un inhibidor oral de integrina alfa-4; dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo neocarzinostatina y cromóforos relacionados de antibiótico de cromoproteína enediina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-nor-leucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección en liposomas de doxorubicina HCl (DOXIL®), doxorubicina liposómica TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposómica pegilada (CAELYX®), y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona, y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; pirógenos tales como ácido calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguanina; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espiro-germanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación nanoparticulada modificada por albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™), y docetaxel (TAXOTERE®); cloranbucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; agentes de platino tales como cisplatino, oxaliplatino (por ejemplo, ELOXATIN®), y carboplatino; vincas, que evitan que la polimerización de tubulina forme microtúbulos, incluyendo vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®), vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), y vinorelbina (NAVELBINE®); etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovorina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de

topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, incluyendo bexaroteno (TARGRETIN®); bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®), o risedronato (ACTONEL®); troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolano nucleosídico de citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib o etoricoxib), inhibidor del proteosoma (por ejemplo, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); oafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 tal como oblimersen sódico (GENASENSE®); pixantrona; inhibidores de EGFR (véase la siguiente definición); inhibidores de tirosina quinasa (véase la siguiente definición); inhibidores de serina-treonina quinasa tales como rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®); inhibidores de farnesiltransferasa tales como lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); y sales farmacéuticamente aceptables, ácido o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona; y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

Los agentes quimioterapéuticos definidos en este documento incluyen "agentes anti-hormonales" o "agentes terapéuticos endocrinos" que actúan regulando, reduciendo, bloqueando, o inhibiendo los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento de cáncer. Pueden ser hormonas en sí mismas, incluyendo, aunque sin limitación: anti-estrógenos con perfil agonista/antagonista mixto, incluyendo, tamoxifeno (NOLVADEX®), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON®), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVIS-TA®), trioxifeno, keoxifeno, y moduladores del receptor selectivo de estrógenos (SERM) tales como SERM3; anti-estrógenos puros sin propiedades agonistas, tales como fulvestrant (FASLODEX®), y EM800 (dichos agentes pueden bloquear la dimerización del receptor de estrógenos (ER), inhibir la unión de ADN, aumentar el recambio de ER, y/o suprimir los niveles de ER); inhibidores de aromatasa, incluyendo inhibidores esteroideos de aromatasa tales como formestano y exemestano (AROMASIN®), y inhibidores no esteroideos de aromatasa tales como anastrozol (ARIMIDEX®), letrozol (FEMARA®) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de aromatasa incluyen vorozol (RIVISOR®), acetato de megestrol (MEGASE®), fadrozol, y 4(5)-imidazoles; agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante, incluyendo leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), goserelina, buserelina, y triptorelina; esteroides sexuales, incluyendo progestinas tales como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, estrógenos tales como dietilstilbestrol y premarina, y andrógenos/retinoides tales como fluoximasterona, ácido todo transretinico y fenretinida; onapristona; anti-progesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores.

Dicha terapia de combinación también incluye: (i) inhibidores de lípido quinasa; (ii) oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; (iii) ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; (iv) vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; (v) agentes anti-angiogénicos tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o formulaciones diferentes), y administración separada, en cuyo caso, la administración del antagonista de NRG puede suceder antes de, simultáneamente, y/o después de, la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Los antagonistas de NRG también pueden usarse en combinación con radioterapia.

#### D. Artículos de fabricación

Es útil un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente aloja una composición que es por sí misma o combinada con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, donde la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, donde la composición

comprende un agente citotóxico adicional o agente terapéutico de otro modo. El artículo de fabricación en esta realización puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. Alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyección bacteriostática (BWF), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

### III. Ejemplos

#### Ejemplo 1: Métodos

##### Líneas celulares

Se obtuvieron líneas celulares NSCLC Calu3, H441, H1299, H1993, A549 y H596, y KPL4 de cáncer de mama de la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA. Estas líneas celulares se mantuvieron en RPMI que contenía FBS al 10 %, Pen/Estrep y L-Glutamina. Calu3 se cultivó en medio ATCC en lugar de RPMI. Las líneas celulares Calu3, H441 y KPL4 se transdujeron con lentivirus TZV-b-actina-eGFP. Después de múltiples pases, se clasificaron células de elevada expresión de GFP y se amplificaron para obtener células ~95 % GFP positivas, y estas sub-líneas se describieron como Calu3-GFP y H441-GFP y KPL4-GFP. Las líneas celulares NSCLC de ratón LKPH1 y LKPH2 se obtuvieron de dos tumores independientes de un ratón que albergaba tumor pulmonar Kras<sup>LSL-G12D/+</sup>; p53<sup>FL/+</sup>; Z/EG. Las líneas celulares se establecieron inicialmente en medio DMEM/F12 que contenía FBS al 5 %, extracto de pituitaria bovina, suplemento N2, EGF, FGF, Pcn/Estrep y L-Glutamina. LKPH1 y LKPH2 se cultivaron en medio DMEM de elevado contenido en glucosa que contenía FBS al 10 %, Pen/Estrep y L-Glutamina. **Lentivirus ARNhp inducible:** Los oligonucleótidos de horquilla usados en este estudio son los siguientes:

**shNRG1:** 5'- GATCCCCCATGGTGAACATAGCGAATTTCAAGAGAA TCGCTATGTTCCACCATGTTTTTTGGAAA-3' (con sentido) (SEC ID N° 1)

y

5'- AGCTTTTCC AAAAAACATGGTGAACAT AGC GAATTCTCTTGAAATTCGCTATGTTTAC CATGGGG-3' (antisentido) (SEC ID N° 2),

**shNRG1.2:** 5'-GATCCCCGAGTATATGTGCAAAGTGAT TCAAGAGATCAC TTTG CACATATACTCTTTTTTGGAAA-3' (con sentido) (SEC ID N° 3)

y

5' -AGCTTTTCCAAAAAAGAGTATATGTGCAAAGTGATCTCTTGAATCACTTTGC A CATATACTCGGG-3' (antisentido) (SEC ID N° 4).

**shErbB4:** 5'- GATCCCCGATCACAACTGCTGCTTAATTCAAGAGATTAAGCAGCAGTTGT GATCTTTTTTGGAAA-3" (con sentido) (SEC ID N° 5)

y

5' AGCTTTTCCAAAAAAGATCACAACTGCTGCTTAATCTCTTGA ATTAAGCAGCAGTT GTGATCGGG-3' (antisentido) (SEC ID N° 6).

**shErbB3:** 5'-GATCCCCAAGAGGATGTCAACGGTTATTCAAGAGATAACCGTTGACATCCTCTTTTTTTTG GAAA-3' (con sentido) (SEC ID N° 7)

y

5'-AGCTTTTCCAAAAAAGAGGATGTCAACGGTTATCTCTTGAATAACCGTT GACATCCTCTTGGG-3' (antisentido) (SEC ID N° 8).

**shNRG1 de ratón:** 5'- GATCCCCCATGGTGAACATAGCGAATTTCA AGAGAA TCGCTATGTTCCACCATGTTTTTTGGAAA-3' (con sentido) (SEC ID N° 9)

y

5'- AGCTTTTCC AAAAAACATGGTGAACATAGC GAATTCTCTTGAAATTCG CTATGTTTAC CATGGGG-3" (antisentido) (SEC ID N° 10).

Los oligonucleótidos ARNhp bicatenarios complementarios se insertaron en un vector de transferencia génica vital inducible por Tet como se ha descrito (Hoeflich et al. Cancer Res. 2006). El sistema de vector está compuesto por un vector lanzadera y una estructura de vector viral que expresa dsRed que contiene un casete de codones optimizados represor Tet-sitio de entrada interna al ribosoma-dsRed para posibilitar la expresión de ARNhp regulada por Tet. La construcción ARNhp de luciferasa se ha descrito previamente (Hoeflich et al.).

Empaquetamiento viral y generación de línea celular: Se prepararon construcciones de lentivirus que albergan ARNhp inducible basándose en métodos descritos previamente por co-transfección de construcciones pHUSH-Lenti-dsRed que contienen un ARNhp deseado con plásmidos que expresan la glucoproteína de envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) y proteínas de empaquetamiento de HLV-1 (GAG-POL) en células HEK293T usando Lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células diana se transdujeron con estos virus. Después de >3 pases, se usó clasificación FACS para seleccionar las primeras ~20 % de células tumorales que expresan dsRed que se recogieron, combinaron y expandieron.

**Estudios in vitro:** Para inducir la expresión de ARNhp, se cultivaron líneas celulares estables que albergaban shNRG1 inducible por doxyciclina o shLuciferasa en 1 µg/ml de doxyciclina durante un total de 6 días. El primer día de inducción las células se cultivaron en FBS al 10 %, seguido de una titulación de FBS sobre el transcurso de 4 días más. Las células después se privaron completamente de suero durante las últimas 6 horas de crecimiento. Las células después se procesaron por extracción de ARN o transferencia de western. Para estudios de HER4ECD en líneas celulares de tumor pulmonar de ratón, se cultivaron células LKPH en condiciones privadas de suero durante 24 horas antes de la adición de HER4ECD a una concentración de 2 mg/ml. Las células LKPH después se incubaron durante otras 48 horas antes de procesamiento por transferencia de Western. La adición de NRG1 exógena en células H441 se realizó del siguiente modo: las células H441 se privaron de suero durante 18 horas antes de la adición de dominio extracelular de NRG1 beta-1 humano recombinante 1 µM (R&D systems) o IgG2A anti-ragweed 1 µM como control. Diez minutos después de la adición de NRG1 o ragweed, las células se procesaron por transferencia de Western.

**Aislamiento de ARN, preparación de ADNc y qPCR:** El ARN se aisló usando el kit Qiagen RNeasy Micro. El ADN complementario se preparó a partir del ARN total usando el kit de alta fidelidad ABI de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinó la expresión de NRG1alfa, NRG1beta, HER3, HER4 usando cebadores/sonda específicos de gen ABI por PCR cuantitativa a tiempo real (ABI 7500). La expresión génica se normalizó usando genes constitutivos GAPDH o RAB14.

**Estudios de tumor de xenoinjerto in vivo:** Se transplantaron células tumorales (10-20 millones) en el costado derecho de ratones desnudos atímicos. Cuando el tamaño del tumor alcanzó ~200 mm<sup>3</sup>, los ratones se dividieron en diferentes grupos de tratamiento. Después los ratones se trataron con vehículo o quimioterapia (paclitaxel, i.v. + cisplatino, i.p.) para los estudios iniciales. El régimen de dosificación de quimioterapia fue paclitaxel 20 mg/kg i.v. en días alternos durante 5 dosis y cisplatino 5 mg/kg i.p. en los días 1 y 7 para el modelo Calu3 y los días 1 y 14 para el modelo H441. Se recogieron los tumores en regresión y los controles de vehículo de tiempo coincidente al menos 1 semana después de la última dosis de quimio. Los tumores se disociaron usando dispasa/colagenasa y las muestras se clasificaron en FACS para recoger las células tumorales GFP positivas. Para los estudios knockdown de NRG1, los grupos de tratamiento fueron: sacarosa, doxyciclina (dox), quimioterapia + sacarosa, y quimioterapia+ doxyciclina. El tratamiento con sacarosa o doxyciclina se inició al mismo tiempo que la primera dosis de quimioterapia y continuó mientras duró el estudio. Se proporcionó agua con sacarosa al 5 % ad libitum para los grupos de vehículo y se proporcionó 1 mg/ml de doxyciclina en sacarosa al 5 % para los grupos de doxyciclina.

**Análisis de crecimiento de tumor de xenoinjerto:** Para analizar apropiadamente la medición repetida de los volúmenes de los tumores a partir de los mismos animales en el tiempo, se usó un enfoque de modelado mixto (Pinheiro et al. 2009). Este enfoque puede abordar tanto mediciones repetidas como tasas de abandono modestas debido a la terminación no relacionada con el tratamiento de animales antes del final del estudio. Se usaron splines de regresión cúbica para ajustar un perfil no lineal a los cursos de tiempo de log2 volumen del tumor para cada grupo de tratamiento.

**Estudio LSL-K-ras<sup>G12D</sup>;p53<sup>Fli+</sup> y LSL-K-ras<sup>G12D</sup>;p53<sup>Fli/Fli</sup> Her4ECD in vivo:** LSL-K-ras<sup>G12D</sup>;p53<sup>Fli+</sup> se infectaron con virus Adeno-Cre y se dejaron envejecer durante 16 semanas después de la inducción del tumor. Se realizaron exploraciones CT iniciales a las 16 semanas después de la inducción del tumor (día 0 del estudio) y los ratones se agruparon de modo que fuera igual el volumen promedio del tumor de partida por grupo. A los ratones se les dosificó una vez a la semana durante tres semanas con cisplatino (7 mg/kg) o solución salina tamponada con fosfato, y bi-semanalmente con HER4ECD-Fc (25 mg/kg) o IgG2A anti-ragweed (25 mg/kg) mientras duró el estudio. Se realizaron exploraciones CT en serie en los días 14, 45, y 66.

**Micro-tomografía computada de rayos X (micro-CT):** Se utilizaron dos sistemas de micro-CT (vivaCT 40 y vivaCT 75, Scanco Medical, Suiza) para imágenes longitudinales de pulmón. Los animales se aleatorizaron entre sistemas de micro-CT y se volvieron a explorar en el mismo sistema usado para las imágenes iniciales. Los datos se adquirieron a 38 µm (vivaCT 40) o 50 µm (vivaCT 75) de tamaño de vóxeles isotrópicos, 1000 proyecciones, 250 ms (vivaCT 40) o 200 ms (vivaCT 75) de tiempo de integración, 45 keV de energía de fotones, y 177 mA de corriente. Mientras duraron las imágenes *in-vivo*, los animales se anestesiaron con isoflurano al 2 % en aire médico y se mantuvieron a temperatura constante de 37 °C por flujo de aire caliente regulado. El tiempo de imágenes para cada sesión fue de aproximadamente 15 minutos (vivaCT 75) o 25 minutos (vivaCT 40) por animal y la dosis de radiación estimada fue de aproximadamente 0,2 Gy (vivaCT 75) o 0,1 Gy (vivaCT 40). Los datos de las imágenes se evaluaron en el plano coronal usando el paquete de software de análisis de imágenes Analyze (AnalyzeDirect, Inc., Lenexa, KS, EEUU). Una vez se identificó el plano transversal más grande de cada tumor, se determinaron estimaciones del diámetro máximo del tumor (d<sub>1</sub>) y el diámetro perpendicular más grande (d<sub>2</sub>). La carga tumoral total

se calculó como la suma del producto cruzado de las estimaciones direccionales ( $d_1 \times d_2$ ) de todos los tumores. Los análisis de tumor por micro-CT *in-vivo* se validaron previamente y se descubrió que se correlacionaban bien con el volumen total del tumor determinado por análisis de microCT *ex-vivo* (Singh et al., 2010).

**Análisis de microerie:** La cantidad de ARN total usada en el protocolo de amplificación T7 de dos rondas varió de 10 ng a 50 ng por muestra. La primera ronda de amplificación y la segunda ronda de síntesis de ADNc se hicieron usando el kit Message Amp II aRNA Amplification (Applied Biosystems, Foster City, CA). Después se incorporó colorante Cy5 a través de una reacción IVT usando kit Quick Amp Labeling de Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Cada muestra de ensayo marcada con Cy5 se combinó con ARN de referencia humano universal marcado con Cy3 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) y se hibridó en series Whole Human Genome 4x44K de Agilent como se describe en el protocolo del fabricante. Las series se lavaron, se secaron y se exploraron en un escáner de microserie de ADN de Agilent. Se usó el software Feature Extraction 9.5 de Agilent para analizar las imágenes de la serie adquiridas y se obtuvieron las proporciones log2 individuales de las intensidades de señal de fondo sustraído. Se realizó un ensayo Cybert-T modificado (Baldi y Long, 2001) para comparar los perfiles de expresión entre los grupos tratados con vehículo y quimioterapia. Se aplicó una tasa de falso descubrimiento (valor q) para múltiples correcciones de ensayo (Storey y Tibshirani, 2003)

ARNip: las combinaciones de oligos ARN interferentes pequeños (ARNip) para HER3 (M-003127-03), HER1 (M-003114-01), HER2, HER4 y control no dirigido (D-001206-14-20) se adquirieron en Dharmacon Lafayette, CO. Los ARNips se introdujeron en células H522 por transfección inversa. Se sembraron células/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían una mezcla pre-incubada de oligos ARNi combinados a 50 mmol/l y reactivo de transfección DharmaFECT# (T-2001-02, Dharmacon) diluido en OPTI-MEM (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. Unas 96 horas después de la transfección, se midió el efecto sobre la proliferación celular por tinción con AlamarBlue.

**Transferencia de Western:** Para transferencias de Western de cultivo celular *in vitro*, se lavaron células adherentes tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada en hielo 1x y se lisaron en tampón RIPA (Pierce Biotechnology), inhibidor de proteasa Halt, y cóctel de inhibidor de fosfatase Halt (Thermo Scientific). El lisado se recogió, se homogeneizó, y se aclaró por centrifugación durante 10 minutos. Se prepararon lisados tumorales de ratón primarios como se ha indicado anteriormente, sin los lavados con PBS. Las proteínas del sobrenadante se fraccionaron en un gel NuPAGE Novex bis-tris al 4-12 % (Invitrogen). La transferencia se realizó usando el sistema de transferencia en seco iBlot (Invitrogen) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se realizó bloqueo de la membrana de nitrocelulosa y tinción con anticuerpo usando el análisis de transferencia de Western Odyssey y el sistema de imágenes infrarrojas (Li-Cor Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las transferencias se visualizaron en el escáner Odyssey (Li-Cor Biosciences).

**Anticuerpos:** Se usaron los siguientes anticuerpos primarios en experimentos de transferencia de Western: anti-actina (612656, BD Biosciences), anti-GAPDH (sc-25778, Santa Cruz Biotechnology), anti-receptor de EGF(2232, Cell Signaling Technology), anti-Neu (sc-284, Santa Cruz Biotechnology), anti-ErbB3 (sc-285, Santa Cruz Biotechnology), anti-fosfo-HER3 (4791, Cell Signaling Technology), anti-ErbB4 (sc-283, Santa Cruz Biotechnology), anti-fosfo-HER4 (4757, Cell Signaling Technology), anti-Akt (4691, Cell Signaling Technology), anti-fosfo-Akt (4058, Cell Signaling Technology), kit de muestra de anticuerpo Stat/fosfo-Stat (9939/9914, Cell Signaling Technology), anti-MEK 1/ 2 (9126, Cell Signaling Technology), anti-fosfo-MEK 1/ 2 (2338, Cell Signaling Technology). Se usaron los siguientes anticuerpos secundarios de Li-Cor Biosciences: de cabra anti-IgG de ratón conjugado con IRDye 680, de cabra anti-IgG de conejo conjugado con IRDye 800 CW.

## Ejemplo 2: Optimización de modelos *in vivo* para el estudio de enfermedad residual y recaída

Se generaron varios modelos de cáncer que muestran regresión significativa en respuesta a quimioterapia seguida de recaída del tumor después de cesar la terapia (Fig. 1) y se usaron para estudiar las células que son responsables del reinicio del tumor. Estas células son células reiniciadoras de tumor (TRIC). Para generar los modelos, se transplantaron células tumorales humanas marcadas con GFP por vía subcutánea, y cuando el tamaño del tumor alcanzó ~200 mm<sup>3</sup>, los ratones se trataron con vehículo o quimioterapia como se muestra en los respectivos modelos. Las células tumorales GFP+ se aislaron de los tumores en regresión o tratados con vehículo por clasificación FACS después de digestión enzimática y disociación. Los tumores se recogieron un mínimo de una semana después de la última dosis de quimioterapia y antes de la reanudación del crecimiento tumoral.

Se transplantaron sublíneas que expresan GFP de las líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) humano Calu3 y H441 en ratones desnudos atímicos para generar los modelos de xenoinjerto. Para el modelo Calu3, la quimioterapia consistía en paclitaxel (20 mg/kg, i.v. en días alternos durante 5 dosis) y cisplatino (5 mg/kg, i.p. cada 7 días durante 2 dosis). Fig. 2A (datos presentados como volumen medio del tumor  $\pm$  ETM, n=15/grupo). Para el modelo H441, la quimioterapia consistía en paclitaxel (20 mg/kg, i.v. en días alternos durante 5 dosis) y cisplatino (5 mg/kg, i.p. cada 14 días durante 2 dosis). Fig. 2B (datos presentados como volumen medio del tumor  $\pm$  ETM, n=9/grupo para tratados con vehículo y n=14/grupo para tratados con quimioterapia).

Las sublíneas que expresan GFP de la línea celular de cáncer de mama humano KPL4 se transplantaron de forma ortotrópica a la almohadilla de grasa mamaria de ratones SCID/beiz. Para el modelo KPL4, la quimioterapia consistía en Paclitaxel (20 mg/kg, i.v. en días alternos durante 5 dosis). Fig. 2C (datos presentados como volumen medio del tumor  $\pm$  ETM, n=12 ratones/grupo).

Después de completarse el régimen de quimioterapia, los tumores de ratones tratados con quimio eran significativamente más pequeños que los de ratones tratados con vehículo. La regresión persistió durante varias semanas después de la última dosis de quimioterapia pero los tumores posteriormente recayeron. Fig. 2A-C.

Además, se cruzó el modelo de ratón modificado por ingería genérica *LSL-K-ras<sup>G12D</sup>* de NSCLC (Jackson et al., 2001) con la cepa Z/EG Cre-indicador (Novak et al., 2000) y se usó en este estudio. Se inició cisplatino (7 mg/kg i.p. cada 7 días durante 3 dosis) 12 semanas después de la infección AdenoCre de los pulmones (es decir, inicio del tumor). Los pulmones se recogieron 1 semana después de la última dosis de quimioterapia y las células tumorales se aislaron por FACS después de digestión enzimática y disociación. El análisis FACS de las células tumorales GFP-positivas presentes en el pulmón una semana después de la dosis final de cisplatino reveló una disminución significativa en la cantidad de células tumorales en los ratones tratados con cisplatino en comparación con los controles de vehículo. Fig. 2D (datos presentados como la cantidad promedio de células GFP positivas por pulmón  $\pm$  ETM, n=6/grupo). Por tanto, el tratamiento con cisplatino de los ratones *LSL-K-ras<sup>G12D</sup>* provocó una reducción significativa en la carga tumoral, pero no provoca supervivencia prolongada, lo que indica que los tumores recaen después de terapia (Oliver et al., 2010).

Aunque cada uno de los modelos descritos anteriormente respondió a quimioterapia, los tumores recayeron en momentos variables después de la terapia, a pesar de la cito-reducción casi completa. Las células marcadas con GFP que sobrevivieron a la quimioterapia antes del inicio del re-crecimiento del tumor contienen las TRIC y se aislaron para estudio adicional.

### Ejemplo 3 Enriquecimiento de NRG1 en TRIC

Basándose en las curvas de crecimiento predeterminadas para cada modelo, se recogieron tumores en regresión o tratados con vehículo entre 1-3 semanas después del último tratamiento, pero antes de la aparición de recurrencia de los tumores tratados con quimioterapia. El tejido tumoral se digirió enzimáticamente y se disoció y las células tumorales GFP positivas se aislaron por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Para caracterizar las diferencias en los perfiles de expresión génica de células tumorales tratadas con vehículo y residuales, se aisló el ARN de las células tumorales (PI<sup>-</sup> y GFP<sup>+</sup>), y se realizó el perfilado de expresión. El análisis de microserie de ambos modelos Calu3 y H441 reveló que la expresión de NRG1 era significativamente mayor en células tumorales residuales tratadas con quimio en comparación con células tumorales tratadas con vehículo (Fig. 3A-B). El enriquecimiento en células tratadas con quimio residuales se determinó usando dos sondas independientes de microserie. Para el modelo de xenoinjerto Calu3, se midió un enriquecimiento de 8,6 veces, (p=0,003, q=0,003) usando la primera sonda (Fig. 3A, panel de microserie de la izquierda) y se midió un enriquecimiento de 5,3 veces (p=0,001, q=0,002 (n=8/grupo)) usando la segunda sonda (Fig. 3A, panel de microserie de la derecha). Para el modelo de xenoinjerto H441, se determinó un enriquecimiento de 4,9 veces (p<0,001, q=0,009) usando la primera sonda ((Fig. 3B, panel de microserie de la izquierda)) y se determinó un enriquecimiento de 2,8 veces (p=0,001, q=0,013 (n=8/grupo)) usando la segunda sonda ((Fig. 3B, panel de microserie de la derecha)).

Debido al corte y ajuste alternativo existe dos isoformas activas del dominio tipo EGF de NRG1 que es necesario para la unión al receptor, mencionado como NRG1alfa (NRG1 $\alpha$ ) y NRG1beta (NRG1 $\beta$ ). Se confirmó el enriquecimiento de NRG1 $\alpha$  y NRG1 $\beta$  por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) (Fig. 3A-B). Para el modelo de xenoinjerto Calu3, la expresión de NRG1 $\alpha$  estuvo enriquecida 4,7 veces (p=0,02) (Fig. 3A, panel de qPCR de la izquierda) y de NRG1 $\beta$  estuvo enriquecida 3,4 veces (p=0,04) (Fig. 3A, panel de qPCR de la derecha) (n=6/grupo) usando muestras independientes de tumor. Para el modelo de xenoinjerto H441, NRG1 $\alpha$  estuvo enriquecido 11,4 veces (Fig. 3B, panel de qPCR de la izquierda) y NRG1 $\beta$  estuvo enriquecido 12,1 veces (Fig. 3B, panel de qPCR de la derecha) usando las mismas muestras de tumor que el análisis de microserie.

El ARNm de NRG1 estaba enriquecido en TRIC del modelo de xenoinjerto de cáncer de mama KPL4. El enriquecimiento se determinó usando dos sondas de microserie independientes (Fig. 3C).

Para el modelo *LSL-K-ras<sup>G12D</sup>*, la expresión de NRG1 fue significativamente mayor en células tumorales residuales tratadas con quimio frente a células tumorales tratadas con vehículo a granel basándose en la microserie. Se determinó un enriquecimiento de 13,7 veces (p<0,001, q=1) (n=6/grupo) usando análisis de microserie (Fig. 3D, panel de microserie). El enriquecimiento se validó por qPCR sobre muestras independientes que muestran un enriquecimiento de 9 veces (p=0,04) (Fig. 3D, panel qPCR).

NRG1 fue uno de los pocos genes significativamente enriquecidos en las células tratadas residuales en los 3 modelos, Calu3, H441 y *LSL-K-ras<sup>G12D</sup>*. De forma interesante, la expresión ni del receptor HER3 ni HER4 estuvo enriquecida de forma coherente en todos los modelos.

Se tuvo acceso a la activación del receptor de NRG1, HER3, por inmunotinción de tumores para fosfo-HER3. La mayoría de las células tumorales en los tumores residuales eran p-HER3 positivas mientras que los tumores

tratados con vehículo mostraron grupos solamente dispersos de células p-HER3 positivas. La expresión del otro ligando de HER3, NRG2, no se encontró en células tumorales residuales. Por tanto, las células tumorales residuales expresan NRG1 y muestran activación potenciada del receptor, lo que demuestra actividad autocrina NRG1 aumentada.

#### Ejemplo 4 - Regulación de la expresión de NRG1

La expresión aumentada de NRG1 observada en las células tumorales residuales pudo resultar de un enriquecimiento de una subpoblación que expresa NRG1 de células presentes en el tumor primario. Como alternativa, la quimioterapia puede inducir expresión de NRG1 en células que después son resistentes a sus efectos citotóxicos, o los niveles de expresión podrían verse influidos por el tamaño del tumor o la cinética de crecimiento. Para distinguir entre estas posibilidades, se evaluaron los niveles de expresión de NRG1 en tumores de diferentes volúmenes y en diversos momentos después de quimioterapia por qPCR (Fig. 4). Los niveles de ARNm de NRG1 no aumentaba después de una única dosis de quimioterapia (cisplatino + paclitaxel). De hecho, con la excepción de los tumores residuales, los niveles de NRG1 fueron equivalentes en todos los momentos y volúmenes ensayados. Estos resultados demuestran que la expresión de NRG1 no está inducida por quimioterapia o influenciada por el tamaño del tumor, y son coherentes con el enriquecimiento de una subpoblación pre-existente de células que expresan NRG1.

#### Ejemplo 5 - Señalización autocrina de NRG1-HER en NSCLC

Para identificar modelos que co-expresan tanto el ligando como sus receptores, se examinó la expresión de NRG1 y sus receptores en las células Calu3 y H441 precursoras así como un panel de líneas celulares NSCLC humanas adicionales. Aunque los niveles de expresión de transcritos de NRG1 $\alpha$  y NRG1 $\beta$  eran heterogéneos entre líneas celulares, eran mucho mayores en la mayoría de las líneas celulares en comparación con pulmón normal. Sorprendentemente, en las células H441, el transcrito de NRG1 estaba presente solamente cuando las células crecían como tumores *in vivo*. Las células H441 cultivadas no expresaban transcritos detectables de NRG1 $\alpha$  o NRG1 $\beta$ , poniendo de relieve las diferencias en las propiedades de las células crecidas *in vitro* e *in vivo*. El análisis de Western de los cuatro receptores HER reveló expresión heterogénea entre las 6 líneas NSCLC humanas. Calu3 tuvo el mayor nivel de expresión *in vitro* para los cuatro receptores con relación a otras líneas celulares.

Para evaluar los posibles mediadores corriente abajo de la señalización autocrina NRG1, se generaron sub-líneas estables de las líneas celulares precursoras Calu3, H441 y H1299 que portan un ARNhp inducible por doxiciclina (Gray et al., 2007) para NRG1 (shNRG1) y un gen indicador dsRED expresado de forma constitutiva. El gen *NRG-1* contiene múltiples promotores y experimenta corte y ajuste alternativo extensivo que produce 15 diferentes isoformas. Todas las isoformas activas contienen un dominio tipo EGF que es necesario y suficiente para la actividad de RTK (Holmes et al., 1992; Yarden y Peles, 1991). El shNRG1 se dirigió al dominio tipo EGF común para posibilitar la reducción de todos los posibles isotipos. Se generaron líneas celulares estables coincidentes con ARNhp inducible por doxiciclina para Luciferasa (shLuc) como controles. Hubo una reducción eficaz y específica de los transcritos de NRG1 $\alpha$  y NRG1 $\beta$  (~90 %) solamente en las células Calu3-shNRG1 cuando se cultivaron en presencia de doxiciclina (dox). Se midió una disminución asociada en los niveles de p-HER3, p-AKT y una ligera disminución en p-HER4 en células Calu3-shNRG1 privadas de suero cultivadas en presencia de dox. No hubo cambios detectables en los niveles de p-Stat3 o p-Mek1/2 en estos lisados.

Como las células H441 no expresaban ningún transcrito de NRG1 *in vitro*, se evaluaron los mediadores de la señalización NRG1 en estas células por estimulación con ligando NRG1 exógeno. Tras estimulación con NRG1 de células privadas de suero, hubo un aumento en p-HER3 y p-AKT. No hubo cambios detectables en los niveles de p-Stat3 o p-Mek1/2.

También se evaluaron las vías efectoras NRG1 en células cancerosas de pulmón murino. Se obtuvieron dos líneas celulares independientes de tumores de pulmón *LSL-K-ras<sup>G12D</sup>;p53<sup>Fli+</sup>*, LKPH1 y LKPH2 y se mencionaron de forma colectiva como líneas LKPH (véase el Ejemplo 1). Se generaron sublíneas estables que portaban shNrg1 o shLuc inducible por dox. Se observó transcrito disminuido de Nrg1 solamente en las líneas celulares LKPH shNrg1 en presencia de dox. Además, hubo una disminución en los niveles de p-HER3 y p-AKT en células LKPH-shNRG1 privadas de suero cultivadas en presencia de dox. No fueron detectables cambios en los niveles de p-Mek1/2 y p-Stat3 en cultivos que carecían de ARNm de Nrg1 por transferencia de western, lo que sugiere que estas vías efectoras no estaban comprometidas por Nrg1.

Juntos, los datos de la estimulación con NRG1 de células H441 y knockdown de NRG1 en células Calu3 y LKPH1/2 sugieren que la vía PI3K es un efectos corriente abajo principal de la señalización NRG1 en células NSCLC. La expresión aumentada de transcritos de NRG1 y receptores HER tanto en modelos humanos como de NSCLC de ratón y la actividad disminuida de la señalización de HER3 en células tumorales cultivadas tras el NRG1 knockdown sugiere que hay un bucle de señalización autocrino NRG1-HER3 en NSCLC. Además, su expresión aumentada en células tumorales residuales (Fig. 3) sugiere que la señalización autocrina de NRG1 puede desempeñar un papel en quimiorresistencia y/o recaída de la enfermedad.



**Ejemplo 6 - El knockdown de NRG1 retarda la Recaída del tumor después de quimioterapia**

Los efectos del knockdown de NRG1 sobre el crecimiento de tumor primario y la recaída después de quimioterapia se determinaron evaluando los efectos del knockdown de NRG1 solo o en combinación con quimioterapia. Se usaron tres modelos NSCLC humanos que muestran patrones variables de expresión de los receptores de la familia HER en este estudio. El modelo Calu3 tiene los mayores niveles de proteínas de todos los receptores, H441 muestra fuerte expresión de HER2 y HER3 y moderada de HER1, y H1299 muestra niveles moderados de HER1, 2 y 3.

Para determinar la eficacia del direccionamiento NRG1 en el modelo Calu3, se asignaron ratones que albergan tumor Calu3-shNRG1 a cuatro grupos; 1) vehículo + sacarosa, 2) vehículo + dox, 3) quimioterapia + sacarosa, y 4) quimioterapia + dox. Se usaron los mismos regímenes quimioterapéuticos descritos anteriormente en el Ejemplo 2 y se administró sacarosa al 5 % o dox (2 g/l) por vía oral en el agua de beber ad libitum. Se midió el volumen del tumor dos veces a la semana mientras duró el estudio. Se generaron curvas de crecimiento tumoral para los ratones individuales usados en el estudio (n= 12 ratones para vehículo+sacarosa y n=13 ratones para vehículo+dox) y se presentan como ajuste generado por el modelo de efecto mixto lineal (LME) del volumen del tumor en el gráfico como splines cúbicos con nudos auto-determinados en la Fig. 5A y 5B. No hubo retardo significativo en el tiempo de duplicación del volumen del tumor en el grupo de vehículo + dox (tiempo de duplicación (TDT) = 44,5 días) frente a vehículo + sacarosa (TDT = 17 días), lo que sugiere que el knockdown de NRG1 inhibe parcialmente el crecimiento del tumor (Fig. 5A).

El efecto de NRG1 sobre la recaída del tumor se evaluó comparando el crecimiento de tumores en el grupo de quimioterapia + sacarosa con aquellos en el grupo de quimioterapia + dox. Hubo retardo significativo en la recaída del tumor en el grupo de quimioterapia + dox (TDT >181 días, no alcanzado para el final del estudio) frente a quimioterapia + sacarosa (TDT = 124 días) (Fig. 5B). Además, muchos de los tumores con recaída de los ratones tratados con dox, tanto con como sin quimioterapia, estaban compuestos principalmente por un líquido pardo/negro tipo moco con solamente una pequeña región de tejido tumoral viable. Por lo tanto, los volúmenes medidos eran considerablemente más grandes que el volumen real del tumor en los grupos tratados con dox. No se observaron diferencias entre ninguno de los grupos en el estudio de control Calu3-shLuc. Además, se realizó inmunohistoquímica (IHC) para el marcador de proliferación Ki67 en los tumores Calu3 3 días después de la última dosis de quimioterapia. Hubo una proporción marcadamente inferior de células Ki67 positivas en los tumores tratados con quimioterapia + dox en comparación con los tumores tratados con quimioterapia + sacarosa, lo que sugiere que la señalización de NRG1 estimula la proliferación en células tumorales residuales después de quimioterapia.

Se determinaron los niveles de ARNm de las isoformas NRG1 $\alpha$  y NRG1 $\beta$  en células tumorales recogidas en momentos puntuales prematuros y tardíos. Los transcritos de NRG1 aumentaba en el momento puntual tardío lo que indica que no es mantiene el knockdown in vivo.

También se examinó el efecto del knockdown de NRG1 en el modelo de xenoinjerto H441. Aunque hubo un efecto mínimo sobre el crecimiento de tumor primario (Fig. 6A (n=12 /grupo), las curvas de crecimiento tumoral presentadas como análisis de ajuste LME del volumen del tumor en el gráfico como splines cúbicos con nudos auto-determinados), hubo un retardo significativo en la recaída del tumor en el grupo de quimioterapia + dox (TDT >150 días, no alcanzado para el final del estudio) frente a quimioterapia + sacarosa (TDT = 94 días) (Fig. 6B ((n=12/grupo)). No hubo esta diferencia en el volumen del tumor en el estudio H441-shLuc in vivo. Similar al modelo de xenoinjerto Calu3, el modelo H441 también mostró niveles aumentados de transcritos de NRG1 en el momento puntual tardío.

Para investigar el mecanismo detrás de la restauración de los niveles de NRG1, las células tumorales se analizaron para la expresión de los genes transducidos de forma lentiviral. Como el lentivirus usado para transducir las células con el ARNhp también incluye un gen marcador dsRed, se comparó la proporción de células tumorales dsRED positivas en momentos puntuales prematuros y tardíos por citometría de flujo. Se evaluó la pérdida in vivo de expresión génica lentiviral para tumores en momentos puntuales prematuros (5 días) y tardíos (>100 días) por análisis FACS que examina la proporción de células tumorales (ESA positivas específicas humanas) que expresan el transgén dsRed lentiviral. Los ratones en el momento puntual prematuro recibieron sacarosa o dox y los ratones en el momento puntual tardío recibieron quimio+sacarosa o quimio+dox. Se observó una reducción significativa en la proporción de células dsRed positivas en el momento puntual tardío para tumores tratados tanto con sacarosa como con dox, siendo la reducción significativamente mayor para los tumores tratados con dox (1,8 veces frente a 4,1 veces, p=0,007). Esto sugiere que la pérdida de expresión de transgén viral se correlaciona con una restauración de los niveles de NRG1.

Tanto las células Calu3 como H441 muestran niveles aumentados de proteína HER3, que provocan la cuestión de si el papel de NRG1 en la recaída del tumor es específico de tumores con sobre-expresión del receptor. Para abordar esta cuestión, se usó el modelo de xenoinjerto H1299 que tiene niveles muy inferiores de HER3. El knockdown de NRG1 solo tuvo un efecto solamente moderado sobre el crecimiento de tumores primarios, similar al modelo H441. En contraste y a pesar del crecimiento muy agresivo de los tumores H1299, el knockdown de NRG1 condujo a una respuesta potenciada a quimioterapia provocando un retardo significativo en la recaída del tumor en el grupo de

quimioterapia + dox (TDT = 30,45 días) frente a quimioterapia + sacarosa (TDT = 11,5 días) (n=12/grupo) (Fig. 7A, B).

Además, se generó una sublínea estable de H1299 que expresa un ARNhp diferente para NRG1 (shNRG1.2) que provocó una reducción más moderada en los niveles de ARNm de NRG1. Estudios in vivo con H1299-shNRG1.2 también demostraron una respuesta potenciada a quimioterapia tras knockdown de NRG1. Sin embargo, la magnitud de la inhibición del crecimiento fue más pequeña en este modelo, coherente con el menor grado de knockdown de NRG1. No hubo diferencia en los volúmenes del tumor entre grupos tratados con sacarosa y dox con o sin quimioterapia en estudios H1299-shLuc in vivo.

La inhibición de la señalización autocrina NRG1 por knockdown mediado por ARNhp tuvo efectos solamente modestos a moderados sobre el crecimiento de tumores primarios pero retardó drásticamente la recaída del tumor después de quimioterapia. A pesar de la incapacidad de mantener el knockdown al largo plazo de NRG1 en los modelos de xenoinjerto, se observó un retardo significativo en la recaída del tumor tras el knockdown de NRG1. Estos hallazgos sugieren que hay diferencias en las vías clave que regulan el crecimiento del tumor primario, y la quimiorresistencia y recaída.

#### **Ejemplo 7 - La inhibición de la señalización de NRG1 usando retención de ligando retarda la recaída del tumor**

Para ensayar el papel de la señalización de NRG1 en la promoción de la recaída después de quimioterapia en el modelo de ratón *LSL-K-ras<sup>G12D</sup>;p53<sup>F/f</sup>*, se empleó un enfoque de retención de ligando para secuestrar NRG1 y evitar su unión a receptores in vivo. Se generó una fusión del dominio extracelular de HER4 humano (HER4-ECD) fusionado a Fc de IgG2A murina. HER4 muestra unión de alta afinidad por NRG1 (Tzahar et al., 1994). Cuando se añadió HER4-ECD a células LKPH1 y LKPH2 privadas de suero in vitro, se observó inhibición de señalización NRG1/HER3 demostrada por niveles disminuidos de p-HER3. Por tanto, in vitro la molécula se comportaba como se esperaba en la interferencia con la señalización de NRG1 de mediación autocrina.

Se tomaron imágenes de ratones *LSL-K-ras<sup>G12D</sup>;p53<sup>F/f</sup>* que albergan tumor pulmonar por micro-tomografía computada de rayos X (micro-CT) al inicio del estudio (día 0), se segregaron en tres grupos de iguales cargas tumorales de partida y se trataron del siguiente modo: 1) PBS + IgG2A de control; 2) cisplatino + IgG2A de control; y 3) cisplatino + HER4-ECD. Los ratones experimentaron exploraciones micro-CT longitudinales para medir los cambios en la carga tumoral. El análisis de la carga tumoral promedio (Fig. 8A (el gráfico representa el volumen promedio del tumor +/- ETM, ragweed, anticuerpo IgG2a murino de control)) y tasa de crecimiento tumoral (Fig. 8B (gráfico que muestra el cambio factorial diario en la carga tumoral por régimen de tratamiento con intervalos de confianza del 95 %)) reveló que solamente la combinación de cisplatino + HER4-ECD pero no el cisplatino solo provocaba una inhibición significativa del crecimiento tumoral. Aunque los ratones tratados con cisplatino mostraron estasis de su crecimiento tumoral en la primera exploración micro-CT después de quimioterapia, la carga tumoral promedio a la conclusión del estudio y la tasa global de crecimiento tumoral no fueron significativamente diferentes entre los grupos tratados con vehículo y cisplatino (Fig. 8A-B).

Se realizó un segundo estudio en ratones *LSL-K-ras<sup>G12D</sup>;p53<sup>F/f</sup>* como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, este estudio incluyó un brazo de agente individual HER4-ECD además de los grupos descritos anteriormente. El análisis de la carga tumoral por micro-CT en el día 28 reveló una reducción significativa en la carga tumoral en los ratones tratados con cisplatino + HER4-ECD en comparación con los ratones tratados con cisplatino + vehículo y todos los demás grupos (Fig. 8C). En contraste, no hubo efecto del tratamiento con HER4-ECD solo sobre el crecimiento tumoral, apoyando adicionalmente el papel único de la señalización autocrina de NRG1 en la quimiorresistencia y/o el recambio tumoral. En este estudio, los ratones *LSL-K-ras<sup>G12D</sup>;p53<sup>F/f</sup>* se trataron con vehículo + IgG de control (n=10), cisplatino + IgG de control (n=11), cisplatino + HER4-ECD (n=8) o vehículo + HER4-ECD (n=7). El gráfico en la Fig. 8C representa el cambio porcentual promedio en la carga tumoral desde la línea basal ± ETM. Se utilizó ensayo de comparación múltiple de Dunnett para comparar todos los grupos de tratamiento frente al control de vehículo \*\* p = 0,0016. Se evaluó la actividad de combinación usando un ensayo t-no relacionado frente a su monoterapia \* p < 0,05, \*\*p<0,01.

#### **Ejemplo 8 - Utilización del receptor de NRG1 en NSCLC**

Para entender cuales de los receptores HER se emplean en la señalización autocrina de NRG1 en NSCLC, se evaluaron los efectos del knockdown de HER3 y HER4 sobre la proliferación de células tumorales. El modelo NSCLC Calu3 expresaba niveles elevados de todos los receptores de la familia HER en comparación con otras líneas celulares. Se generaron las sublíneas celulares estables de Calu3 inducibles por dox shHER3 (Calu3-shHER3) y shHER4 (Calu3-shHER4), así como una línea celular de control que portaba un ARNhp inducible por dox para Luciferasa. Los niveles de transcrito de HER3 y HER4 estaban disminuidos en Calu3-shHER3 y Calu3-shHER4 respectivamente en presencia de dox (2 ug/ml) medidos por qPCR, provocando niveles disminuidos de proteína, medidos por transferencia de Western. De forma interesante, el grado de regulación negativa de p-AKT observado en Calu3-shHER3 en presencia de dox fue mucho mayor que el observado en Calu3-shHER4, lo que sugiere que HER3 es el receptor predominante que media la señalización autocrina de NRG1 en el modelo Calu3.

Para confirmar este papel in vivo, se realizaron estudios usando los modelos de xenoinjerto Calu3-shHER3 y Calu3-shHER4 tratados con sacarosa o dox. A los ratones con tumores de xenoinjerto Calu3-shHER3 o Calu3-shHER4 establecidos se les administró vehículo (sacarosa) o dox (2 gm/l) en el agua para beber ad libitum (n=14/grupo). Hubo inhibición sustancial de crecimiento del tumor Calu3-shHER3 en los ratones que recibieron tratamiento con dox (TDT = 19 días) en comparación con aquellos que recibieron tratamiento con sacarosa (TDT = 11 días). Sin embargo, no hubo inhibición notable del crecimiento tumoral del estudio in vivo Calu3-shHER4.

El análisis de receptores in vitro y los estudios un vivo indican que a pesar de los niveles elevados de HER4, la señalización autocrina de NRG1 sucede principalmente a través de HER3 en este modelo.

Se evaluó la señalización autocrina de NRG1 en la línea celular NSCLC humana H522, que expresa elevados niveles de HER4 pero HER3 no detectable. Se generó una sublínea H522-shNRG1. La administración de dox a células H522-shNRG1 privadas de suero provocó niveles disminuidos de fosfo-HER4 y fosfo-S6. No se observaron diferencias en células de control H522-shLuc. Se usó knockdown mediado por ARNip para ensayar las necesidades de cada miembro de la familia HER en la proliferación celular. Solamente el knockdown de HER4 y no los otros receptores de la familia HER provocó una proliferación celular disminuida. Estos datos sugieren que la señalización autocrina de NRG1 sucede a través de HER4 en células H522. Por tanto, la señalización autocrina de NRG1 en NSCLC puede mediar tanto por HER3 como por HER4.

## Referencias

- 1) Lung Cancer Principles and Practice, tercera edición (2005) (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).
- 2) Agus, D. B., et al. (2002). Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer cell* 2, 127-137.
- 3) al Moustafa, A. E., et al (1999). Expression of P185erbB-2, P160erbB-3, P180erbB-4, and heregulin alpha in human normal bronchial epithelial and lung cancer cell lines. *Anticancer Res* 19, 481-486.
- 4) Baldi, P., y Long, A. D. (2001). A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics* 17, 509-519.
- 5) Bao, S., et al. (2006). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer research* 66, 7843-7848.
- 6) Brennan, S. K., y Matsui, W. (2009). Cancer stem cells: controversies in multiple myeloma. *Journal of molecular medicine (Berlín, Alemania)* 87, 1079-1085.
- 7) Carey, K. D., et al. (2006). Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer research* 66, 8163-8171.
- 8) Costello, R. T., et al. (2000). Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer research* 60, 4403-4411.
- 9) Dahabreh, I. J., et al. (2010). Somatic EGFR mutation and gene copy gain as predictive biomarkers for response to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 16, 291-303.
- 10) Dean, M., Fojo, T., y Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nature reviews* 5, 275-284.
- 11) Ding, L., et al. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455, 1069-1075.
- 12) Doebele, R. C., et al. (2010). New strategies to overcome limitations of reversible EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 69, 1-12.
- 13) Dylla, S. J., et al. (2008). Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PloS one* 3, e2428.
- 14) Goffin, J., et al. (2010). First-line systemic chemotherapy in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a systematic review. *J Thorac Oncol* 5, 260-274.
- 15) Gollamudi, M., et al. (2004). Autocrine activation of ErbB2/ErbB3 receptor complex by NRG-1 in non-small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer* 43, 135-143.

- 16) Gray, D. C., et al. (2007). pHUSH: a single vector system for conditional gene expression. *BMC Biotechnol* 7,61.
- 5 17) Hirsch, F. R., et al. (2007). Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Ann Oncol* 18, 752-760.
- 18) Holmes, W. E., et al. (1992). Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science (Nueva York, NY)* 256, 1205-1210.
- 10 19) Homer MJ, et al (ed.) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006. In, (National Cancer Institute. Bethesda, MD).
- 20) Jackson, E. L., et al. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 15, 3243-3248.
- 15 21) Johnson, B. E., y Janne, P. A. (2006). Rationale for a phase II trial of pertuzumab, a HER-2 dimerization inhibitor, in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12, 4436s-4440s.
- 20 22) Junttila, T. T., et al. (2009). Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer cell* 15, 429-440.
- 23) Kosaka, T., et al. (2004). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer research* 64, 8919-8923.
- 25 24) Kuyama, S., et al. (2008). Impact of HER2 gene and protein status on the treatment outcome of cisplatin-based chemoradiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 3, 477-482.
- 25) Li, Q., et al. (2004). Development of an autocrine neuregulin signaling loop with malignant transformation of human breast epithelial cells. *Cancer research* 64, 7078-7085.
- 30 26) Liu, L. Z., et al. (2007). AKT1 amplification regulates cisplatin resistance in human lung cancer cells through the mammalian target of rapamycin/p70S6K1 pathway. *Cancer research* 67, 6325-6332.
- 27) Lynch, T. J., et al. (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.
- 35 28) Marchetti, A., et al. (2005). EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 23, 857-865.
- 40 29) Matsui, W., et al. (2004). Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 103, 2332-2336.
- 30) Novak, A., et al. Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis* 28, 147-155.
- 45 31) Oliver, T. G., et al. (2010). Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. *Genes Dev* 24, 837-852.
- 32) Paez, J. G., et al. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science (Nueva York, NY)* 304, 1497-1500.
- 50 33) Pao, W., et al (2005). Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2, e73.
- 34) Patel, N. V., et al. (2000). Neuregulin-1 and human epidermal growth factor receptors 2 and 3 play a role in human lung development in vitro. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 22, 432-440.
- 55 35) Phillips, T. M., et al. (2006). The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *Journal of the National Cancer Institute* 98, 1777-1785.
- 60 36) Reissmann, P. T., et al. (1999). Amplification and overexpression of the cyclin D1 and epidermal growth factor receptor genes in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer Study Group. J Cancer Res Clin Oncol* 125, 61-70.
- 37) Schaefer, G., et al. (1997). Gamma-heregulin: a novel heregulin isoform that is an autocrine growth factor for the human breast cancer cell line, MDA-MB-175. *Oncogene* 15, 1385-1394.
- 65

- 38) Sheng, Q., et al. (2010). An Activated ErbB3/NRG1 Autocrine Loop Supports In Vivo Proliferation in Ovarian Cancer Cells. *Cancer cell* 17, 298-310.
- 39) Shi, D., et al. (1992). Overexpression of the c-erbB-2/neu-encoded p185 protein in primary lung cancer. *Mol Carcinog* 5, 213-218.
- 40) Shigematsu, H., Lin, L., et al. (2005). Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 97, 339-346.
- 41) Singh, M., Lima, et al. (2010). Assessing therapeutic responses in Kras mutant cancers using genetically engineered mouse models. *Nat Biotechnol* 28, 585-593.
- 42) Sinnberg, T., et al. (2009). Inhibition of PI3K-AKT-mTOR signaling sensitizes melanoma cells to cisplatin and temozolomide. *J Invest Dermatol* 129, 1500-1515.
- 43) Storey, J. D., y Tibshirani, R. (2003). Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9440-9445.
- 44) Tzahar, E., et al. (1994). ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/herregulin isoforms. *J Biol Chem* 269, 25226-25233.
- 45) Weiner, D. B., et al. (1990). Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer research* 50, 421-425.
- 46) Yarden, Y., y Peles, E. (1991). Biochemical analysis of the ligand for the neu oncogenic receptor. *Biochemistry* 30, 3543-3550.
- 47) Yuste, L., et al. (2005). Activation of ErbB2 by overexpression or by transmembrane neuregulin results in differential signaling and sensitivity to herceptin. *Cancer research* 65, 6801-6810.
- 48) Zhou, B. B., et al. (2006). Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer. *Cancer cell* 10, 39-50.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Genentech, Inc.  
The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University Jackson, Erica  
Sweet-Cordero, Eric A.
- <120> Antagonistas de neurregulina y uso de los mismos en el tratamiento del cáncer
- <130> P4408R1 WO
- <150> US 61/305878  
<151> 18-02-2010
- <160> 10
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1  
<211> 65  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> oligonucleótido sintético
- <400> 1

**gatcccccat ggtgaacata gcgaatttca agagaattcg ctatgtttcac catgtttttt 60**

**ggaaa 65**

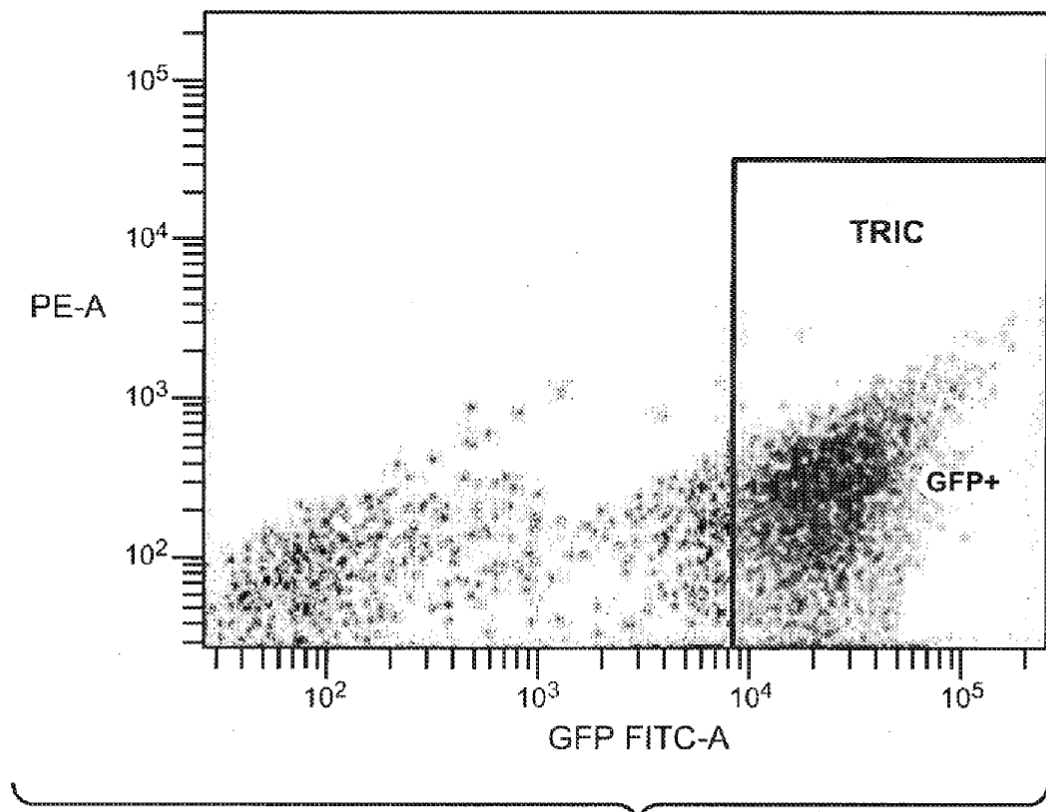
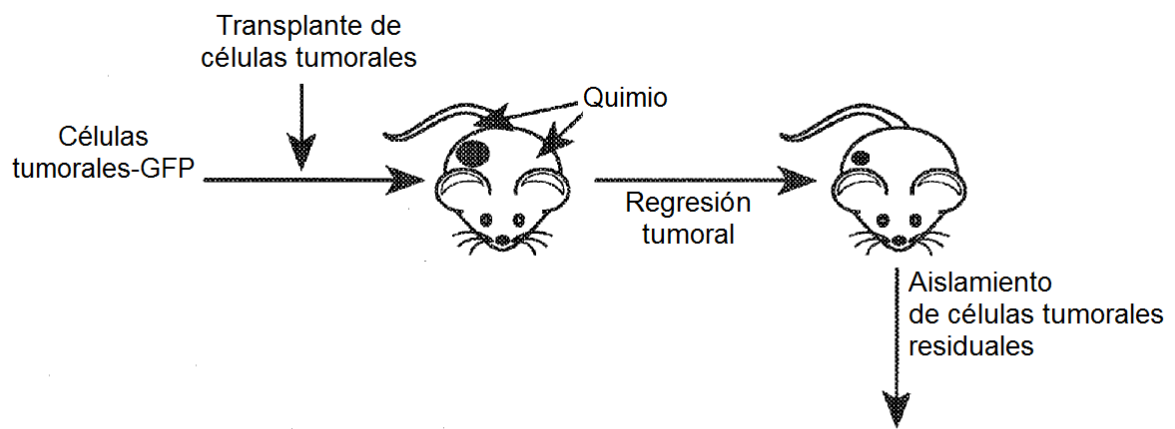
|    |                                                                           |           |  |
|----|---------------------------------------------------------------------------|-----------|--|
| 5  | <210> 2                                                                   |           |  |
|    | <211> 65                                                                  |           |  |
|    | <212> ADN                                                                 |           |  |
|    | <213> Secuencia artificial                                                |           |  |
|    | <220>                                                                     |           |  |
| 10 | <223> oligonucleótido sintético                                           |           |  |
|    | <400> 2                                                                   |           |  |
|    | <b>agctttttcca aaaaacatgg tgaacatagc gaattctctt gaaattcgct atgttcacca</b> | <b>60</b> |  |
|    | <b>tggggg</b>                                                             | <b>65</b> |  |
|    | <210> 3                                                                   |           |  |
| 15 | <211> 65                                                                  |           |  |
|    | <212> ADN                                                                 |           |  |
|    | <213> Secuencia artificial                                                |           |  |
|    | <220>                                                                     |           |  |
|    | <223> oligonucleótido sintético                                           |           |  |
| 20 | <400> 3                                                                   |           |  |
|    | <b>gatccccgag tatatgtgca aagtgattca agagatcact ttgcacatat actctttttt</b>  | <b>60</b> |  |
|    | <b>ggaaa</b>                                                              | <b>65</b> |  |
|    | <210> 4                                                                   |           |  |
|    | <211> 65                                                                  |           |  |
| 25 | <212> ADN                                                                 |           |  |
|    | <213> Secuencia artificial                                                |           |  |
|    | <220>                                                                     |           |  |
|    | <223> oligonucleótido sintético                                           |           |  |
| 30 | <400> 4                                                                   |           |  |
|    | <b>agctttttcca aaaaagagta tatgtgcaaa gtgatctctt gaatcacttt gcacatatac</b> | <b>60</b> |  |
|    | <b>tcggg</b>                                                              | <b>65</b> |  |
|    | <210> 5                                                                   |           |  |
|    | <211> 65                                                                  |           |  |
| 35 | <212> ADN                                                                 |           |  |
|    | <213> Secuencia artificial                                                |           |  |
|    | <220>                                                                     |           |  |
|    | <223> oligonucleótido sintético                                           |           |  |
| 40 | <400> 5                                                                   |           |  |
|    | <b>gatccccgat cacaactgct gcttaattca agagattaag cagcagttgt gatctttttt</b>  | <b>60</b> |  |
|    | <b>ggaaa</b>                                                              | <b>65</b> |  |
|    | <210> 6                                                                   |           |  |
|    | <211> 65                                                                  |           |  |
| 45 | <212> ADN                                                                 |           |  |
|    | <213> Secuencia artificial                                                |           |  |
|    | <220>                                                                     |           |  |
|    | <223> oligonucleótido sintético                                           |           |  |
| 50 | <400> 6                                                                   |           |  |
|    | <b>gatccccgat cacaactgct gcttaattca agagattaag cagcagttgt gatctttttt</b>  | <b>60</b> |  |
|    | <b>ggaaa</b>                                                              | <b>65</b> |  |
|    | <210> 7                                                                   |           |  |
|    | <211> 65                                                                  |           |  |
| 55 | <212> ADN                                                                 |           |  |
|    | <213> Secuencia artificial                                                |           |  |
|    | <220>                                                                     |           |  |
|    | <223> oligonucleótido sintético                                           |           |  |

|    |                                                                           |           |  |
|----|---------------------------------------------------------------------------|-----------|--|
|    | <400> 6                                                                   |           |  |
|    | <b>agctttttcca aaaaagatca caactgctgc ttaatctctt gaattaagca gcagttgtga</b> | <b>60</b> |  |
|    | <b>tcggg</b>                                                              | <b>65</b> |  |
| 5  | <210> 7<br><211> 65<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial            |           |  |
| 10 | <220><br><223> oligonucleótido sintético                                  |           |  |
|    | <400> 7                                                                   |           |  |
|    | <b>gatccccaag aggatgtcaa cggttattca agagataacc gttgacatcc tctttttttt</b>  | <b>60</b> |  |
| 15 | <b>ggaaa</b>                                                              | <b>65</b> |  |
|    | <210> 8<br><211> 65<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial            |           |  |
| 20 | <220><br><223> oligonucleótido sintético                                  |           |  |
| 25 | <400> 8                                                                   |           |  |
|    | <b>agctttttcca aaaaaaagag gatgtcaacg gttatctctt gaataaccgt tgacatcctc</b> | <b>60</b> |  |
|    | <b>ttggg</b>                                                              | <b>65</b> |  |
| 30 | <210> 9<br><211> 65<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial            |           |  |
| 35 | <220><br><223> oligonucleótido sintético                                  |           |  |
|    | <400> 9                                                                   |           |  |
|    | <b>gatcccccat ggtgaacata gcgaatttca agagaattcg ctatgttcac catgtttttt</b>  | <b>60</b> |  |
| 40 | <b>ggaaa</b>                                                              | <b>65</b> |  |
|    | <210> 10<br><211> 65<br><212> ADN<br><213> Secuencia artificial           |           |  |
| 45 | <220><br><223> oligonucleótido sintético                                  |           |  |
| 50 | <400> 10                                                                  |           |  |
|    | <b>agctttttcca aaaaacatgg tgaacatagc gaattctctt gaaattcgct atgttcacca</b> | <b>60</b> |  |
|    | <b>tgggg</b>                                                              | <b>65</b> |  |

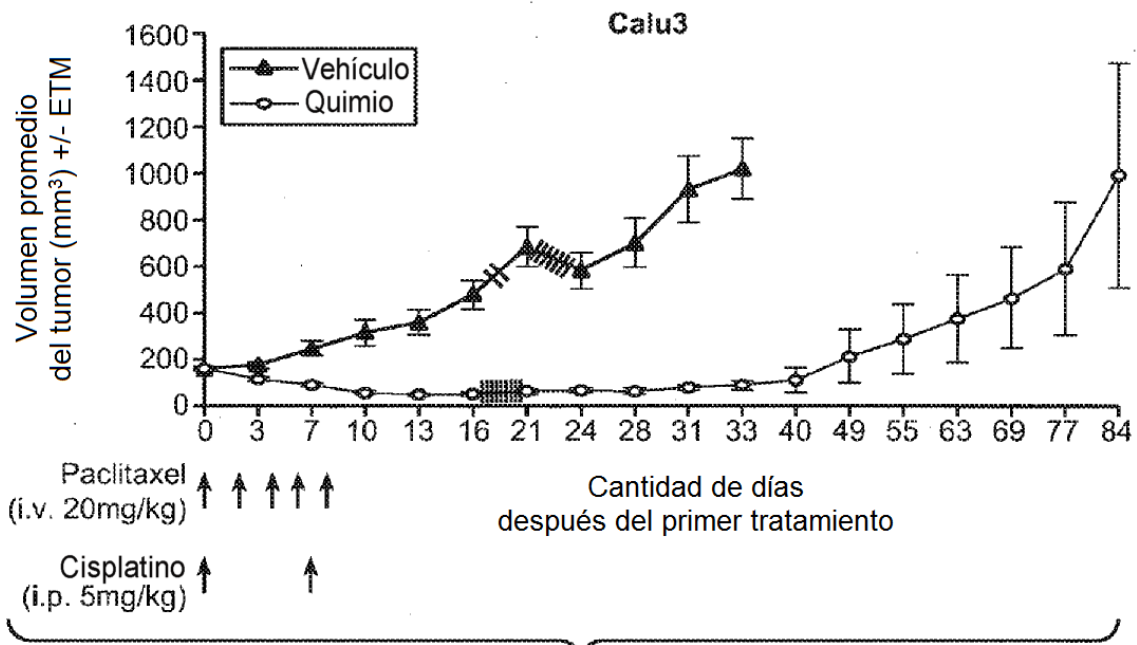
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un antagonista de neurregulina 1 (NRG1) y un agente quimioterapéutico para su uso en un método para aumentar el tiempo hasta la recidiva del tumor en un paciente con cáncer, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz del antagonista de neurregulina 1 y del agente quimioterapéutico al paciente, en donde el agente quimioterapéutico es paclitaxel, cisplatino o una combinación de paclitaxel y cisplatino, y en donde el antagonista de neurregulina 1 es un anticuerpo anti-NRG1, un ARN o una molécula receptora de NRG1 que se une a NRG1.
- 10 2. El antagonista de NRG1 y el agente quimioterapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer de vejiga, cáncer esofágico, cáncer de próstata y cáncer colorrectal.
- 15 3. El antagonista de NRG1 y el agente quimioterapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la molécula receptora es una inmunoadhesina.
4. El antagonista de NRG1 y el agente quimioterapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el ARN es ARN antisentido, ARNi, ARNip, ARNhp o un aptámero de ARN.

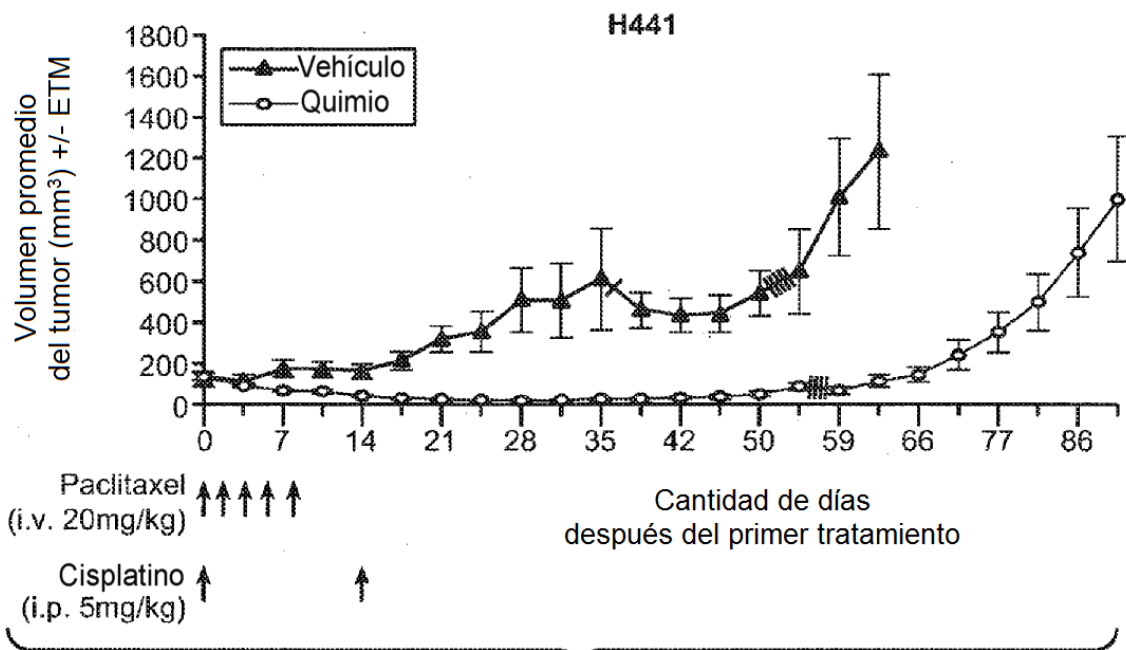




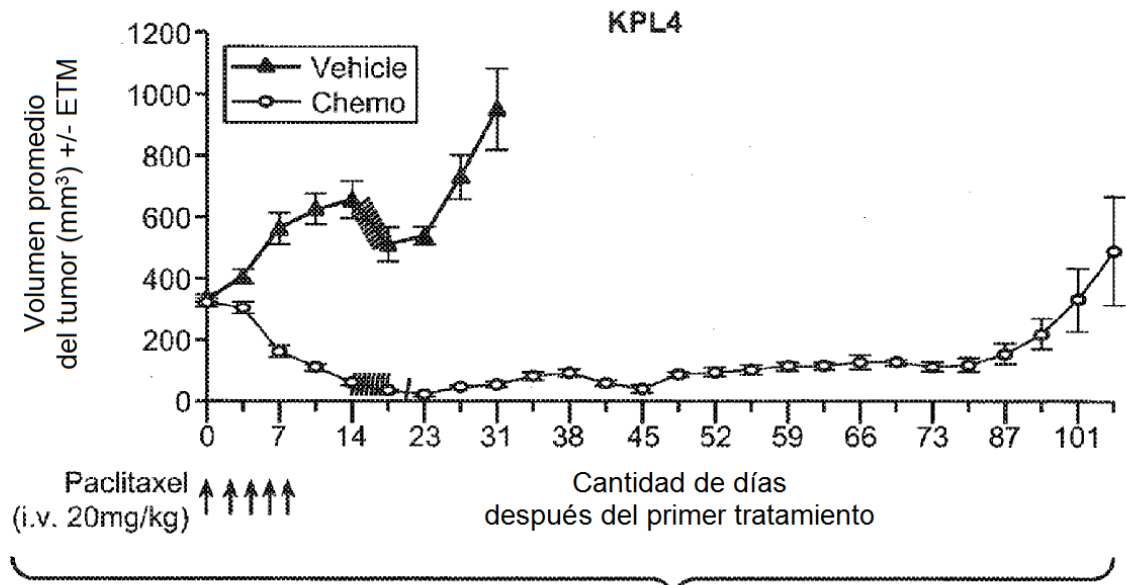
**FIG. 1**



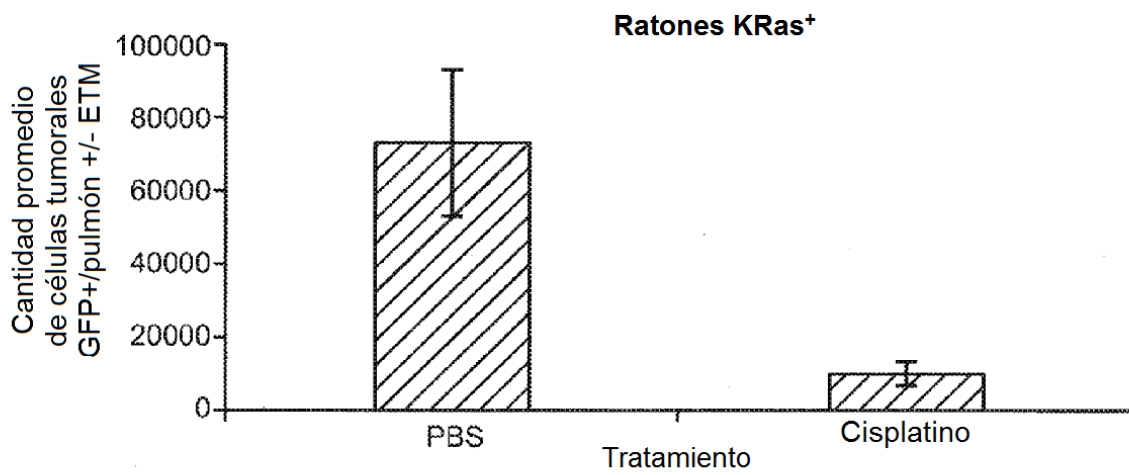
**FIG. 2A**



**FIG. 2B**

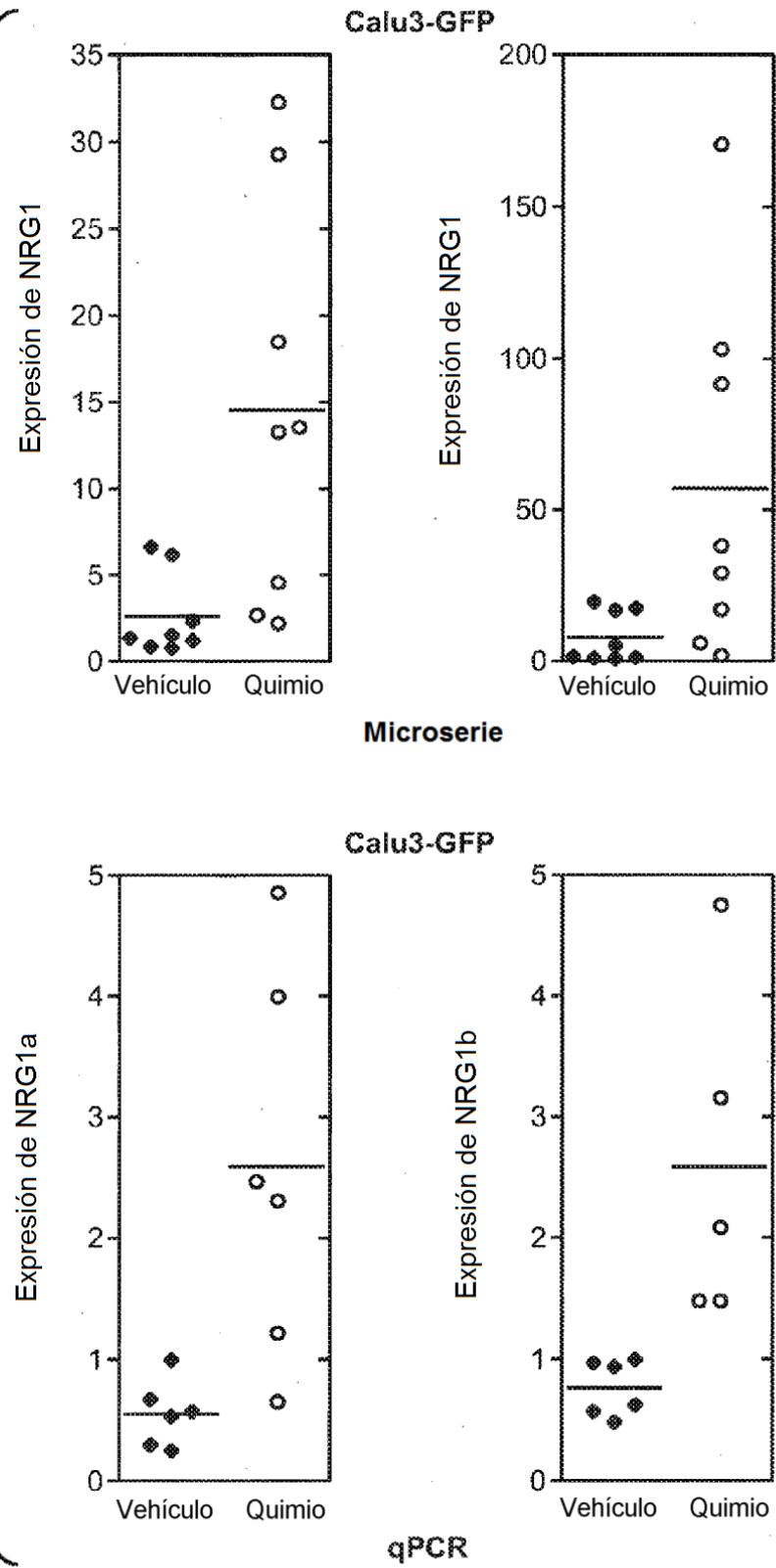


**FIG. 2C**

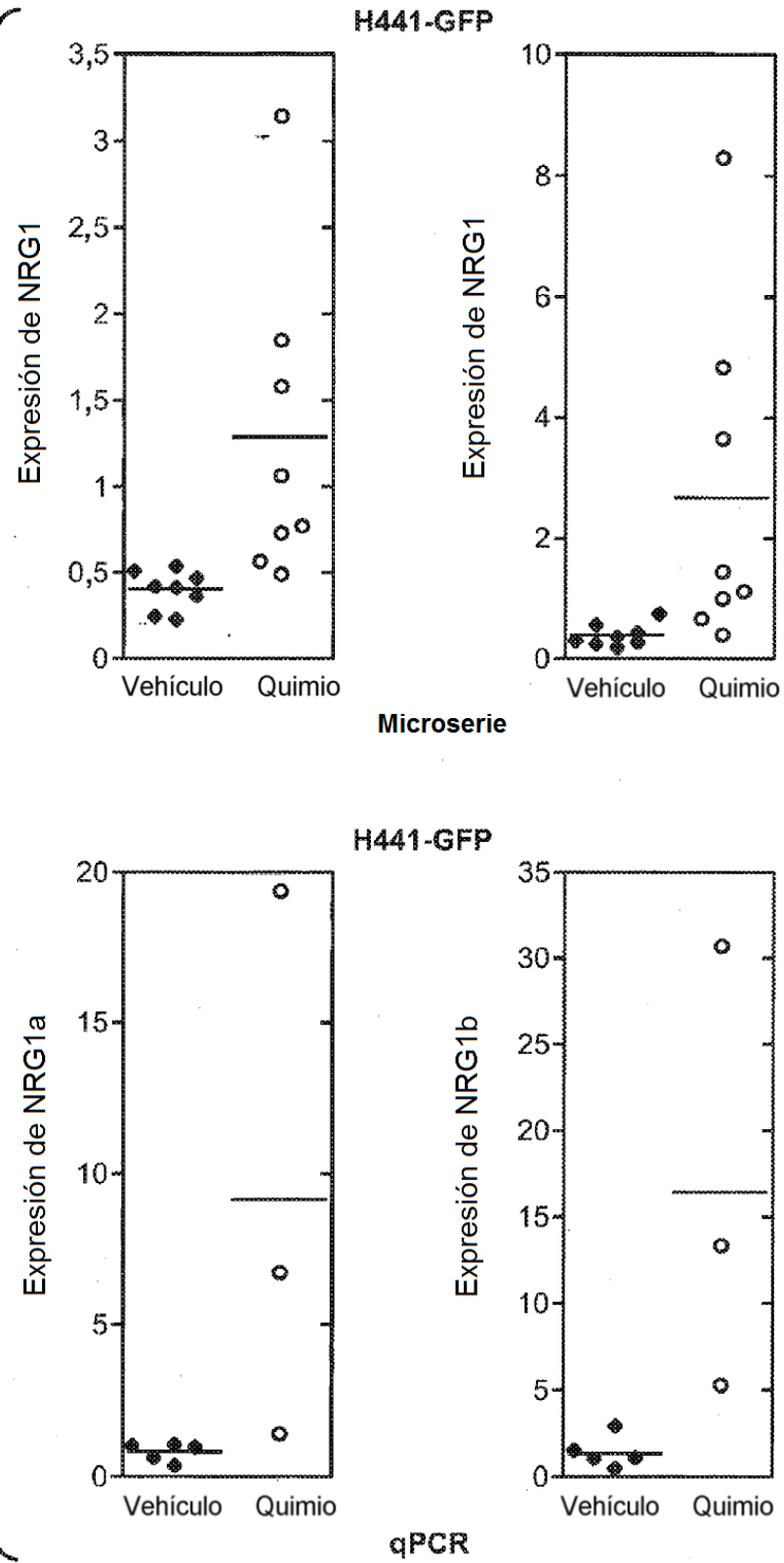


**FIG. 2D**

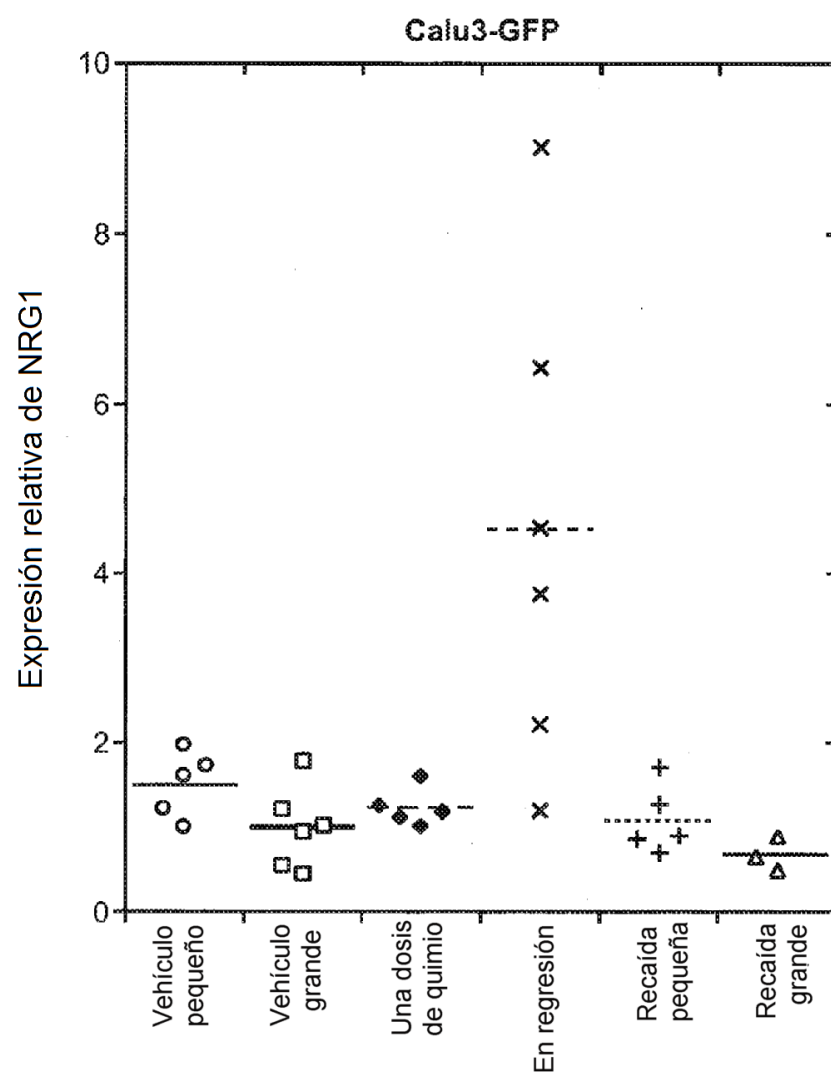
**FIG. 3A**



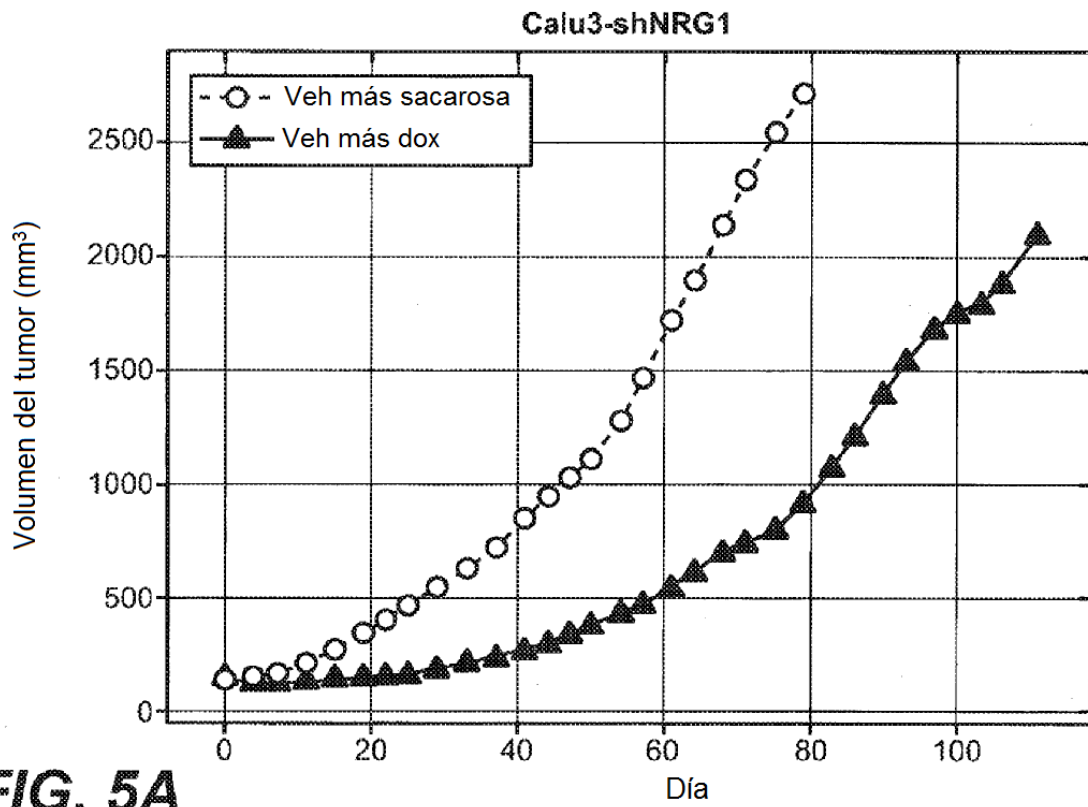
**FIG. 3B**



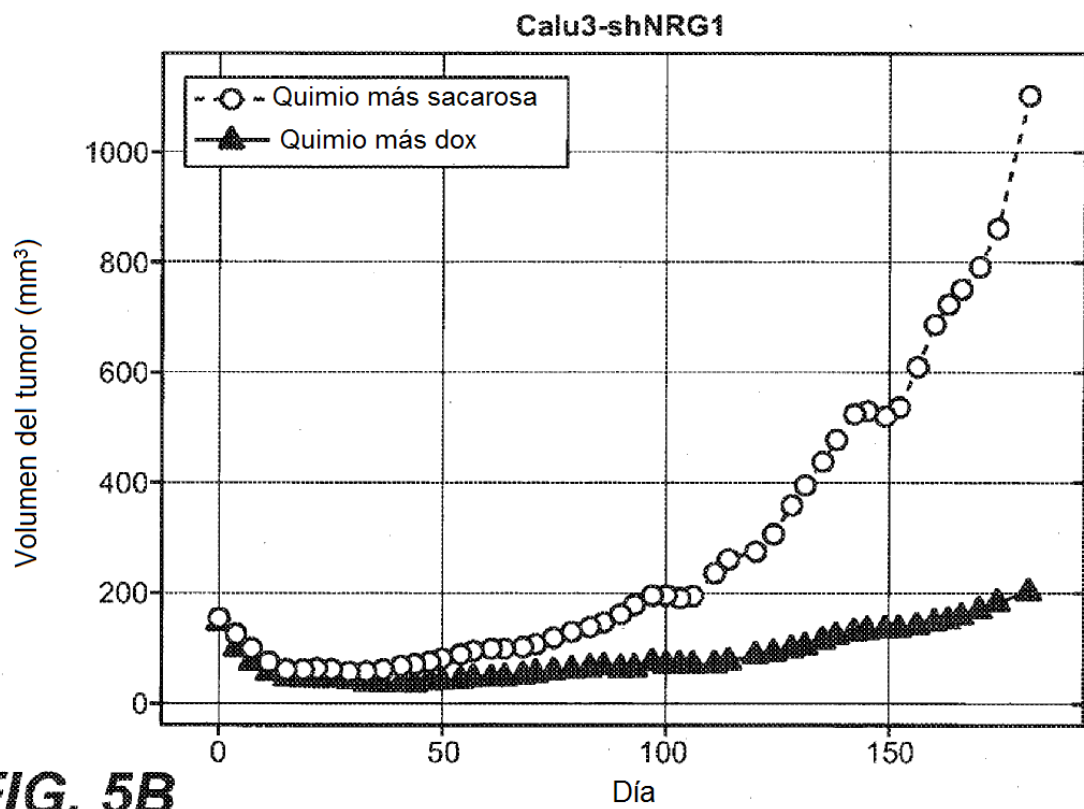




**FIG. 4**

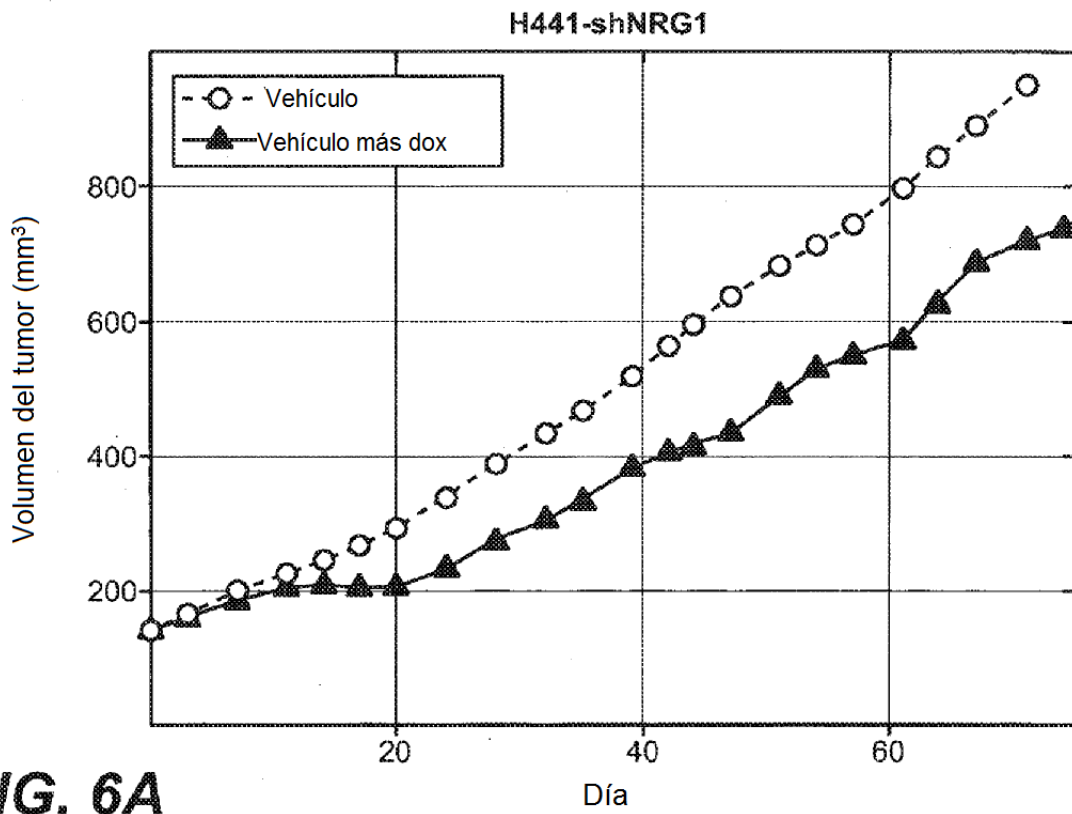


**FIG. 5A**

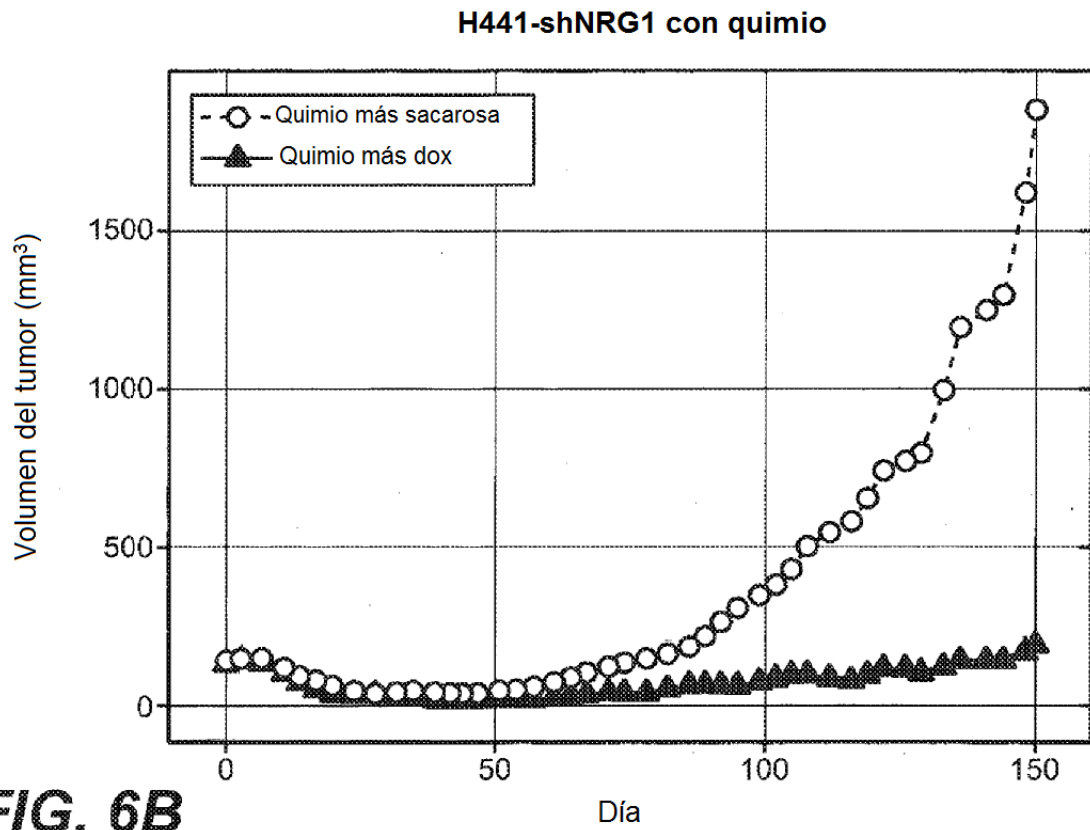


**FIG. 5B**

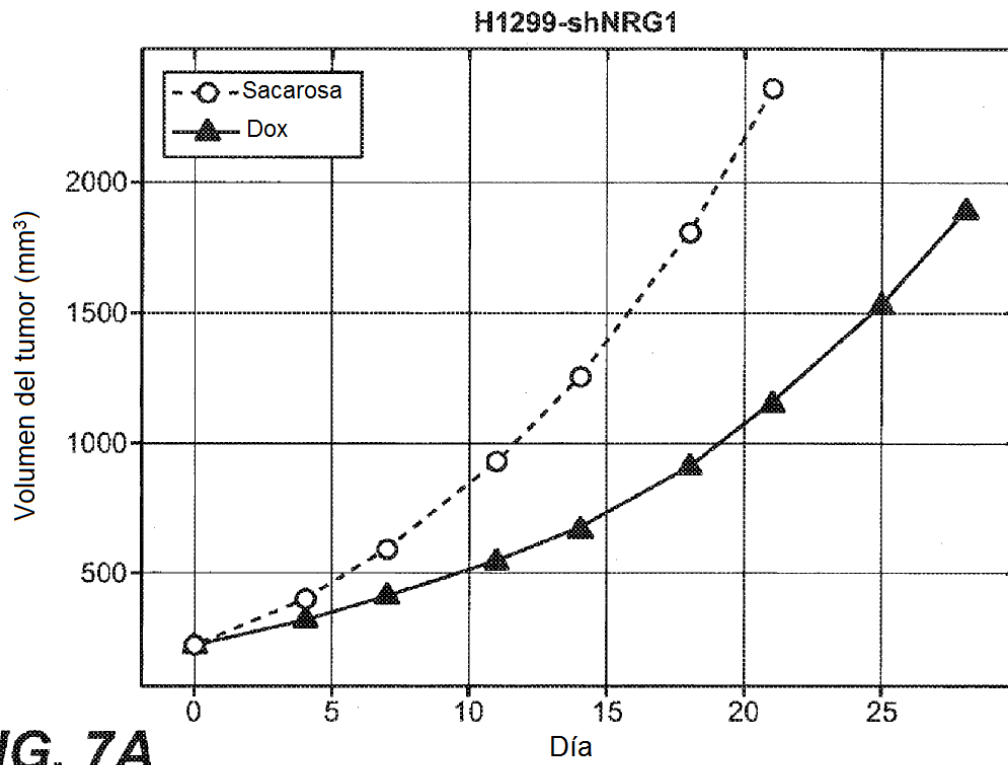




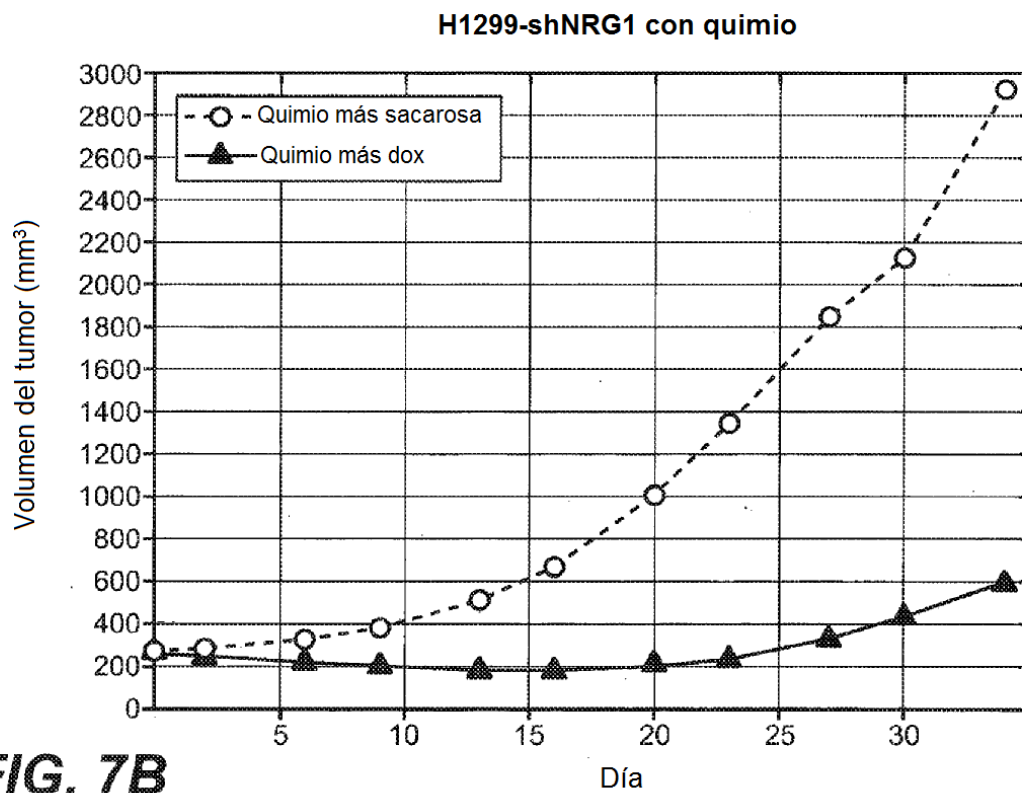
**FIG. 6A**



**FIG. 6B**



**FIG. 7A**



**FIG. 7B**

