

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 319**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2008 E 08781732 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 2183282**

54 Título: **Anticuerpos específicos para el dominio regulador C-terminal del EGFR y su uso**

30 Prioridad:

**13.07.2007 US 949792 P**

**15.11.2007 US 988196 P**

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

**08.05.2015**

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)  
1910 E. INNOVATION PARK DRIVE  
TUCSON, ARIZONA 85755, US**

72 Inventor/es:

**POWELL, WILLIAM C.;  
WILLOUGHBY KIVI, LINDA;  
ROCHE, PATRICK C.;  
GOOCH, GARY y  
GAIRE, FABIEN**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 535 319 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos específicos para el dominio regulador C-terminal del EGFR y su uso

**Campo de la divulgación**

5 La presente divulgación se refiere a moléculas de unión a antígeno, como anticuerpos, específicas para una porción del dominio intracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico («EGFR») y a los usos de estas moléculas de unión a antígeno, por ejemplo, para el pronóstico del cáncer y/o como indicadores de terapias específicas para el cáncer (por ejemplo, inhibidor del EGFR).

**Antecedentes**

10 Cáncer es el nombre genérico de un amplio abanico de enfermedades malignas que se caracterizan por el crecimiento no regulado, la falta de diferenciación y la capacidad para invadir tejidos locales y metastatizar. Estas enfermedades malignas neoplásticas afectan, con diversos grados de prevalencia, a todos los tejidos y órganos del cuerpo. Históricamente, los cánceres se han diagnosticado utilizando características clínicas e histológicas convencionales del tejido u órgano afectado. Sin embargo, ahora resulta evidente que los tumores, incluso del mismo tejido u órgano, son heterogéneos a nivel celular y/o molecular. Como consecuencia, el pronóstico y/o la sensibilidad a la terapia de cada paciente pueden ser diferentes. Esta impredecibilidad dificulta la selección del tratamiento y puede exponer a los pacientes a los riesgos y molestias de terapias innecesarias.

20 Los cánceres EGFR positivos ofrecen un ejemplo ilustrativo. El EGFR y sus efectores de señalización en sentido descendente, incluyendo los miembros de las vías Ras/Raf/MAP quinasa, desempeñan un papel importante en la biología de las células epiteliales tanto normales como malignas (Normanno et al., *Gene*, 366:2-16, 2006). La amplificación y/o mutación del gen del EGFR y/o la sobreexpresión de la proteína del EGFR se han asociado con diversas enfermedades malignas, incluyendo el cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de células renales, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma y/o astrocitoma.

25 Se cree que el aumento de la actividad del EGFR (sea como resultado de una expresión de proteína anormalmente elevada, la desregulación de la actividad del receptor u otro mecanismo) contribuye a la carcinogénesis. Por consiguiente, el EGFR es un objetivo consolidado para el desarrollo de agentes terapéuticos.

30 Existen diversos inhibidores del EGFR disponibles para el tratamiento clínico. Entre ellos se incluyen anticuerpos específicos para el EGFR (p. ej., cetuximab (ERBITUX™) y panitumumab (VECTIBIX™)) y moléculas pequeñas inhibitoras de la tirosina quinasa (p. ej., gefitinib (IRESSA™) y erlotinib (TARCEVA™)). A pesar de que estos tratamientos han beneficiado a subconjuntos de pacientes con cáncer, las respuestas a los fármacos son variables. Por ejemplo, tres estudios clínicos de pacientes con cáncer colorrectal avanzado que utilizaron cetuximab en monoterapia y/o combinado con irinotecan (un agente quimioterapéutico) demostraron 35 unas tasas de respuesta del 10,5% o 10,8% en el caso del cetuximab en monoterapia y del 22,5% o 22,9% para la terapia combinada (revisado por Iqbal y Lenz, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 54(Supl. 1):S32-39, 2004). Del mismo modo, aproximadamente el 10% o el 20% de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) tratados con 250 o 500 de gefitinib al día, respondieron al fármaco y presentaron una mejoría de los síntomas, respectivamente (Birnbau y Ready, *Curr. Treat. Options Oncol.*, 6(1):75-81, 2005).

40 Las respuestas de los pacientes a los inhibidores del EGFR han sido correlacionadas con diversas métricas del EGFR. Por ejemplo, la expresión de EGFR (medida por inmunohistoquímica) se asoció con una respuesta objetiva al tratamiento con erlotinib en los pacientes con NSCLC (Tsao et al., *N. Engl. J. Med.*, 353:133-144, 2005). Sin embargo, la supervivencia tras el tratamiento en estos pacientes no se vio influida por la expresión del EGFR, el número de copias de EGFR ni la mutación de EGFR (Tsao et al., *N. Engl. J. Med.*, 353:133-144, 2005). Tanto en entornos preclínicos como clínicos, se descubrió que las mutaciones somáticas en el dominio de la tirosina quinasa del EGFR estaban correlacionadas con la sensibilidad de los pacientes con NSCLC al gefitinib y erlotinib pero no al cetuximab (Janne et al., *J. Clin. Oncol.*, 23:3227-3234, 2005). Los estudios clínicos de gefitinib demostraron una asociación entre el aumento del número de copias de EGFR, el estado mutacional y la respuesta clínica en el NSCLC avanzado (Cappuzzo et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 97:643-655, 50 2005).

Los anticuerpos del EGFR en el uso clínico (p. ej., cetuximab (ERBITUX™) y panitumumab (VECTIBIX™)) se unen al dominio extracelular del EGFR. Este dominio del receptor incluye el sitio de unión del ligando y se cree que estos anticuerpos bloquean la unión del ligando, interrumpiendo así la señalización del EGFR. Como resultado de la utilidad terapéutica de estos anticuerpos del EGFR, muchos estudios posteriores se han concentrado en la producción de anticuerpos (u otras moléculas de unión) específicos para el dominio extracelular del EGFR (véanse, por ejemplo, las Patentes estadounidenses nº 5 459 061, 5 558 864, 5 891 996, 6 217 866, 6 235 883, 6 699 473 y 7 060 808; las Patentes europeas nº EP0359282 y EP0667165).

Menos atención se ha prestado a los anticuerpos específicos para el dominio citoplásmico del EGFR, en particular con fines terapéuticos. Sin embargo, por ejemplo, Hyland et al. propuso la expresión intracelular de

anticuerpos de cadena simple (p. ej., scFvs) como un planteamiento prometedor para la interferencia selectiva en la señalización del EGFR. Otros han descrito anticuerpos específicos para el dominio intracelular del EGFR al menos a efectos de detección (p. ej., Lin *et al.*, *Cell. Mol. Immunol.*, 1(2): 137-141, 2004; Hyland *et al.*, *Oncogene*, 22(10): 1557-1567, 2003; Panneerselvam *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270(14):7975-7979, 1995; Gullick *et al.*, *J. Pathol.*, 164(4):285-289, 1991; Dazzi *et al.*, *Anal. Cell. Pathol.*, 3(2):69-75, 1991), y ya se comercializan algunos anticuerpos específicos para el dominio intracelular del EGFR (p. ej., Epitomics (Burlingame, CA, EE.UU.), Cat. N° 1902-1 y 2235-1; Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, EE.UU.), Cat. N° 4405 y 2239; Spring Bioscience (Fremont, CA, EE.UU.), Cat. N° E2451).

Al menos un estudio comparó la reactividad de los anticuerpos específicos para los dominios interno y externo del EGFR en el mismo conjunto de tejidos de cáncer de pulmón (Dazzi *et al.*, *Anal. Cell. Pathol.*, 3(2):69-75, 1991). No se observaron diferencias significativas en la reactividad de estos anticuerpos.

El constante desarrollo clínico de terapias inhibitoras del EGFR se beneficiaría de una estrategia paralela para la identificación de poblaciones de pacientes con muchas probabilidades de responder a estos tratamientos. Se necesitan nuevos marcadores de pronóstico y predictivos, que facilitarían una individualización de la terapia para cada paciente, al objeto de predecir de forma precisa las respuestas de los pacientes a estos tratamientos y de ayudar a los médicos a distinguir entre las opciones de tratamiento para estos pacientes.

### Resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

En el presente se divulgan métodos para averiguar el estado de la regulación del EGFR (y, por tanto, el estado de actividad del EGFR) en muestras biológicas (tales como secciones de tejido fijadas con formalina y embebidas en parafina («FFPE»)). El estado de activación del EGFR predice, entre otras cosas, la agresividad de las neoplasias EGFR-positivas y/o la potencial eficacia de las terapias dirigidas al EGFR que dependen al menos en parte del estado de activación del EGFR. Los métodos divulgados implican el uso de moléculas de unión a antígeno (también denominadas moléculas de unión a RD) que se unen específicamente al dominio regulador intracelular del EGFR. El estado de regulación del EGFR en las células y/o tejidos neoplásicos o normales se puede diferenciar por la accesibilidad del dominio regulador del EGFR a las moléculas de unión a RD (incluyendo las moléculas de unión a RD divulgadas).

También se divulgan péptidos obtenidos del dominio regulador del EGFR (péptidos del dominio regulador o RDP) y, en particular, de la región que tiene la secuencia LDNPDYQQDFFPKEAKPNG (el péptido o la secuencia «L2G»; SEC. ID. N°: 2). Los RDP son útiles, al menos, en la producción de ejemplos de moléculas de unión a RD y para otros fines que se revelan en la presente divulgación. En algunos ejemplos, las moléculas de unión a RD, como los anticuerpos, reconocen específicamente un epitopo incluido en una secuencia de RDP, por ejemplo, dentro de la secuencia de L2G.

Lo anterior y otras características resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones, que se ofrece con referencia a las figuras que la acompañan.

### Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es un diagrama de flujo que muestra de forma esquemática los pasos de ejemplos de métodos de inmunotinción.

La Fig. 2 es una representación esquemática del dominio regulador del EGFR que muestra las ubicaciones de los sitios de autofosforilación (recuadros blancos con un número que indica la posición del residuo del aminoácido autofosforilado) y sitios de unión conocidos para los ejemplos de proteínas reguladoras del EGFR, entre las que se incluyen las proteínas transductoras de la señal y activadoras de la transcripción (p. ej., STAT1 y/o STAT3; números de acceso OMIM 600555 o 102582), proteína de unión al receptor del factor de crecimiento 2 (Grb2; n° de acceso OMIM 108355), proteína de señalización y transformación que contiene los dominios de homología 2 y 3 de Src (Shc) (p. ej., números de acceso OMIM 600560, 605217, o 605263), IntP, y proteínas supresoras de la señalización de citoquina (p. ej., SOCS1 y/o SOCS3; números de acceso OMIM 603597 y 604176, respectivamente).

La Fig. 3 es una serie de representaciones esquemáticas en las que se encuentra la molécula EGFR, que, en su estado natural, contiene un dominio de unión al ligando extracelular (LBD) y dominios de tirosina quinasa intracelulares (TKD) y reguladores (RD). En cada esquema, según corresponda, EDBM representa una molécula de unión específica a un dominio extracelular (como un anticuerpo); RDBM representa una molécula de unión específica a un dominio regulador (como un anticuerpo); y RDIM representa una molécula inhibidora del dominio regulador (como una proteína SOCS, como SOCS1 o SOCS3). Cada uno de los tres esquemas (de izquierda a derecha) representa un entorno molecular diferente. El panel de la izquierda muestra un EGFR de longitud completa no asociado con una RDIM. El panel central muestra un mutante del EGFR truncado N-terminal constitutivamente activo. El panel de la derecha muestra un EGFR de longitud completa asociado con una RDIM. En cada caso, las predicciones basadas en la unión (o no) del EDBM y el RDBM se enumeran bajo el esquema molecular.

La Fig. 4 muestra los resultados de dos ensayos Western blot en los que se utilizan tres concentraciones de proteína total (tal como se indica) de lisados de células A431 (EGFR positivo) y BT474 (EGFR negativo). Las representaciones de izquierda y derecha muestran el clon 5B7 y el clon 3C6, respectivamente, que se unen a una única banda de proteína (de un tamaño apropiado para el EGFR) en lisados de células A431. Los pesos moleculares (en kD) se muestran en el extremo izquierdo.

La Fig. 5 muestra los resultados de tinción de los tejidos indicados con el clon 3C6 específico del dominio extracelular del EGFR y el clon 5B7 específico del dominio regulador del EGFR en formato de tabla (FIG. 5A) y de imagen (FIG. 5B).

La Fig. 6 muestra imágenes que demuestran las diferencias en la unión del clon 5B7 específico del dominio regulador (RDBM) del EGFR y el clon 3C6 específico del dominio externo (EDBM) del EGFR en dos secciones representativas de tejido de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC).

La Fig. 7 muestra los resultados de estudios de inhibición del péptido en los que se realiza un mapeo del epitopo del clon 5B7 específico del dominio regulador del EGFR. La región que se encuentra dentro de un recuadro en la Fig. 7B representa un ejemplo de epitopo del clon 5B7, cuyo extremo C-terminal puede tener unos pocos aminoácidos largos o cortos.

La Fig. 8 muestra imágenes que demuestran las diferencias en la unión del clon 5B7 específico del dominio regulador (RDBM) del EGFR y del clon 3C6 específico del dominio externo (EDBM) del EGFR en dos hígados de ratón normales (dos paneles de la izquierda) y los hígados de ratón knock-out SOCS3 (dos paneles de la derecha).

La Fig. 9 muestra dos curvas de Kaplan Meier en las que se demuestra la supervivencia total de los pacientes con NSCLC como una función del estado del clon 3C6 (panel A) o 5B7 (panel B). En el panel A, la tinción 3C6 positiva se indica mediante una línea negra y la tinción 3C6 negativa se indica con una línea gris. En el panel B, la tinción 5B7 positiva se indica mediante una línea negra y la tinción 5B7 negativa se indica con una línea gris.

La Fig. 10 muestra dos curvas de Kaplan Meier que demuestran la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con NSCLC como una función del estado del clon 3C6 (panel A) o 5B7 (panel B). En el panel A, la tinción 3C6 positiva se indica mediante una línea negra y la tinción 3C6 negativa se indica con una línea gris. En el panel B, la tinción 5B7 positiva se indica mediante una línea negra y la tinción 5B7 negativa se indica con una línea gris.

### 30 Lista de secuencias

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos que se indican en la lista de secuencias adjunta se muestran utilizando abreviaturas con letras estándar para las bases de nucleótidos y un código de tres letras en el caso de los aminoácidos, tal y como se define en 37 C.F.R. 1.822. Solamente se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, aunque se entiende que la cadena complementaria está incluida por referencia a la cadena mostrada. Se entenderá que todos los números de acceso a las bases de datos de secuencias incluidos en el presente se refieren a la versión de la secuencia identificada por ese número de acceso disponible en la fecha de prioridad de la presente solicitud (13 de julio de 2007). En la lista de secuencias adjunta:

40 SEC. ID. Nº 1 es una secuencia de aminoácidos de referencia (REFSEC) del EGFR humano (isoforma a), tal y como se muestra en el número de acceso GENBANK™ NM 005228. Una secuencia de ácido nucleico que codifica este polipéptido también se recoge en el número de acceso GENBANK™ NM\_005228.

SEC. ID. Nº 2 es la secuencia de aminoácidos de un péptido correspondiente a los residuos 1167-1185 de la SEC. ID. Nº 1.

45 SEC. ID. Nº 3 es la secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada (REFSEC) de proteína humana supresora de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3) que se muestra en el número de acceso GENBANK™ NM\_003955. Una secuencia de ácido nucleico que codifica este péptido se recoge asimismo en el número de acceso GENBANK™ NM\_003955.

SEC. ID. Nº 4 es un motivo de proteína YXXLW.

SEC. ID. Nº 5 es un motivo de proteína YXXP/D.

50 SEC. ID. Nº 6 muestra un ejemplo de secuencia de consenso de RDP.

### Descripción detallada

#### Introducción

55 La invención divulga péptidos del dominio regulador («RDP») del EGFR entre los que se incluyen, por ejemplo, péptidos aislados que contienen los residuos de aminoácidos 1167-1185 de la SEC. ID. Nº 1 o un fragmento inmunogénico de dicho péptido. Se divulgan asimismo moléculas de unión al dominio regulador (RD) (del EGFR) que se unen específicamente a estos péptidos. Algunas realizaciones incluyen una molécula de unión

al RD que se une específicamente a los residuos 1138-1196 de la SEC. ID. N° 1 o un fragmento de las mismas que se une a la proteína SOCS (por ejemplo, un fragmento de unión a SOCS3).

Se divulgan asimismo composiciones que incluyen una molécula de unión al RD del EGFR, cuya unión al EGFR es inhibida competitivamente por un RDP divulgado (como un péptido aislado que contiene los residuos de aminoácidos 1167-1185 de la SEC. ID. N° 1 o un fragmento inmunogénico de dicho péptido). Otras composiciones divulgadas incluyen una molécula de unión al RD del EGFR, cuya unión al EGFR es inhibida competitivamente por la proteína supresora de la señalización de citoquinas (SOCS) (como una proteína SOCS1 (véanse, por ejemplo, los números de acceso GenBank NP\_003736.1, EAW85163.1 y AAD27709.1) o una proteína SOCS3 (véanse, por ejemplo, los números de acceso GenBank CAG46495.1, CAG38736.1 y AAH60858.1), o, en determinadas realizaciones, una proteína SOCS3).

En cualquier realización que implique una molécula de unión a RD (sea una composición o un método), una molécula de unión a RD es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, como un anticuerpo monoclonal de conejo o de ratón) o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

También se divulgan métodos para producir un anticuerpo específico del EGFR, que comprenden la inmunización de un mamífero no humano con un inmunógeno que contiene una proteína portadora y un RDP divulgado (como los residuos de aminoácidos 1167-1185 de la SEC. ID. N° 1 o un fragmento inmunogénico de dicho péptido). Algunos de estos métodos incluyen un paso más de aislamiento del suero del mamífero no humano y aislamiento del anticuerpo policlonal específico para el inmunógeno. Estos otros métodos incluyen un paso más de fusión de las células de bazo de animales no humanos con un elemento asociado de fusión para obtener hibridomas que producen anticuerpos.

Los métodos divulgados incluyen también la predicción de la respuesta de una neoplasia a un inhibidor del EGFR mediante la detección en una muestra biológica, que incluye una o más células neoplásicas, de la unión específica de un anticuerpo de unión al RD del EGFR divulgado a una o más células neoplásicas, donde la unión específica del anticuerpo a una o más células neoplásicas indica que las células neoplásicas responderán a un inhibidor del EGFR. En algunas realizaciones del método, la respuesta de las células neoplásicas es un crecimiento ralentizado (como un crecimiento cero o un crecimiento negativo neto). En otras realizaciones del método, el crecimiento ralentizado es al menos un 10% (como al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 50% o al menos un 75%) inferior al crecimiento de la célula neoplásica antes del tratamiento con el inhibidor del EGFR. En algunas realizaciones, la respuesta de la célula neoplásica es la apoptosis y, en algunas de estas realizaciones, al menos un 10% (como al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 50% o al menos un 75%) de las células neoplásicas se someten a apoptosis.

Se divulgan asimismo métodos para predecir si un candidato para el tratamiento con un inhibidor del EGFR es probable que responda a dicho tratamiento, mediante la detección en una muestra biológica de un candidato para el tratamiento con un inhibidor del EGFR, cuya muestra biológica comprende una o más células neoplásicas, de la unión específica de un anticuerpo de unión al RD del EGFR divulgado a una o más de las células neoplásicas, donde la unión específica del anticuerpo a una o más células neoplásicas indica que el candidato es probable que responda al tratamiento con un inhibidor del EGFR. En algunas realizaciones del método, la unión específica del anticuerpo es al menos el 10% (como, por ejemplo, al menos al 15%, al menos al 20%, al menos al 30%, al menos al 50% o al menos al 75%) de las células neoplásicas en la muestra biológica indica que el candidato es probable que responda al tratamiento con un inhibidor del EGFR.

Otros métodos divulgados implican la predicción de la respuesta de una neoplasia a un inhibidor del EGFR mediante la detección en una muestra biológica que comprende una o más células neoplásicas EGFR positivas de la ausencia de una unión específica de un anticuerpo de unión al RD del EGFR divulgado a una o más células neoplásicas EGFR positivas, donde la ausencia sustancial de una unión específica del anticuerpo a las células neoplásicas EGFR positivas indica que las células neoplásicas no responderán sustancialmente a un inhibidor del EGFR. Algunos de estos métodos implican asimismo la detección en un material biológico de control (como piel normal, testículos normales o amígdalas normales) de la unión específica del anticuerpo al EGFR. Otros de estos métodos implican asimismo la detección en la muestra biológica de la unión específica de un segundo anticuerpo específico para el dominio externo del EGFR.

Otros métodos divulgados implican la predicción de la respuesta de una neoplasia a la administración de un inhibidor del EGFR, mediante la detección de la expresión del EGFR en una primera muestra de un material biológico que comprende una o más células neoplásicas y la detección en una segunda muestra de material biológico de la ausencia sustancial de una unión específica al EGFR de un anticuerpo de unión al RD del EGFR divulgado; donde la detección de la expresión del EGFR en la primera muestra y de la ausencia sustancial de una unión específica al EGFR de un anticuerpo de unión al RD del EGFR divulgado indica que la neoplasia es probable que responda a la administración de un inhibidor del EGFR. En algunos de estos métodos, la primera muestra y la segunda muestra son secciones en serie de material biológico. Otros métodos implican también la detección en un material biológico de control (como piel normal, testículos normales o amígdalas normales) de la unión específica al EGFR del anticuerpo de unión al RD del EGFR divulgado.

Se divulgan asimismo métodos para predecir el pronóstico de una enfermedad neoplásica (como cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico o glioblastoma), incluyendo la detección en una muestra biológica de un paciente que padece una enfermedad neoplásica de la unión específica de un anticuerpo de unión al RD del EGFR divulgado a una o más de las células neoplásicas EGFR positivas en la muestra biológica; donde la unión específica del anticuerpo a una o más de las células neoplásicas EGFR positivas indica un mal pronóstico de la enfermedad neoplásica del paciente. En algunas de las realizaciones de este método, el anticuerpo se une específicamente a al menos el 10% (como al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 50% o al menos el 75%) de las células neoplásicas EGFR positivas de la muestra biológica. En algunas de las realizaciones del método, un mal pronóstico es una supervivencia inferior a cinco años (como una supervivencia inferior a un año o inferior a dos años) del paciente tras el diagnóstico inicial de la enfermedad neoplásica.

Otras realizaciones del método de pronóstico implican la detección en una muestra biológica de un paciente que padece una enfermedad neoplásica (como cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico o glioblastoma) de la unión específica de un anticuerpo de unión al RD del EGFR divulgado a una o más células neoplásicas EGFR positivas en la muestra biológica; donde la ausencia sustancial de una unión específica del anticuerpo a una o más de las células neoplásicas EGFR positivas indica un buen pronóstico de la enfermedad neoplásica en el paciente. En algunas realizaciones del método, un buen pronóstico es una supervivencia superior a dos años (como una supervivencia superior a tres años, superior a cinco años o superior a siete años) del paciente tras el diagnóstico inicial de la enfermedad neoplásica.

También se divulgan métodos de inmunotinción. Estos métodos implican poner en contacto una muestra biológica, que comprende una o más células, con un anticuerpo de unión al RD del EGFR divulgado y la detección de la unión específica del anticuerpo a un antígeno (por ejemplo, EGFR) en una o más células.

Otros métodos divulgados implican la detección de una interacción directa entre el EGFR y una proteína reguladora del EGFR (como una proteína SOCS, por ejemplo SOCS1 o SOCS3), poniendo en contacto una muestra biológica, que comprende una o más células EGFR positivas, con un anticuerpo de unión al RD del EGFR divulgado y detectando la unión específica del anticuerpo a una o más células EGFR positivas, donde la unión específica del anticuerpo a una o más células EGFR positivas detecta que el EGFR no interactúa de forma significativa con una proteína reguladora del EGFR, donde una interacción entre el EGFR y la proteína reguladora del EGFR enmascara el epítipo del anticuerpo.

Se divulgan asimismo otros métodos de detección de una interacción directa entre el EGFR y una proteína reguladora del EGFR (como una proteína SOCS, por ejemplo SOCS1 o SOCS3). Estos métodos implican poner en contacto una muestra biológica, que comprende una o más células EGFR positivas, con un anticuerpo de unión al RD del EGFR divulgado, y detectar la unión específica del anticuerpo a una o más células EGFR positivas, donde la ausencia sustancial de una unión específica del anticuerpo a una o más de las células EGFR positivas detecta que el EGFR está interactuando con una proteína reguladora del EGFR, donde una interacción entre el EGFR y la proteína reguladora del EGFR enmascara el epítipo del anticuerpo.

En cualquier realización del método divulgada que implica una muestra biológica, esta muestra biológica puede ser (aunque no necesariamente) montada en el portaobjetos de un microscopio, es una sección de tejido (como una sección de tejido fijada en formalina y embebida en parafina) y/o es un tejido neoplásico (como un cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico o glioblastoma).

## II. Abreviaturas y términos

EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (p. ej., nº de acceso OMIM 131550)
ICH	Inmunohistoquímica
NSCLC	Cáncer de pulmón no microcítico
RDP	Péptido del dominio regulador del EGFR
RD	Dominio regulador del EGFR
Dominio SH2	Homología al dominio 2 de Src
Proteína SOCS	Proteína supresora de la señalización por citoquinas (p. ej., números de acceso OMIM 604176 o 603597)
STAT	Transductor de la señal y activador de la transcripción

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se emplean de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en la biología celular y molecular se pueden encontrar en Benjamin

Lewin, Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

- 5 A fin de facilitar la revisión de las diversas realizaciones de una invención divulgada, se ofrecen las siguientes explicaciones de términos concretos:

**Molécula de unión a antígeno:** Una molécula que se une específicamente a un epítipo de una molécula diana (por ejemplo, un antígeno, como una proteína o molécula de ácido nucleico). Algunos ejemplos de moléculas de unión a antígeno se proporcionan más adelante en esta divulgación.

- 10 Entre las especies de moléculas de unión a antígeno descritas en el presente se incluyen, a título meramente enunciativo, moléculas de unión específica a una interfaz, moléculas de unión al RD y moléculas de unión a un antígeno de control. Estas especies de moléculas de unión a antígeno se caracterizan por la naturaleza de la molécula diana y/o la ubicación en la molécula diana del epítipo al que las especies se unen específicamente, tal y como se define más detalladamente más adelante en esta divulgación.

- 15 **Epítipo:** Un sitio en una molécula diana (por ejemplo, un antígeno, como una proteína o una molécula de ácido nucleico) al que se une una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una proteína de soporte que contiene regiones de unión del anticuerpo o aptámero). Los epítipos pueden estar formados por residuos contiguos o no contiguos yuxtapuestos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos) de la molécula diana. Los epítipos formados por residuos contiguos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos) típicamente son retenidos por exposición a solventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados mediante plegado terciario típicamente se pierden por tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos 3 y más habitualmente al 5u 8-10 residuos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos). Típicamente un epítipo también tiene menos de 20 residuos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos) de longitud, como menos de 15 residuos o menos de 12 residuos.

- 25 **Inmunógeno:** Una molécula (también denominada antígeno) capaz de provocar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, la producción de anticuerpos) cuando se introduce en un animal con un sistema inmunitario operativo. Algunos ejemplos de inmunógenos incluyendo, por ejemplo, proteínas (o fragmentos de proteína), polisacáridos y pequeñas moléculas (haptenos) o péptidos unidos a una molécula portadora (por ejemplo, una proteína como albúmina de suero bovino («BSA»), hemocianina de lapa californiana («KLH») o polilisina). Un «fragmento inmunogénico» es una porción de un polipéptido u otro inmunógeno que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria por sí mismo o cuando se conjuga con una molécula portadora. Los inmunógenos y los fragmentos inmunogénicos incluyen uno o más epítipos dentro de sus secuencias.

- 35 **Aislado:** Un componente biológico «aislado» (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico, un compuesto químico, proteína u organelo) ha sido sustancialmente aislado o purificado de otros componentes biológicos (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico, compuestos químicos, proteínas u organelos) con los que el componente está mezclado (por ejemplo, en la célula de un organismo o en un extracto de células de una planta). Los ácidos nucleicos, proteínas y compuestos químicos que han sido «aislados» incluyen ácidos nucleicos, proteínas y compuestos químicos purificados mediante métodos de purificación estándar. El término «aislado» abarca asimismo ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula hospedadora, así como compuestos químicos y ácidos nucleicos químicamente sintetizados.

- 40 **Péptido:** Dos o más aminoácidos unidos por un enlace peptídico. Típicamente un péptido contiene menos de cincuenta aminoácidos; por ejemplo, entre aproximadamente 7 y 40 aminoácidos, entre aproximadamente 7 y 30 aminoácidos o entre aproximadamente 7 y 20 aminoácidos.

- 45 **Unión específica** (o derivados obvios de esta expresión, tales como «se une específicamente», «específico para», etc.) se refiere a la interacción particular entre un elemento asociado (como una molécula de unión al RD del EGFR) y otro elemento asociado (como una diana de una molécula de unión al RD del EGFR). Esta interacción está mediada por uno o, típicamente, más enlaces no covalentes entre los elementos asociados de unión (o, a menudo, entre una porción o región específica de cada uno de los elementos asociados de unión). A diferencia de los sitios de unión no específica, los sitios de unión específica son saturables. Por consiguiente, una posible forma de representar la unión específica es mediante una curva de unión específica. Una curva de unión específica muestra, por ejemplo, la cantidad de un elemento asociado (el primer elemento asociado) unida a una cantidad fija del otro elemento asociado, en forma de una función de la concentración del primer elemento asociado. Cuando la concentración de primer elemento asociado aumenta en estas condiciones, la cantidad del primer elemento asociado unido se saturará. También a diferencia de los sitios de unión no específica, los elementos asociados de unión específicos implicados en una asociación directa entre sí (por ejemplo, una interacción proteína-proteína) se pueden retirar competitivamente (o desplazar) de dicha asociación (por ejemplo, del complejo de proteínas) mediante un exceso de cantidades de cualquiera de los elementos asociados de unión específicos. Estos ensayos competitivos (o ensayos de desplazamiento) son bien conocidos en la técnica.

A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos empleados en el presente tienen el significado que habitualmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece una invención divulgada. Los términos singulares «un/una» y «el/la» incluyen sus respectivos plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, se entenderá que el término «o» incluye el término «y» a menos que el contexto indique claramente lo contrario. «Comprende» significa «incluye». Por tanto, «comprende A o B» significa «incluye A» o «incluye B» o «incluye A y B».

A continuación se describen los métodos y materiales adecuados para la práctica y/o el ensayo de las realizaciones de una invención divulgada. Estos métodos y materiales se ofrecen únicamente a título ilustrativo y no pretenden tener carácter limitador. Se pueden emplear otros métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente. Por ejemplo, métodos convencionales bien conocidos en la técnica a la que pertenece una invención divulgada se describen en diversas referencias generales y más específicas, incluyendo, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1992 (y Suplementos hasta 2000); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 4ª ed., Wiley & Sons, 1999; Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; y Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

Todas las secuencias asociadas con los números de acceso GenBank aquí mencionadas se incorporan por referencia en su totalidad tal y como se encontraban a 13 de julio de 2007, en la medida en que lo permitan las normativas y/o la legislación aplicables.

### III. Métodos para determinar interacciones moleculares en muestras biológicas fijadas

Esta divulgación proporciona, entre otras cosas, métodos para identificar interacciones proteína-proteína (o proteína-ácido nucleico) en muestras biológicas (por ejemplo, células o tejidos aislados) que han sido montadas sobre una superficie sólida (por ejemplo, el portaobjetos de un microscopio) y tratadas (por ejemplo, fijadas con formalina y embebidas en parafina («FFPE»)) para mantener sustancialmente las posiciones de los componentes (por ejemplo, proteínas, ARN y/o ADN) dentro de la muestra con respecto a las de los demás componentes.

Las interacciones moleculares (por ejemplo, interacciones proteína-proteína) han sido estudiadas previamente en solución y utilizando técnicas *in vivo*, tales como ensayos de inmunoprecipitación conjunta (donde una proteína de interés es capturada con un anticuerpo y posteriormente se identifica mediante ensayo Western blot cualquier elemento asociado de interacción unido a la proteína); ensayos de interacción (que son similares a los ensayos de inmunoprecipitación conjunta, pero utilizan algún ligando distinto de un anticuerpo para capturar el complejo de proteínas); transferencia de etiquetas (donde una proteína conocida es marcada con una etiqueta detectable y posteriormente la etiqueta se pasa a una proteína que interactúa); enlace cruzado *in vivo* de complejos de proteínas (donde las células se cultivan en condiciones que causan que los análogos de los aminoácidos de diazirina fotorreactivos se incorporen a proteínas celulares, de forma que las diazirinas se puedan activar y unir a proteínas que interactúan); la técnica del doble híbrido en levadura (que investiga la interacción entre proteínas de fusión artificial dentro del núcleo de la levadura); e interferometría de polarización dual («DPI») (que proporciona mediciones de alta resolución en tiempo real del tamaño molecular, la densidad y la masa). Cada uno de los métodos anteriores requiere métodos para aislar (sea físicamente, químicamente o de otro modo) los componentes que tienen una interacción específica entre sí de los demás componentes que no interactúan.

Las reacciones de enlace cruzado no específico (como el enlace cruzado químico) también pueden resultar útiles para examinar interacciones proteína-proteína en entornos en los que se pueden controlar las interacciones no específicas entre los componentes de la reacción. Sin embargo, las muestras biológicas (por ejemplo, células o tejidos aislados) montadas sobre una superficie sólida (por ejemplo, portaobjetos de microscopios o membranas de soporte) no ofrecen este entorno. En estas condiciones, los componentes del enlace cruzado no específico se unen (de forma permanente o semipermanente) a cualquier componente de la muestra que se encuentre próximo, con independencia de que estos componentes interactúen o no en condiciones biológicas.

En lugar de considerar el enlace cruzado no específico como un obstáculo para estudiar las interacciones proteína-proteína, el presente descubrimiento realmente explota el enlace cruzado no específico de componentes biológicos dentro de una muestra biológica fijada (por ejemplo, células FFPE o tejidos FFPE). Este enlace cruzado garantiza sustancialmente que la relación estructural entre los componentes que interactúan en la muestra (por ejemplo, proteína-proteína o proteína-ácido nucleico) se mantenga de forma permanente o semipermanente, enmascarando así parte o la totalidad de los residuos que forman la interfaz entre los componentes. Por ejemplo, cualquier epítipo presente en la interfaz no estaría disponible para un cognado de antígeno-proteína de unión (por ejemplo, anticuerpo) tras la fijación de la muestra. Por consiguiente, la accesibilidad (o no) de los residuos dentro de la interfaz a proteínas de unión (por ejemplo,

anticuerpos) específicas para estos residuos se puede utilizar para determinar si los componentes concretos estaban interactuando o no en la muestra biológica en el momento en el que se fijó.

Algunos métodos divulgados implican la identificación de al menos dos componentes biológicos (por ejemplo, dos proteínas o una secuencia de un ácido nucleico y una proteína) que forman juntos una interacción directa, la determinación de los residuos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos) implicados en la interfaz entre al menos los dos componentes, la identificación o producción de al menos una molécula de unión a antígeno (como un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo) específica para parte o la totalidad de los residuos implicados en la interfaz entre al menos los dos componentes, y la detección en una muestra biológica fijada (como muestras de células fijadas o secciones de tejido FFPE) de la unión (o la ausencia de unión) de al menos una molécula de unión a antígeno específica para la interfaz. En algunos métodos, los componentes que interactúan y los residuos concretos (o regiones) implicados en la interfaz entre al menos los dos componentes son conocidos; por tanto, la identificación de estos componentes y la naturaleza de su interacción serían pasos opcionales del método divulgado.

Dado que la fijación de la interfaz o interfaces entre al menos los dos componentes que interactúan (por ejemplo, proteínas o proteína y ácido nucleico) provoca la exclusión de moléculas de unión a antígeno específicas para la interfaz de los residuos de unión de la interfaz o interfaces, algunos métodos implicarán un resultado negativo (es decir, la ausencia de unión). En algunos de estos métodos, puede resultar recomendable detectar también la presencia de uno o más (por ejemplo, uno o dos) componentes del complejo de interacción; por tanto, el hecho de demostrar que la ausencia de unión de al menos una molécula o moléculas de unión a antígeno específicas para la interfaz con su diana o dianas no se debe a la ausencia de uno o más componentes implicados en la producción de la interfaz o interfaces, sino más bien al enmascaramiento de la diana o dianas.

Las muestras biológicas útiles en un método divulgado son aisladas e incluyen cualquier preparación de células o preparación de tejidos que se pueda fijar y montar en una superficie sólida. Entre los ejemplos de estas muestras se incluyen, a título meramente enunciativo, frotis de sangre, preparados de citocentrifugación, frotis de citología, biopsias de núcleo, aspirados con aguja fina y/o secciones de tejido (por ejemplo, secciones de tejido criostático y/o secciones de tejido embebidas en parafina). Algunos ejemplos de muestras biológicas se pueden aislar de las células o tejidos normales, o de las células o tejidos neoplásicos. Neoplasia es una condición biológica en la que una o más células se han sometido a una anaplasia característica con pérdida de diferenciación, aumento de la tasa de crecimiento, invasión del tejido circundante y en las que las células son susceptibles de metástasis. Algunos ejemplos de células o tejidos neoplásicos se pueden aislar de los tumores sólidos, incluyendo los carcinomas de mama (por ejemplo, carcinomas lobulares y ductales), sarcomas, carcinomas de pulmón (por ejemplo, carcinoma no microcítico, carcinoma de células grandes, carcinoma escamoso y adenocarcinoma), mesotelioma de pulmón, adenocarcinoma colorrectal, carcinoma de estómago, adenocarcinoma prostático, carcinoma de ovario (como cistadenocarcinoma seroso y cistadenocarcinoma mucinoso), tumores de células germinativas del ovario, carcinomas testiculares y tumores de células germinativas testiculares, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma biliar, carcinoma hepatocelular, carcinoma de vejiga (incluyendo, por ejemplo, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma y carcinoma escamoso), adenocarcinoma de células renales, carcinomas endometriales (incluyendo, por ejemplo, adenocarcinomas y tumores mullerianos mixtos (carcinosarcomas)), carcinomas de endocervix, ectocervix y vagina (como adenocarcinoma y carcinoma escamoso de cada uno de estos tres tipos), tumores de piel (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, melanoma y tumores de anexos cutáneos), carcinoma esofágico, carcinomas de la nasofaringe y orofaringe (incluyendo carcinoma escamoso y adenocarcinomas de estos dos tipos), carcinomas de glándulas salivales, tumores de cerebro y del sistema nervioso central (incluyendo, por ejemplo, tumores de origen glial, neuronal y meníngeo), tumores del nervio periférico, sarcomas de tejido blando y sarcomas de hueso y cartílago.

Un soporte sólido útil en un método divulgado solamente necesita portar la muestra biológica y, de forma opcional, aunque recomendable, permitir una detección cómoda de los componentes (por ejemplo, proteínas y/o secuencias de ácido nucleico) en la muestra. Algunos ejemplos de soportes incluyen portaobjetos de microscopios (por ejemplo, portaobjetos de vidrio de microscopios o portaobjetos de plástico de microscopios), cubreobjetos (por ejemplo, cubreobjetos de vidrio o cubreobjetos de plástico), platos de cultivo de tejidos, placas multipocillo, membranas (por ejemplo, nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF)) o chips BIACORE™.

Los fijadores para preparados de células y tejidos montados son bien conocidos en el campo e incluyen, a título meramente enunciativo, un fijador de Bouin 95% alcohólico, un fijador con un 95% de alcohol, un fijador B5, un fijador de Bouin, un fijador de formalina, un fijador de Kamovsky (glutaraldehído), un fijador de Hartman, un fijador de Hollande, una solución de Orth (fijador de dicromato) y un fijador de Zenker (véase, por ejemplo, Carson, *Histotechnology: A Self-Instructional Text*, Chicago:ASCP Press, 1997).

Los componentes biológicos (por ejemplo, proteínas y/o secuencias de ácido nucleico) que forman interacciones directas (como interacciones proteína-proteína) son conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden identificar diversos ejemplos de interacciones proteína-proteína en una o más de las siguientes bases de datos de acceso público: AllFuse (European Bioinformatics Institute), Alanine Scanning Energetics

DataBase (ASEdb; Universidad de Harvard), Binding Interface Database (BID; A & M, Universidad de Texas); The General Repository for Interaction Datasets (BioGRID; Samuel Lunenfeld Research Institute); Biomolecular Object Network Databank (BOND; Thomson Corp.); Database of Interacting Proteins (DIP; UCLA); Genomic Knowledge Database (RIKEN, Institute of Physical and Chemical Research); HIV-1/Human Protein Interaction Database (NCBI); Human Protein Interaction Database (HPID; Universidad de Inha); Human Protein Reference Database (Johns Hopkins University and The Institute of Bioinformatics, India); Inter-Chain Beta-Sheets database (ICBS; University of California); Kinetic Data of Biomolecular Interactions (KDBI; Universidad Nacional de Singapur); Biomolecular Relations in Information Transmission and Expression (KEGG BRITE; Universidad de Kioto); Molecular INTERactions database (MINT; CBM, Roma); Mammalian Protein-Protein Interaction database (MPPI; MIPS); PDZBase (Weill Medical College de la Universidad de Cornell); POINT (National Health Research Institutes y Universidad Nacional de Taiwán); Protein Interactions and Molecular Information database (PRIME; Human Genome Center, Universidad de Tokio); Protein Interaction Database (Protein Lounge); SNAPPView (Universidad de Dundee).

Algunas de las bases de datos anteriores identifican también los residuos o regiones de las proteínas aplicables implicadas en la interfaz proteína-proteína. Alternativamente, los residuos o regiones implicadas en una interacción proteína-proteína se pueden determinar utilizando cualquier técnica conocida por un experto en la técnica; por ejemplo, estudios de competencia de péptidos (donde un péptido que tiene una secuencia correspondiente a los residuos que se consideran implicados en una interfaz proteína-proteína se utiliza para inhibir competitivamente la interacción proteína-proteína; la inhibición con éxito por parte del péptido de la interacción indica que la secuencia del sujeto probablemente está implicada en la interacción proteína-proteína), o análisis mutacional de uno o ambos componentes de la interacción proteína-proteína.

Una vez que una región o residuos de una interfaz entre proteínas que interactúan directamente (o una proteína y una secuencia de ácido nucleico) se conoce o se ha determinado, se puede obtener una molécula de unión que reconoce específicamente la región de interfaz o un epitopo que consiste en residuos de la interfaz (es decir, una molécula de unión específica para la interfaz) de una fuente comercialmente disponible o prepararse utilizando técnicas habituales en la técnica. Por ejemplo, métodos para preparar anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros y otras moléculas de unión a antígeno se describen en detalle más adelante en esta divulgación.

Determinadas realizaciones del método implican la detección en una muestra biológica fijada de un complejo de proteínas que incluye (o se compone de) EGFR y una proteína de interacción con el EGFR (por ejemplo, una proteína reguladora, como una proteína SOCS, como SOCS1 o SOCS3). Se sabe que el EGFR forma interacciones proteína-proteína *in vivo* e *in vitro* con muchas otras proteínas. Algunas de estas interacciones se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de elementos asociados de interacción del EGFR

ELEMENTO ASOCIADO 1	ELEMENTO ASOCIADO 2	SISTEMA	FUENTE	ID PUBMED
AREG	EGFR	<i>In vivo</i>	Wong L <i>et al.</i>	10085134
CD44	EGFR	<i>In vivo</i>	Tsatas D <i>et al.</i>	12093135
EGFR	GRB2	<i>In vivo</i>	Lowenstein EJ <i>et al.</i>	1322798
EGFR	GRB2	<i>In vivo</i>	Okutani T <i>et al.</i>	7527043
EGFR	GRB2	<i>In vitro</i>	Lowenstein EJ <i>et al.</i>	1322798
EGFR	GRB2	<i>In vitro</i>	Okutani T <i>et al.</i>	7527043
EGFR	CTNNB1	<i>In vivo</i>	Takahashi K <i>et al.</i>	9233779
EGFR	CDC25A	<i>In vivo</i>	Wang Z <i>et al.</i>	11912208
EGFR	CDC25A	<i>In vitro</i>	Wang Z <i>et al.</i>	11912208
DCN	EGFR	<i>In vivo</i>	Santra M <i>et al.</i>	12105206
DCN	EGFR	<i>In vivo</i>	lozzo RV <i>et al.</i>	9988678
DCN	EGFR	<i>In vitro</i>	Santra M <i>et al.</i>	12105206
DCN	EGFR	<i>In vitro</i>	lozzo RV <i>et al.</i>	9988678
DCN	EGFR	Doble híbrido	Santra M <i>et al.</i>	12105206
DCN	EGFR	Doble híbrido	lozzo RV <i>et al.</i>	9988678

ES 2 535 319 T3

EGFR	HBEGF	<i>In vivo</i>	Shin SY <i>et al.</i>	12725245
EGF	EGFR	<i>In vitro</i>	Stortelers C <i>et al.</i>	12093292
EGFR	CAV1	<i>In vivo</i>	Couet J <i>et al.</i>	9374534
EGFR	CAV1	<i>In vitro</i>	Couet J <i>et al.</i>	9374534

ELEMENTO ASOCIADO 1	ELEMENTO ASOCIADO 2	SISTEMA	FUENTE	ID PUBMED
EGFR	PRKACA	<i>In vivo</i>	Tortora G <i>et al.</i>	9050991
EGFR	ERBB3	<i>In vivo</i>	Marques MM <i>et al.</i>	10527633
EGFR	SHC1	<i>In vitro</i>	Sakaguchi K <i>et al.</i>	9544989
ITGA5	EGFR	<i>In vitro</i>	Kuwada SK <i>et al.</i>	10888683
ITGA5	EGFR	<i>In vivo</i>	Kuwada SK <i>et al.</i>	10888683
EGFR	ZNF259	<i>In vivo</i>	Moore SL <i>et al.</i>	10938113
EGFR	RASA1	<i>In vitro</i>	Serth J <i>et al.</i>	1633149
PTK2	EGFR	<i>In vivo</i>	Sieg DJ <i>et al.</i>	10806474
PTK2	EGFR	<i>In vitro</i>	Sieg DJ <i>et al.</i>	10806474
PLSCR1	EGFR	<i>In vivo</i>	Sun J <i>et al.</i>	12009895
PLSCR1	EGFR	<i>In vivo</i>	Nanjundan M <i>et al.</i>	12871937
PLSCR1	EGFR	<i>In vitro</i>	Sun J <i>et al.</i>	12009895
PLSCR1	EGFR	<i>In vitro</i>	Nanjundan M <i>et al.</i>	12871937
GRB14	EGFR	<i>In vivo</i>	Daly RJ <i>et al.</i>	8647858
GRB14	EGFR	<i>In vitro</i>	Daly RJ <i>et al.</i>	8647858
EGFR	DOK2	<i>In vitro</i>	Jones N <i>et al.</i>	10508618
KRT7	EGFR	<i>In vivo</i>	Blagoev B <i>et al.</i>	12577067
KRT7	EGFR	<i>In vitro</i>	Blagoev B <i>et al.</i>	12577067
TGFA	EGFR	<i>In vitro</i>	Garrett TP <i>et al.</i>	12297049
EGFR	XRCC6	<i>In vivo</i>	Bandyopadhyay D <i>et al.</i>	9430697
EGFR	PLD2	<i>In vitro</i>	Slaaby R <i>et al.</i>	9837959
EGFR	PLD2	<i>In vivo</i>	Slaaby R <i>et al.</i>	9837959
CD82	EGFR	<i>In vivo</i>	Odintsova E <i>et al.</i>	10985391
CD82	EGFR	<i>In vitro</i>	Odintsova E <i>et al.</i>	10985391
SNX6	EGFR	<i>In vivo</i>	Parks WT <i>et al.</i>	11279102
SNX6	EGFR	<i>In vitro</i>	Parks WT <i>et al.</i>	11279102
EGFR	PTK2B	<i>In vivo</i>	Keely SJ <i>et al.</i>	10777553
GRB10	EGFR	<i>In vivo</i>	Frantz JD <i>et al.</i>	9006901
GRB10	EGFR	<i>In vivo</i>	He W <i>et al.</i>	9506989
GRB10	EGFR	<i>In vitro</i>	Frantz JD <i>et al.</i>	9006901
GRB10	EGFR	<i>In vitro</i>	He W <i>et al.</i>	9506989
PRKCA	EGFR	<i>In vivo</i>	Gauthier ML <i>et al.</i>	12878187

ES 2 535 319 T3

PRKCA	EGFR	<i>In vitro</i>	Gauthier ML <i>et al.</i>	12878187
EGFR	STAT1	<i>In vivo</i>	Xia L <i>et al.</i>	12070153
EGFR	STAT1	<i>In vitro</i>	Xia L <i>et al.</i>	12070153
KRT18	EGFR	<i>In vivo</i>	Blagoev B <i>et al.</i>	12577067
KRT18	EGFR	<i>In vitro</i>	Blagoev B <i>et al.</i>	12577067
EGFR	S0CS3	<i>In vivo</i>	Xia L <i>et al.</i>	12070153
EGFR	S0CS3	<i>In vitro</i>	Xia L <i>et al.</i>	12070153
EGFR	MIG-6	<i>In vivo</i>	Hackel PO <i>et al.</i>	11843178
EGFR	MIG-6	Doble híbrido	Hackel PO <i>et al.</i>	11843178
EGFR	S0CS1	<i>In vivo</i>	Xia L <i>et al.</i>	12070153
PLEC1	EGFR	<i>In vivo</i>	Blagoev B <i>et al.</i>	12577067
PLEC1	EGFR	<i>In vitro</i>	Blagoev B <i>et al.</i>	12577067
EGFR	SNX4	<i>In vivo</i>	Haft CR <i>et al.</i>	9819414
EGFR	PRKAR1A	<i>In vivo</i>	Tortora G <i>et al.</i>	9050991
AMH	EGFR	<i>In vitro</i>	Maggard MA <i>et al.</i>	8596488
EGFR	MAP4K1	<i>In vivo</i>	Anafi M <i>et al.</i>	9346925

ELEMENTO ASOCIADO 1	ELEMENTO ASOCIADO 2	SISTEMA	FUENTE	ID PUBMED
PLCG1	EGFR	<i>In vivo</i>	Bedrin MS <i>et al.</i>	9207933
SNX1	EGFR	<i>In vivo</i>	Haft CR <i>et al.</i>	9819414
SNX1	EGFR	<i>In vivo</i>	Kurten RC <i>et al.</i>	8638121
SNX1	EGFR	Doble híbrido	Haft CR <i>et al.</i>	9819414
SNX1	EGFR	Doble híbrido	Kurten RC <i>et al.</i>	8638121
EGFR	STAT5B	<i>In vivo</i>	Runge DM <i>et al.</i>	10558875
DEGS1	EGFR	<i>In vivo</i>	Cadena DL <i>et al.</i>	9188692
DEGS1	EGFR	<i>In vitro</i>	Cadena DL <i>et al.</i>	9188692
DEGS1	EGFR	Doble híbrido	Cadena DL <i>et al.</i>	9188692
EGFR	PIK3C2B	<i>In vitro</i>	Wheeler M <i>et al.</i>	11533253
KRT17	EGFR	<i>In vivo</i>	Blagoev B <i>et al.</i>	12577067
KRT17	EGFR	<i>In vitro</i>	Blagoev B <i>et al.</i>	12577067
RGS16	EGFR	<i>In vivo</i>	Derrien A <i>et al.</i>	11602604
HD	EGFR	<i>In vivo</i>	Liu YF <i>et al.</i>	9079622
PITPNA	EGFR	<i>In vivo</i>	Kauffmann-Zeh A <i>et al.</i>	7761838
PITPNA	EGFR	<i>In vitro</i>	Kauffmann-Zeh A <i>et al.</i>	7761838
EGFR	CEBPB	<i>In vivo</i>	Harmon AW <i>et al.</i>	12095417
EGFR	CEBPB	<i>In vitro</i>	Harmon AW <i>et al.</i>	12095417
MUC1	EGFR	<i>In vivo</i>	Li Y <i>et al.</i>	11483589
MUC1	EGFR	<i>In vivo</i>	Schroeder JA <i>et al.</i>	11278868

ES 2 535 319 T3

NCK2	EGFR	<i>In vivo</i>	Chen M <i>et al.</i>	9737977
NCK2	EGFR	<i>In vivo</i>	Li W <i>et al.</i>	1333047
EGFR	PTK6	<i>In vivo</i>	Kamalati T <i>et al.</i>	8940083
EGFR	CAV3	<i>In vivo</i>	Couet J <i>et al.</i>	9374534
EGFR	CAV3	<i>In vitro</i>	Couet J <i>et al.</i>	9374534
EGFR	CRK	<i>In vivo</i>	Hashimoto Y <i>et al.</i>	9642287
EGFR	CRK	<i>In vitro</i>	Hashimoto Y <i>et al.</i>	9642287
EGFR	GRB7	<i>In vivo</i>	Tanaka S <i>et al.</i>	9710451
EGFR	GRB7	<i>In vitro</i>	Tanaka S <i>et al.</i>	9710451
EGFR	SNRPD2	<i>In vivo</i>	Blagoev B <i>et al.</i>	12577067
EGFR	SNRPD2	<i>In vitro</i>	Blagoev B <i>et al.</i>	12577067
EGFR	SRC	<i>In vitro</i>	Sato K <i>et al.</i>	10971656
CBLB	EGFR	<i>In vivo</i>	Ettenberg SA <i>et al.</i>	10086340
CBLB	EGFR	<i>In vitro</i>	Ettenberg SA <i>et al.</i>	10086340
EGFR	CBLC	<i>In vivo</i>	Keane MM <i>et al.</i>	10362357
EGFR	CBLC	<i>In vitro</i>	Keane MM <i>et al.</i>	10362357
EGFR	SHC1	<i>In vitro</i>	Blagoev B <i>et al.</i>	12577067
EGFR	PTPN6	<i>In vivo</i>	Keilhack H <i>et al.</i>	9733788
EGFR	PTPN6	<i>In vitro</i>	Keilhack H <i>et al.</i>	9733788
EPS8	EGFR	<i>In vivo</i>	Castagnino P <i>et al.</i>	7532293
EPS8	EGFR	<i>In vivo</i>	Di Fiore PP <i>et al.</i>	12127568
SNX2	EGFR	<i>In vivo</i>	Haft CR <i>et al.</i>	9819414
SNX2	EGFR	<i>In vitro</i>	Haft CR <i>et al.</i>	9819414
TNC	EGFR	<i>In vivo</i>	Swindle CS <i>et al.</i>	11470832
TNC	EGFR	<i>In vitro</i>	Swindle CS <i>et al.</i>	11470832
EGFR	CAMLG	<i>In vivo</i>	Tran DD <i>et al.</i>	12919676
EPPK1	EGFR	<i>In vivo</i>	Blagoev B <i>et al.</i>	12577067

ELEMENTO ASOCIADO 1	ELEMENTO ASOCIADO 2	SISTEMA	FUENTE	ID PUBMED
EPPK1	EGFR	<i>In vitro</i>	Blagoev B <i>et al.</i>	12577067
EGFR	NCK1	<i>In vitro</i>	Tang J <i>et al.</i>	9362449
KRT8	EGFR	<i>In vivo</i>	Blagoev B <i>et al.</i>	12577067
KRT8	EGFR	<i>In vitro</i>	Blagoev B <i>et al.</i>	12577067
EGFR	TJP1	<i>In vivo</i>	Kaihara T <i>et al.</i>	12708492
VAV1	EGFR	<i>In vivo</i>	Moore SL <i>et al.</i>	10938113
EGFR	STAT5A	<i>In vivo</i>	Olayioye MA <i>et al.</i>	10358079
EGFR	GAB1	<i>In vivo</i>	Kameda H <i>et al.</i>	11432805
EGFR	TNK2	<i>In vivo</i>	Manser E <i>et al.</i>	8497321
EGFR	TNK2	<i>In vivo</i>	Satoh T <i>et al.</i>	8647288

ES 2 535 319 T3

EGFR	VAV2	<i>In vivo</i>	Pandey A <i>et al.</i>	10618391
EGFR	VAV2	<i>In vivo</i>	Moore SL <i>et al.</i>	10938113
EGFR	VAV2	<i>In vitro</i>	Pandey A <i>et al.</i>	10618391
EGFR	VAV2	<i>In vitro</i>	Moore SL <i>et al.</i>	10938113
SOS1	EGFR	<i>In vivo</i>	Qian X <i>et al.</i>	9447973
EGFR	MAP3K14	<i>In vivo</i>	Habib AA <i>et al.</i>	11116146
EGFR	ESR1	<i>In vitro</i>	Marquez DC <i>et al.</i>	11887937
EGFR	ERBB2	<i>In vivo</i>	BrockhoffGe/tf/.	11500850
EGFR	ERBB2	<i>In vitro</i>	BrockhoffGe/a/.	11500850
SH2D3A	EGFR	<i>In vivo</i>	Lu Y <i>et al.</i>	10187783
CDH1	EGFR	<i>In vivo</i>	Pece S <i>et al.</i>	10969083
EGFR	PTPN1	<i>In vivo</i>	Zhang ZY <i>et al.</i>	8621392
EGFR	PTPN1	<i>In vivo</i>	Jia Z <i>et al.</i>	7540771
EGFR	PTPN1	<i>In vivo</i>	Sarmiento M <i>et al.</i>	10889023
EGFR	PTPN1	<i>In vivo</i>	Li S <i>et al.</i>	12573287
EGFR	PTPN1	<i>In vitro</i>	Zhang ZY <i>et al.</i>	8621392
EGFR	PTPN1	<i>In vitro</i>	Jia Z <i>et al.</i>	7540771
EGFR	PTPN1	<i>In vitro</i>	Sarmiento M <i>et al.</i>	10889023
EGFR	PTPN1	<i>In vitro</i>	Li S <i>et al.</i>	12573287
VAV3	EGFR	<i>In vivo</i>	Zeng L <i>et al.</i>	11094073
INPPL1	EGFR	<i>In vitro</i>	Pesesse X <i>et al.</i>	11349134
INPPL1	EGFR	<i>In vivo</i>	Pesesse X <i>et al.</i>	11349134
EPS 15	EGFR	<i>In vivo</i>	van Delft S <i>et al.</i>	9049247
EGFR	ARF4	<i>In vitro</i>	Kim SW <i>et al.</i>	12446727
EGFR	ARF4	<i>In vivo</i>	Kim SW <i>et al.</i>	12446727
EGFR	ARF4	Doble híbrido	Kim SW <i>et al.</i>	12446727
EGFR	GNAI2	<i>In vivo</i>	Zhang BH <i>et al.</i>	11286993
EGFR	PDGFRB	<i>In vivo</i>	Habib AA <i>et al.</i>	9506992
SHC3	EGFR	<i>In vivo</i>	Nakamura T <i>et al.</i>	9507002
EGFR	BTC	<i>In vivo</i>	Mixan B <i>et al.</i>	9528863
EGFR	SOS2	<i>In vivo</i>	Qian X <i>et al.</i>	10675333
NRG1	EGFR	<i>In vitro</i>	Pinkas-Kramarski R <i>et al.</i>	8702572
EGFR	CASP1	<i>In vivo</i>	Bae SS <i>et al.</i>	11226410
EGFR	CASP1	<i>In vitro</i>	Bae SS <i>et al.</i>	11226410
EGFR	EREG	<i>In vivo</i>	Komurasaki T <i>et al.</i>	9419975
EGFR	PTPN11	<i>In vitro</i>	Tomic S <i>et al.</i>	7673163
EGFR	PTPN11	<i>In vivo</i>	Tomic S <i>et al.</i>	7673163
PTPRJ	EGFR	<i>In vivo</i>	Jallal B <i>et al.</i>	9115287

ELEMENTO ASOCIADO 1	ELEMENTO ASOCIADO 2	SISTEMA	FUENTE	ID PUBMED
EGFR	RIPK1	<i>In vivo</i>	Habib AA <i>et al.</i>	11116146
FER	EGFR	<i>In vivo</i>	Kiin L <i>et al.</i>	7623846

Las interacciones proteína-proteína típicamente influyen en la actividad de uno o ambos elemento asociados que interactúan. Por ejemplo, una interacción proteína-proteína puede provocar la regulación negativa (por ejemplo, inhibición) de uno o ambos elemento asociados, o puede provocar la regulación positiva (por ejemplo, activación) de uno o ambos elemento asociados. También resultan posibles otros resultados funcionales. Algunos ejemplos de reguladores negativos del EGFR que forman interacciones proteína-proteína con el EGFR incluyen, por ejemplo, SOCS1, SOCS3, SOCS5, y C-CBL. Algunos ejemplos de reguladores positivos del EGFR que forman interacciones proteína-proteína con el EGFR incluyen, por ejemplo, STAT1, STAT5B, GRB7, HER2, y MUC1.

Los métodos útiles para la detección de una interacción proteína-proteína que utiliza una molécula de unión específica a una interfaz (como un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, anticuerpo recombinante, polipéptido de soporte con sitios de unión a anticuerpo y/o un adaptómero) son bien conocidos en la técnica. En algunos ejemplos, se pone en contacto una muestra biológica fijada con una molécula de unión específica para la interfaz en condiciones que permiten (o permitirían en caso de que fuese accesible) la unión de la molécula de unión específica para la interfaz a su epítopo en la interfaz entre las proteínas que interactúan. Opcionalmente, se realiza una reacción de control (por ejemplo, simultánea, con anterioridad o *a posteriori*) al objeto de garantizar que las condiciones sean adecuadas para que se produzca la detección de la reacción. Por ejemplo, la muestra biológica (o una sección en serie o una muestra de células preparada en paralelo) también se puede poner en contacto con una molécula de unión al antígeno de control (como un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, anticuerpo recombinante, polipéptido de soporte con sitios de unión a anticuerpo y/o un aptámero). La molécula de unión a antígeno de control se une específicamente a un componente de la muestra que no interactúa, i) que no está implicado en el complejo proteína-proteína de interés, y ii) cuyo epítopo se sabe que está presente y resulta detectable en la muestra bajo las condiciones de detección concretas.

En los métodos de ejemplo, una molécula de unión específica para la interfaz y una molécula de unión a antígeno de control opcional son anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) o fragmentos de anticuerpos. La detección de estos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se realiza mediante inmunotinción, tal y como se ilustra en la Fig. 1, que es una técnica estándar en la técnica. La detección puede ser directa o indirecta. Con la detección directa, los anticuerpos primarios (es decir, los anticuerpos que se unen específicamente al componente o los componentes biológicos de interés en la muestra) son directamente etiquetados, por ejemplo, con una fracción detectable o con una enzima que cataliza una reacción que produce un producto detectable. Con la detección indirecta, se utilizan uno o más reactivos secundarios (como anticuerpos secundarios, terciarios, etc.) para detectar el anticuerpo primario (y, cuando corresponde, los anticuerpos secundarios o subsiguientes) y el último de estos reactivos resulta detectable, por ejemplo etiquetándolo con una fracción detectable o con una enzima que cataliza una reacción que produce un producto detectable. En los Ejemplos se proporcionan procedimientos de inmunotinción representativos.

Algunos métodos divulgados implican la detección dual de un epítopo de dominio externo presente en el EGFR y un epítopo de dominio interno (o dominio regulador) del EGFR. El dominio regulador del EGFR dispone de múltiples sitios de unión para las proteínas reguladoras (véase, por ejemplo, la Fig. 2). Por consiguiente, los epítopos del dominio regulador del EGFR pueden no resultar accesibles en muestras biológicas fijadas, donde, en el momento de la fijación, el EGFR estaba implicado en una interacción proteína-proteína con una o más de sus proteínas reguladoras (como una proteína SOCS, como por ejemplo SOCS1 o SOCS3). En comparación, el dominio externo del EGFR funciona principalmente como un dominio de unión a ligando y, típicamente, no está enmascarado para los anticuerpos específicos para los epítopos del dominio externo. Por consiguiente, en algunos métodos, una molécula de unión a antígeno específica para el dominio externo del EGFR (anticuerpo anti-dominio externo del EGFR o un fragmento del mismo) puede servir como control para una molécula de unión a antígeno específica para un epítopo (potencialmente enmascarado) de la interfaz de una proteína reguladora del EGFR. Cabe señalar que el EGR puede «despojarse» de su dominio externo o puede ser mutante y carecer de su dominio externo (Pedetersen et al., *Ann. Oncol.*, 6:745, 2001). En tales circunstancias, una molécula de unión a antígeno específica para el dominio externo del EGFR (por ejemplo, un anticuerpo anti-dominio externo del EGFR o un fragmento del mismo) no tendría una diana a la que unirse y, por tanto, no sería detectada. Esta circunstancia (y a partir de estas circunstancias se puede obtener información útil) se debate detalladamente más adelante en esta divulgación.

Algunas de las anteriores realizaciones del método y otras realizaciones del método de la presente divulgación implican la ausencia sustancial de una unión específica de una molécula de unión al RD (como un anticuerpo monoclonal) a su epítopo (por ejemplo, que se encuentra ubicado en la interfaz proteína-proteína entre el EGFR y su molécula o moléculas reguladoras). La ausencia sustancial de unión puede ser determinada por

cualquier método del que dispongan los expertos en la técnica. Por ejemplo, la ausencia sustancial de unión de una molécula de unión al RD puede estar relacionada con la unión de la misma molécula de unión al RD en condiciones sustancialmente iguales en otra muestra en la que el epitopo de la molécula de unión al RD se sabe que está accesible. En otro ejemplo, la ausencia sustancial de unión de una molécula de unión al RD puede significar que los medios de detección (por ejemplo, la etiqueta detectable o el reactivo colorimétrico) empleados para visualizar la unión específica de la molécula de unión a RD no se pueden observar en condiciones normales para esa detección, por ejemplo bajo la luz o en un microscopio de fluorescencia con un aumento de 4X, 10X o 40X. En otra muestra más, la ausencia sustancial de unión de una molécula de unión al RD significa que la molécula de unión al RD tiene menos de aproximadamente un 25% (como menos de aproximadamente un 20%, menos de aproximadamente un 15%, menos de aproximadamente un 10%, menos de aproximadamente un 5% o menos de aproximadamente un 1%) de su unión en circunstancias de control (por ejemplo, en una muestra de tejido o de células en la que se sabe que su epitopo se encuentra accesible).

#### IV. Métodos predictivos

El descubrimiento en el presente de métodos para detectar interacciones moleculares del EGFR en muestras biológicas fijadas abre el camino para predecir el estado del EGFR e importantes corolaños en estas muestras o en sujetos a los que se toman esas muestras, por ejemplo, en células y/o tejidos neoplásicos en los que se cree que la sobreexpresión del EGFR desempeña un papel importante en la tumorigénesis (por ejemplo, Arnold *et al.*, *Oncologist*, 6:602, 2006) y/o en pacientes con cáncer. Los métodos predictivos divulgados son aplicables para cualquier tipo de cáncer o a un sujeto con cualquier tipo de cáncer, por ejemplo los cánceres con una expresión (o sobreexpresión) del EGFR. Algunos ejemplos de neoplasias útiles en todos los métodos divulgados (incluyendo métodos predictivos) se describen más abajo en esta divulgación (por ejemplo, en la Sección III y en los Ejemplos). Las realizaciones concretas del método predictivo incluyen el cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, de próstata y/o glioblastoma y/o los sujetos que tienen cualquiera de estos cánceres.

##### A. Predicción de la agresividad de las neoplasias EGFR positivas

La detección de una interacción directa (por ejemplo, proteína-proteína) entre el EGFR y un regulador negativo de la función del EGFR (por ejemplo, una proteína SOCS, como SOCS1, SOCS3 o SOCS5) predice la inhibición de la función del EGFR en esa muestra biológica. La función de inhibición del EGFR tiene consecuencias importantes en muchas células y tejidos. Por ejemplo, en células y tejidos neoplásicos en los que se cree que la sobreexpresión del EGFR desempeña un papel en la tumorigénesis (por ejemplo, Arnold *et al.*, *Oncologist*, 6:602, 2006), la detección de una interacción directa entre el EGFR y un regulador negativo de la función del EGFR (por ejemplo, una proteína SOCS, como SOCS1 o SOCS3) predice además que una neoplasia puede ser menos agresiva (por ejemplo, de crecimiento menos rápido y/o con menos probabilidades de metástasis). También se puede predecir un mejor pronóstico (con independencia de la terapia) para un sujeto con esta neoplasia.

Por otra parte, la detección de una interacción directa entre el EGFR y un regulador positivo de la función del EGFR (por ejemplo, STAT1, STAT5B, GRB7, HER2 y/o MUC1) predice la activación de la función del EGFR en esa muestra biológica (por ejemplo, células o tejidos neoplásicos). Por los motivos opuestos a los anteriormente mencionados, también se puede predecir un peor pronóstico (con independencia de la terapia) para un sujeto con esa neoplasia.

Un tumor menos agresivo se puede caracterizar por cualesquiera parámetros conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, una menor tasa de crecimiento (por ejemplo, una mayor tasa de apoptosis y/o una menor tasa de división celular), una menor tasa de metástasis y/o una mayor sensibilidad a la quimioterapia.

El pronóstico para esta sujeto se puede caracterizar por cualquier parámetro conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la supervivencia real tras el diagnóstico inicial (como seis meses de supervivencia, un año de supervivencia, dos años de supervivencia o cinco años de supervivencia) y/o la supervivencia real con respecto a la supervivencia media de pacientes en una situación similar. Un mejor pronóstico implica, por ejemplo, la supervivencia de un paciente más de un año tras el diagnóstico inicial (como más de dos años o más de cinco años) o la supervivencia de un paciente durante seis meses más (por ejemplo, durante un año más, durante dos años más, durante cinco años más) que la supervivencia media de los pacientes en su misma situación. Un peor pronóstico implica, por ejemplo, la supervivencia de un paciente durante menos de cinco años tras el diagnóstico inicial (como menos de dos años o menos de un año) o la supervivencia de un paciente durante menos tiempo que la supervivencia media de los pacientes en una situación similar (por ejemplo, unos tres meses menos que la supervivencia media, unos seis meses menos que la supervivencia media o aproximadamente un año menos que la supervivencia media).

Los ejemplos de pronósticos basados en la detección de una interacción (o falta de interacción) entre el EGFR y, por ejemplo, un regulador negativo que se une al dominio regulador del EGFR (por ejemplo una proteína SOCS, como SOCS1 y/o SOCS3) se muestran esquemáticamente en la Fig. 3.

##### B. Predicción de la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer a la terapia inhibidora del EGFR

Los métodos para detectar una interacción (o falta de interacción) entre el EGFR y, por ejemplo, su regulador o reguladores negativos (por ejemplo, una proteína SOCS, como SOCS1 y/o SOCS3) permiten diversas predicciones con respecto al resultado de una terapia inhibitora del EGFR en un paciente con cáncer. Las terapias inhibitoras del EGFR incluyen al menos dos clases de fármacos: Terapias de anticuerpos del EGFR (tales como, cetuximab (Erbix™), panitumumab (Vectibix™), IMC-11F8 (Imclone), matuzumab (MerckKGA)) e inhibidores de la tirosina quinasa («TKI») (como gefitinib (Iressa™), erlotinib (Tarceva™), lapatinib ditosilato (GlaxoSmithKline), HKI-272 (Wyeth), AEE788 (Novartis), vandetanib (Zactima™; Astrazeneca), XL647 (Exelixis), BMS-599626 (Bristol-Myers Squibb), BIBW 2992 (Boehringer Ingelheim)). Las terapias de anticuerpos del EGFR se dirigen típicamente al dominio externo del EGFR y bloquean la unión de un ligando del EGFR (como EGF) al receptor, inhibiendo así la activación del EGFR. Los TKI funcionan inhibiendo el dominio de la quinasa intracelular el EGFR, que también inhibe la activación del EGFR.

Algunas realizaciones del método implican una o las dos clases anteriores de inhibidores del EGFR. Las realizaciones concretas del método implican la predicción de la respuesta de los pacientes con cáncer al cetuximab (Erbix™), panitumumab (Vectibix™), gefitinib (Iressa™), o erlotinib (Tarceva™), o a cualquier combinación de los mismos (tales como, cetuximab (Erbix™) o panitumumab (Vectibix™), gefitinib (Iressa™) o erlotinib (Tarceva™), o cetuximab (Erbix™), panitumumab (Vectibix™), gefitinib (Iressa™) o erlotinib (Tarceva™)).

Algunos ejemplos de predicciones basadas en la detección de una interacción (o falta de interacción) entre el EGFR y, por ejemplo, un regulador negativo que se une al dominio regulador del EGFR (por ejemplo, una proteína SOCS, como SOCS1 y/o SOCS3) se proporcionan en la Tabla 2 y se muestran esquemáticamente en la Fig. 3.

Tabla 2. Ejemplo de respuesta terapéutica pronosticada

	Molécula de unión a ID	Molécula de unión a ED	Implicación del EGFR	Terapia	Respuesta terapéutica pronosticada
1	Positivo	Positivo	EGFR está presente RDIM (p. ej., SOCS3) está ausente	Terapia basada en ED (p. ej., EGFR Ab)	Sensible
				Terapia basada en ID (p. ej., TKI)	Sensible
2	Negativo	Positivo	EGFR está presente RDIM (p. ej., SOCS3) está presente	Terapia basada en ED (p. ej., EGFR Ab)	Resistente
				Terapia basada en ID (p. ej., TKI)	Resistente
3	Positivo	Negativo	EGFR mutante/clivado está presente RDIM (p. ej., SOCS3) está ausente	Terapia basada en ED (p. ej., EGFR Ab)	Resistente
				Terapia basada en ID (p. ej., TKI)	Sensible
4	Negativo	Negativo	EGFR está ausente	Terapia basada en ED (p. ej., EGFR Ab)	Sin respuesta
				Terapia basada en ID (p. ej., TKI)	Sin respuesta

ID = dominio interno (o regulador del EGFR); ED = dominio extracelular del EGFR; RDIM = molécula inhibitora del dominio regulador; Ab = anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo monoclonal u otro anticuerpo modificado)

En una realización del método, una interacción entre el dominio regulador interno del EGFR y su regulador negativo (por ejemplo, una proteína SOCS, como SOCS1 y/o SOCS3) se detecta (por ejemplo, enmascarando el epitopo de una molécula de unión específica a la interfaz (como un anticuerpo monoclonal, incluyendo el clon 5B7 (véanse, por ejemplo, los Ejemplos)). De manera opcional, aunque recomendable, la presencia del EGFR de longitud completa (o longitud sustancialmente completa) también se detecta utilizando una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, incluyendo el clon 3C6) específica para el

dominio externo del EGFR. En este ejemplo, la molécula de unión específica para la interfaz (por ejemplo, el clon 5B7) está excluida de su sitio de unión y, por tanto, no se detecta, mientras que la molécula de unión a antígeno del dominio externo (por ejemplo, clon 3C6) se une a su epitopo y se detecta. Estas circunstancias respaldan la predicción de que una terapia diseñada para inhibir la función del EGFR probablemente no sería efectiva o sería menos efectiva que en ausencia del regulador negativo. Es decir (únicamente a título ilustrativo (y sin limitarse a un mecanismo ni a la implicación de un mecanismo)): Proporcionar un inhibidor del EGFR a un sujeto en el que la función del EGFR ya estaba inhibida puede ser análogo a usar los frenos en un vehículo que ya estaba parado.

En otra realización del método, la interacción entre el dominio regulador interno del EGFR y su regulador negativo (por ejemplo, una proteína SOCS, como SOCS1 y/o SOCS3) no se produce (por ejemplo, como se demuestra por la unión al EGFR de una molécula de unión específica para la interfaz (como un anticuerpo monoclonal, incluyendo el clon 5B7 (véanse, por ejemplo, los Ejemplos)) a su epitopo, que de otro modo estaría enmascarada por la interacción del regulador EGFR negativo). De manera opcional, aunque recomendada, la presencia del dominio externo del EGFR (es decir, el EGFR de longitud completa o longitud sustancialmente completa) también se detecta utilizando una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, incluyendo el clon 3C6) específico para ese dominio. En este ejemplo, la molécula de unión específica para la interfaz (por ejemplo, clon 5B7) se une específicamente a su epitopo en el dominio regulador del EGFR y, por tanto, se detecta y la molécula de unión a antígeno del dominio externo (por ejemplo, clon 3C6) también se une a su epitopo y se detecta. Estas circunstancias respaldan la predicción de que una terapia diseñada para inhibir la función del EGFR probablemente sería efectiva o sería más efectiva que en presencia del regulador negativo.

En otra realización más del método, una interacción entre el dominio regulador interno del EGFR y su regulador negativo (por ejemplo, una proteína SOCS, como SOCS1 y/o SOCS3) no se produce (por ejemplo, como se demuestra por la unión al EGFR de una molécula de unión específica para la interfaz (como un anticuerpo monoclonal, incluyendo el clon 5B7 (véanse, por ejemplo, los Ejemplos)) a su epitopo, que de otro modo estaría enmascarado por la interacción del EGFR-regulador negativo). De manera opcional, aunque recomendada, la presencia o ausencia del dominio externo del EGFR (es decir, el EGFR de longitud completa o sustancialmente completa) también se detecta utilizando una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, incluyendo el clon 3C6) específica para ese dominio. En este ejemplo, la molécula de unión específica para la interfaz (por ejemplo, el clon 5B7) se une específicamente a su epitopo en el dominio regulador del EGFR y, por tanto, se detecta; sin embargo, también se determina que el dominio externo del EGFR está ausente (por ejemplo, un EGFR mutante o de extremo N-terminal truncado) por la ausencia de unión de una molécula de unión a antígeno específica para ese dominio (por ejemplo, anticuerpo monoclonal, incluyendo el clon 3C6). Estas circunstancias respaldan la predicción de que una terapia de anticuerpo diseñada para inhibir la función del EGFR bloqueando la unión del ligando al dominio externo del EGFR no sería efectiva por la ausencia de ese dominio. Por otra parte, estas circunstancias respaldan además la predicción de que una terapia de TK1, que inhibe la actividad de la tirosina quinasa localizada en el dominio intracelular del EGFR, probablemente sería efectiva o sería más efectiva que en presencia del regulador negativo.

La respuesta de un sujeto a la terapia inhibidora del EGFR se puede medir a través de cualquier parámetro relevante conocido en la técnica. En algunas realizaciones del método, la respuesta del sujeto es la interrupción o ralentización del crecimiento tumoral (medida, por ejemplo, por el tamaño del tumor), una reducción de la proliferación de las células tumorales, una mayor apoptosis de las células tumorales y/o una reducción del nivel del marcador o los marcadores tumorales relevantes. En otras realizaciones del método, la respuesta de un sujeto es una ralentización de al menos el 50% del crecimiento tumoral o de la proliferación de las células tumorales en comparación con el crecimiento anterior al tratamiento (como, al menos una ralentización del 40%, al menos una ralentización del 30%, al menos una ralentización del 20% o al menos una ralentización del 10%). En otras realizaciones del método, una respuesta del sujeto es al menos un incremento del 50% de la apoptosis de las células tumorales en comparación con los niveles previos al tratamiento (como al menos un incremento del 40%, al menos un incremento del 30%, al menos un incremento del 20% o al menos un incremento del 10%).

## V. Péptidos del dominio regulador del EGFR

La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, al descubrimiento de una región de 19 aminoácidos del EGFR que se puede utilizar, por ejemplo, para comprobar el estado estructural y/o funcional del receptor. Esta región tiene la secuencia: LDNPDYQQDFFPKEAKPNG (SEC. ID. N° 2; «Péptido L2G»). Se encuentra en el dominio intracelular (o citoplasmático) C-terminal del EGFR (para consultar los ejemplos de secuencias del EGFR, véanse, por ejemplo, los números de acceso GENBANK™ XP001156546.1; XP\_001156495.1; XP519102.2; XP\_001156439.1; BAD92679.1; AAS07524.1; AAX41033.1; NPI 13695.1; AAT52212.1; NP 005219.2; y CAA25240.1, donde la secuencia presente a 13 de julio de 2007 queda incorporada al presente por referencia).

El dominio intracelular del EGFR, que corresponde a los residuos 669-1210 de la SEC. ID. N° 1, incluye un dominio quinasa (residuos 712-979 de la SEC. ID. N° 1) y un dominio regulador (residuos 980-1210). El

dominio regulador del EGFR incluye al menos cinco residuos de tirosina (Tyr1016, Tyr1092, Tyr1110, Tyr1172, y Tyr1197 de la SEC. ID. N° 1), que se cree que son sitios de autofosforilación (Chattopadhyay *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:26091-7, 1999). Entre todos los residuos de tirosina C-terminales, hay tres motivos YXXL/V (SEC. ID. N° 4) y cuatro YXXP/D (SEC. ID. N° 5), que, para muchos receptores transmembrana, sirven de sitios de acoplamiento para las proteínas que contienen homología al dominio 2 de Src (SH2) (Xia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277(34):30716-23, 2002). Como clase, las proteínas que contienen el dominio SH2 son reguladores dependientes de fosforilación aceptados de las cascadas de la señal intracelular.

El dominio regulador del EGFR contiene un subdominio inhibidor (Xia *et al.*,

*J. Biol. Chem.*, 277(34):30716-23, 2002), que corresponde a los residuos 1138-1196 de la SEC. ID. N° 1. La secuencia del Péptido L2G está incluida en este subdominio inhibidor. Se cree que el subdominio inhibidor al menos media una interacción proteína-proteína entre el EGFR y las proteínas SOCS (por ejemplo, SOCS1 y SOCS3) (Xia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277(34):30716-23, 2002). Se cree que la interacción entre el EGFR y las proteínas SOCS estimula además la degradación proteasomal del complejo del EGFR y/o induce la degradación de las proteínas STAT asociadas al EGFR y/o bloquea el EGFR del posterior reclutamiento y activación de proteínas STAT (Xia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277(34):30716-23, 2002). En cada caso, la interacción de la proteína SOCS (por ejemplo, SOCS1 y/o SOCS3) inhibe directa o indirectamente la actividad del EGFR.

Como se ha demostrado en esta divulgación, los epitopos presentes en la secuencia del Péptido L2G del EGFR son inaccesibles para las moléculas de unión al RD cognadas (por ejemplo, anticuerpos) en algunos tejidos normales o neoplásicos. La accesibilidad de este epitopo se restaura en tejidos que carecen de proteínas que normalmente se unen al dominio regulador del EGFR y al subdominio inhibidor del EGFR. Por tanto, el Péptido L2G divulgado y otros RDP obtenidos de este resultan útiles, al menos, para producir moléculas de unión al RD (tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, polipéptidos de soporte que incluyen dominios de unión a anticuerpo y aptámeros) que exponen los estados estructurales y funcionales correspondientes del EGFR.

En una realización, un RDP divulgado es el Péptido L2G, que tiene la secuencia LDNPDYQQDFFPKAKPNG (SEC. ID. N° 2). En algunas realizaciones también se contemplan fragmentos inmunogénicos del Péptido L2G, fragmentos que pueden ser útiles para producir una molécula de unión a RD divulgada. Por ejemplo, tal y como se demuestra en el Ejemplo 4, al menos la subsecuencia QQDFFPK (residuos 7-13 de la SEC. ID. N° 2) es suficiente para producir una molécula de unión a RD divulgada (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal). Por tanto, en algunas realizaciones, un fragmento inmunogénico de la SEC. ID. N° 2 tiene al menos 7 residuos contiguos de la SEC. ID. N° 2 e incluye la secuencia QQDFFPK (residuos 7-13 de la SEC. ID. N° 2). En realizaciones más concretas, un fragmento inmunogénico de la SEC. ID. N° 2 tiene entre 7 y 18 residuos contiguos de la SEC. ID. N° 2 e incluye la secuencia QQDFFPK (residuos 7-13 de la SEC. ID. N° 2). En otras realizaciones específicas, un fragmento inmunogénico de la SEC. ID. N° 2 tiene entre 10 y 18 residuos contiguos de la SEC. ID. N° 2 e incluye la secuencia QQDFFPK (residuos 7-13 de la SEC. ID. N° 2). En cada caso, un fragmento inmunogénico de la SEC. ID. N° 2 tiene una función descrita en el presente (véase, por ejemplo, Abreviaturas y términos) o de otro modo conocida en la técnica.

Asimismo, al menos dado que la secuencia QQDFFPK (residuos 7-13 de la SEC. ID. N° 2) es suficiente para producir una molécula de unión a antígeno divulgada, otras realizaciones del RDP tienen la secuencia de consenso XI-6QQDFFPKX7-12 (SEC. ID. N° 6), donde XI a X12 son cualquier aminoácido. En realizaciones más específicas, un Péptido L2G tiene la secuencia X1-6QQDFFPKX7-12 (SEC. ID. N° 6), donde XI a X12 son cualquier sustitución conservadora (por ejemplo, sustitución muy altamente conservada, sustitución altamente conservada o sustitución conservada) del residuo de aminoácido correspondiente de la SEC. ID. N° 2. En la siguiente tabla se recogen algunos ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservadoras:

Residuo original	Sustituciones muy altamente conservadas	Sustituciones altamente conservadas (de Blosum90 Matrix)	Sustituciones conservadas (de la Blosum65 Matrix)
Ala	Ser	Gly, Ser, Thr	Cys, Gly, Ser, Thr, Val
Arg	Lys	Gin, His, Lys	Asn, Gin, Glu, His, Lys
Asn	Gin; His	Asp, Gin, His, Lys, Ser, Thr	Arg, Asp, Gin, Glu, His, Lys, Ser, Thr
Asp	Glu	Asn, Glu	Asn, Gin, Glu, Ser
Cys	Ser	Ninguno	Ala
Gin	Asn	Arg, Asn, Glu, His, Lys, Met	Arg, Asn, Asp, Glu, His, Lys, Met, Ser

<b>Glu</b>	<b>Asp</b>	<b>Asp, Gin, Lys</b>	<b>Arg, Asn, Asp, Gin, His, Lys, Ser</b>
<b>Gly</b>	<b>Pro</b>	<b>Ala</b>	<b>Ala, Ser</b>
<b>His</b>	<b>Asn; Gin</b>	<b>Arg, Asn, Gin, Tyr</b>	<b>Arg, Asn, Gin, Glu, Tyr</b>
<b>He</b>	<b>Leu; Val</b>	<b>Leu, Met, Val</b>	<b>Leu, Met, Phe, Val</b>
<b>Leu</b>	<b>lie; Val</b>	<b>He, Met, Phe, Val</b>	<b>He, Met, Phe, Val</b>

<b>Residuo original</b>	<b>Sustituciones muy altamente conservadas</b>	<b>Sustituciones altamente conservadas (de Blosum90 Matrix)</b>	<b>Sustituciones conservadas (de la Blosum65 Matrix)</b>
<b>Lys</b>	<b>Arg; Gin; Glu</b>	<b>Arg, Asn, Gin, Glu</b>	<b>Arg, Asn, Gin, Glu, Ser,</b>
<b>Met</b>	<b>Leu; He</b>	<b>Gin, lie, Leu, Val</b>	<b>Gin, He, Leu, Phe, Val</b>
<b>Phe</b>	<b>Met; Leu; Tyr</b>	<b>Leu, Trp, Tyr</b>	<b>He, Leu, Met, Trp, Tyr</b>
<b>Ser</b>	<b>Thr</b>	<b>Ala, Asn, Thr</b>	<b>Ala, Asn, Asp, Gin, Glu, Gly, Lys, Thr</b>
<b>Thr</b>	<b>Ser</b>	<b>Ala, Asn, Ser</b>	<b>Ala, Asn, Ser, Val</b>
<b>Trp</b>	<b>Tyr</b>	<b>Phe, Tyr</b>	<b>Phe, Tyr</b>
<b>Tyr</b>	<b>Trp; Phe</b>	<b>His, Phe, Trp</b>	<b>His, Phe, Trp</b>
<b>Val</b>	<b>lie; Leu</b>	<b>lie, Leu, Met</b>	<b>Ala, He, Leu, Met, Thr</b>

5 Algunos ejemplos de RDP tienen la secuencia de consenso X1-6QQDFFPKX7-12, (SEC. ID. Nº 6) donde cualesquiera 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o 11 o bien los 12 residuos XI a X12 tendrán cambios de aminoácidos conservadores (como sustituciones muy altamente conservadas, sustituciones altamente conservadas o sustituciones conservadas) en comparación con la SEC. ID. Nº 2 y, cuando resulte aplicable, los restantes residuos no presentarán ningún cambio en comparación con la SEC. ID. Nº 2.

10 En otras realizaciones, un RDP es una variante de la secuencia de un Péptido L2G que tiene al menos un 99%, al menos un 98%, al menos un 95%, al menos un 92%, al menos un 90%, al menos un 85%, al menos un 80%, al menos un 75%, al menos un 70%, al menos un 65%, o al menos un 60% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que se recoge en la SEC. ID. Nº 2. «Identidad de la secuencia» es una frase habitualmente utilizada para describir la similitud entre dos secuencias de aminoácidos (o entre dos secuencias de ácido nucleico). La identidad de la secuencia se expresa típicamente en términos del porcentaje de identidad; cuanto más alto es el porcentaje, más similares son las dos secuencias.

15 Los métodos para alinear las secuencias con fines comparativos y para determinar la identidad de la secuencia son bien conocidos en la técnica. Diversos programas y algoritmos de alineación se describen en: Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970; Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 85:2444, 1988; Higgins y Sharp, *Gene*, 73:237-44, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS*, 5:151-3, 1989; Corpet *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 16:10881-90, 1988; Huang, *et al.* *Computer Applications in the Biosciences*, 8:155-65, 1992; Pearson *et al.*, *Methods in Molecular Biology*, 24:307-331, 1994; Tatiana *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 174:247-50, 1999. Altschul *et al.* presentan un estudio detallado de los métodos de alineación de secuencias y los cálculos de la analogía (*J. Mol. Biol.*, 215:403-10, 1990).

20 The National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST™, Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215:403-10, 1990) también se encuentra disponible para consulta pública en diversas fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) y en internet, para su uso en relación con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Una descripción de cómo determinar la identidad de la secuencia utilizando este programa se encuentra disponible en internet, bajo la sección de ayuda de BLAST™.

25 Para realizar comparaciones de las secuencias de aminoácidos de más de 15 aminoácidos, la función «Blast 2 sequences» del programa BLAST™ (Blastp) se emplea utilizando la matriz BLOSUM62 por defecto ajustada para los parámetros por defecto (cost to open a gap [default = 5]; cost to extend a gap [default = 2]; penalty for a mismatch [default = 3]; reward for a match [default = 1]; expectation value (E) [default = 10.0]; word size

[default = 3]; and number of one-line descriptions (V) [default = 100]. Cuando se alinean péptidos cortos (menos de 15 aminoácidos), la alineación se debe realizar utilizando la función de secuencias de Blast 2 «Search for short nearly exact matches» empleando la matriz PAM30 ajustada para los parámetros por defecto (expect threshold = 20000, word size = 2, gap costs: existence = 9 and extension = 1) utilizando estadísticas basadas en la composición.

Cualquier variante de la secuencia divulgada de un Péptido L2G (con independencia de que sea una variante que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras en comparación con la SEC. ID. N° 2 o una variante que tiene un porcentaje de identidad de la secuencia divulgada con la SEC. ID. N° 2), al menos, es inmunogénica (sola o cuando se acopla con una molécula portadora) y, por ejemplo, capaz de provocar la producción de una molécula de unión a RD (como un anticuerpo monoclonal).

#### VI. Moléculas de unión al dominio regulador del EGFR

La presente divulgación se refiere también a moléculas de unión a RD específicas para el EGFR. Las moléculas de unión a RD son una especie de moléculas de unión a antígeno que se unen específicamente a epitopos del dominio regulador del EGFR (que corresponde a los residuos 980-1210 de la SEC. ID. N° 1), tales como epitopos del subdominio inhibidor del EGFR (que corresponde a los residuos 1138-1196 de la SEC. ID. N° 1).

Algunos ejemplos de moléculas de unión a RD incluyen las moléculas de unión a RD específicas para un Péptido L2G, o cualquier epitopo incluido en el mismo, o moléculas de unión a RD específicas para una secuencia del Péptido L2G del EGFR (incluyendo moléculas de unión a RD cuya unión al EGFR se inhibe competitivamente mediante un Péptido L2G o un fragmento del mismo), moléculas de unión a RD que reconocen estados estructurales concretos del EGFR (por ejemplo, moléculas de unión a RD específicas para epitopos enmascarados por interacciones proteína-proteína del EGFR) y/o moléculas de unión a RD que reconocen estados regulados concretos del EGFR (por ejemplo, moléculas de unión a RD específicas para epitopos incluidos en un subdominio inhibidor del EGFR y que reconocen la unión de una molécula reguladora negativa (por ejemplo, SOCS1 o SOCS2) al EGFR).

Las moléculas de unión al RD incluyen, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos funcionales o derivados recombinantes de los mismos, aptámeros, imagen especular para aptámeros o proteínas de unión a no inmunoglobulinas modificadas basadas en uno o más de los soportes siguientes: fibronectina (por ejemplo, ADNECTINS™ o monocuerpos), CTLA-4 (por ejemplo, EVIBODIES™), tendamistat (por ejemplo, McConnell y Hoess, *J. Mol. Biol.*, 250:460-470, 1995), neocarzinostatin (por ejemplo, Heyd *et al.*, *Biochem.*, 42:5674-5683, 2003), CBM4-2 (por ejemplo, Cicortas-Gunnarsson *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.*, 17:213-221, 2004), lipocalinas (por ejemplo, ANTICALINS™; Schlehuber y Skerra, *Drug Discov. Today*, 10:23-33, 2005), receptores de células T (por ejemplo, Chlewicki *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 346:223-239, 2005), dominio de la proteína A (por ejemplo, AFFIBODIES™; Engfeldt *et al.*, *ChemBioChem*, 6:1043-1050, 2005), Im9 (por ejemplo, Bernath *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 345:1015-1026, 2005), proteínas de repetición de anquirina (por ejemplo, DARPins; Amstutz *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280:24715-24722, 2005), proteínas de repetición de tetratricopéptido (por ejemplo, Cortajarena *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.*, 17:399-409, 2004), dominios de dedos de zinc (por ejemplo, Bianchi *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 247:154-160, 1995), pVIII (por ejemplo, Petrenko *et al.*, *Protein Eng.*, 15:943-950, 2002), GCN4 (Sia y Kim, *Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU.*, 100:9756-9761, 2003), polipéptido pancreático aviar (APP) (por ejemplo, Chin *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11:1501-1505, 2001), dominios WW (por ejemplo, Dalby *et al.*, *Protein Sci.*, 9:2366-2376, 2000), dominios SH3 (por ejemplo, Hiipakka *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 293:1097-1106, 1999), dominios SH2 (Malabarba *et al.*, *Oncogene*, 20:5186-5194, 2001), dominios PDZ (por ejemplo, TELOBODIES™; Schneider *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 17:170-175, 1999), TEM-1 pMactamasa (por ejemplo, Legendre *et al.*, *Protein Sci.*, 11:1506-1518, 2002), proteína fluorescente verde (GFP) (por ejemplo, Zeytun *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22:601, 2004), tiorredoxina (por ejemplo, aptámeros de péptidos; Lu *et al.*, *Biotechnol.*, 13:366-372, 1995), nucleasa estafilocócica (por ejemplo, Norman, *et al.*, *Science*, 285:591-595, 1999), dedos PHD (por ejemplo, Kwan *et al.*, *Structure*, 11:803-813, 2003), inhibidor de quimotripsina 2 (C12) (por ejemplo, Karlsson *et al.*, *Br. J. Cancer*, 91:1488-1494, 2004), inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) (por ejemplo, Roberts, *Proc. Natl Acad. Sci. EE. UU.*, 89:2429-2433, 1992) y otros muchos (véase la revisión de Binz *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 23(10):1257-1268, 2005 y materiales complementarios).

En una realización, una molécula de unión a RD divulgada es un aptámero. Los aptámeros incluyen moléculas de ácido nucleico de cadena simple (tales como ADN o ARN) que asumen una forma específica dependiente de la secuencia y se unen a una proteína diana con alta afinidad y especificidad. Por lo general, los aptámeros constan de menos de 100 nucleótidos, menos de 75 nucleótidos o menos de 50 nucleótidos. En otra realización, una molécula de unión a RD divulgada es una imagen especular para aptámero (también denominada SPIEGELMER™). Las imágenes especulares para aptámeros son ácidos nucleicos L-enantioméricos de alta afinidad (por ejemplo, unidades de L-ribosa o L-2'desoxirribosa) que presentan una alta resistencia a la degradación enzimática en comparación con D-oligonucleótidos (como aptámeros). Las propiedades de unión a una diana de los aptámeros y las imágenes especulares para aptámeros están diseñadas mediante un proceso de selección *in vitro* que arranca desde un grupo aleatorio de oligonucleótidos, tal y como se describe, por ejemplo, en Wlotzka *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(13):8898-902, 2002.

En otro ejemplo, un aptámero es un aptámero de un péptido que se une a una proteína diana (por ejemplo, un RD del EGFR) con alta afinidad y especificidad. Los aptámeros del péptido incluyen un bucle peptídico (por ejemplo, que es específico para la diana) sujeto por ambos extremos a un soporte de proteína. Esta doble restricción estructural incrementa en gran medida la afinidad de unión del aptámero del péptido hasta niveles comparables a los de un anticuerpo (rango nanomolar). La longitud variable del bucle tiene típicamente entre 8 y 20 aminoácidos (por ejemplo, entre 8 y 12 aminoácidos) y el soporte puede ser cualquier proteína que sea estable, soluble, pequeña y no tóxica (por ejemplo, tiorredoxina A, estefina A mutante triple, proteína fluorescente verde, eglina C y factor de transcripción celular Spl). La selección del aptámero del péptido se puede realizar utilizando diferentes sistemas, como el sistema del doble híbrido en levadura (por ejemplo, sistema del doble híbrido en levadura Gal4) o el sistema de trampa de interacción LexA.

Las moléculas de unión a RD divulgadas también incluyen anticuerpos. El término «anticuerpo» se refiere a una molécula de inmunoglobulina (o combinaciones de ella) que se une específicamente o es inmunológicamente reactiva con un antígeno concreto e incluye formas de anticuerpos policlonales, monoclonales, genéticamente modificados y otras formas modificadas de anticuerpos, incluyendo, a título meramente enunciativo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos bispecíficos, dicuerpos, triacuerpos y tetracuerpos), anticuerpos Fv de cadena simple (scFv), polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir la unión a antígeno específica al polipéptido, y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, incluyendo, por ejemplo, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv, rIgG, o fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR).

Un fragmento Fab es un fragmento monovalente que contiene los dominios VL, VH, CL y CHI; un fragmento F(ab')<sub>2</sub> es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un enlace de disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd se compone de los dominios VH y CHI; un fragmento Fv contiene los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; y un fragmento dAb contiene un dominio VH (véase, por ejemplo, Ward *et al*, *Nature* 341:544-546, 1989). Un anticuerpo de cadena simple (scFv) es un anticuerpo en el que una región VL y VH están emparejadas para formar una molécula monovalente mediante un conector sintético que permite producirlas como una cadena de proteína única (véase, por ejemplo, Bird *et al*, *Science*, 242: 423-426, 1988; Huston *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 85:5879-5883, 1988). Los anticuerpos son anticuerpos biespecíficos bivalentes en los que los dominios VH y VL se expresan en una cadena de polipéptido única, pero utilizando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, obligando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:6444-8, 1993; Poljak *et al*, *Structure*, 2:1121-3, 1994). Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de otro u otros anticuerpos. Un anticuerpo puede tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina naturalmente presente cuenta con dos sitios de unión idénticos, un anticuerpo de cadena simple o fragmento Fab tiene un sitio de unión, mientras que un anticuerpo «biespecífico» o «bifuncional» tiene dos sitios de unión diferentes.

Tal y como se ha debatido anteriormente, algunos ejemplos de moléculas de unión a RD reconocen determinados estados regulados o estructurales del EGFR. Por ejemplo, una molécula de unión a RD divulgada puede detectar el enmascaramiento (o desenmascaramiento) de un epitopo en el dominio regulador del EGFR (residuos 980-1210 de la SEC. ID. N° 1). Este enmascaramiento (o desenmascaramiento) del epitopo puede resultar, por ejemplo, de una interacción proteína-proteína entre el EGFR y otra proteína celular, como una proteína SOCS (por ejemplo, SOCS1 o SOCS3); donde la unión de la proteína celular al EGFR enmascara el epitopo y la desasociación (o falta de asociación) de las dos proteínas desenmascara el epitopo.

En ambos ejemplos, las moléculas de unión a RD, como anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o fragmentos de los mismos, se caracterizan por la unión específica a uno o más de los RDP del EGFR divulgados en el presente (véase, por ejemplo, la Sección V). En otros ejemplos, las moléculas de unión a RD, como anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o fragmentos de los mismos, se unen específicamente a residuos de aminoácidos del EGFR que corresponden a la secuencia o secuencias de los RDP divulgados (véase, por ejemplo, la Sección V). En otros ejemplos más, las moléculas de unión a RD, como anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o fragmentos de los mismos, se unen específicamente al dominio regulador del EGFR o al subdominio inhibidor del EGFR y esta unión específica es inhibida competitivamente por uno o más RDP del EGFR divulgados en el presente (véase, por ejemplo, la Sección V). Otros ejemplos implican moléculas de unión a RD (como anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o fragmentos de los mismos) que se unen específicamente al dominio regulador del EGFR o al subdominio inhibidor del EGFR; donde esta unión específica es inhibida competitivamente por una proteína SOCS, como SOCS1 o SOCS3 (o un fragmento de una proteína SOCS que se une al dominio regulador del EGFR (por ejemplo, una región del dominio regulador que incluye un residuo Tyr fosforilado)).

En una realización, una molécula de unión a RD es un anticuerpo monoclonal de conejo. En una realización concreta, una molécula de unión a RD es un anticuerpo monoclonal de conejo depositado con el número de acceso ATTCC \_ En otra realización concreta, una molécula de unión a RD es un clon 5B7 de anticuerpo

monoclonal de conejo, comercializado por Ventana Medical Systems (Tucson, AZ, número de producto 790 4347).

En algunos ejemplos, una molécula de unión a RD (como un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o fragmentos del mismo) tiene una constante de equilibrio (JCj) de 1 nM o menos. Por ejemplo, se proporcionan moléculas de unión a RD que se unen al dominio regulador (o al subdominioinhibidor) del EGFR con una afinidad de unión de al menos aproximadamente  $0,1 \times 10^{-8}$  M, al menos aproximadamente  $0,3 \times 10^{-8}$  M, al menos aproximadamente  $0,5 \times 10^{-8}$  M, al menos aproximadamente  $0,75 \times 10^{-8}$  M, al menos aproximadamente  $1,0 \times 10^{-8}$  M, al menos aproximadamente  $1,3 \times 10^{-8}$  M al menos aproximadamente  $1,5 \times 10^{-8}$  M, o al menos aproximadamente  $2,0 \times 10^{-8}$  M.

Opcionalmente una molécula de unión a RD divulgada, como un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o fragmentos del mismo, puede ser directamente etiquetada con una fracción detectable. Entre los agentes de detección útiles se incluyen compuestos fluorescentes (incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, 5-dimetilamina-1-naftalensulfonil cloruro, ficoeritrina, fósforos de lantanida o la familia de tintes de cianina (tales como Cy-3 o Cy-5) y similares); compuestos bioluminiscentes (como luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP) o proteína fluorescente amarilla); enzimas que pueden producir un producto de reacción detectable (como peroxidasa de rábano, J3-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, o glucosa oxidasa y similares) o radioetiquetas (tales como  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ , o  $^{131}\text{I}$ ).

#### A. Realización de ejemplos de anticuerpos de unión a RD

Los métodos para realizar moléculas de unión al RD del EGFR son bien conocidos en la técnica. El método empleado dependerá de la naturaleza de las moléculas de unión a RD deseadas; por ejemplo, las moléculas de unión a RD basadas en péptidos que no proceden necesariamente de la inmunoglobulina se pueden producir utilizando métodos similares a los métodos de presentación de fagos. Uno de estos métodos se describe en Szardenings, *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 23:307-309, 2003.

Los métodos para generar anticuerpos (como anticuerpos monoclonales o policlonales) están bien establecidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). Por ejemplo, se pueden inyectar RDP o RDP conjugados a moléculas portadoras (o ácidos nucleicos que codifican estos RDP o RDP conjugados) a mamíferos no humanos (como ratones o conejos), seguidas de una segunda inyección de recuerdo para producir una respuesta del anticuerpo. El suero aislado de los animales inmunizados se puede aislar para obtener los anticuerpos policlonales, o bien se pueden emplear los bazos de los animales inmunizados para la producción de hibridomas y anticuerpos monoclonales.

En un ejemplo, el anticuerpo monoclonal para los epitopos del RDP se puede preparar con hibridomas murinos de acuerdo con el método clásico de Kohler y Milstein (*Nature*, 256:495, 1975) o métodos derivados de los mismos. Dicho brevemente, un ratón (como un ratón Balb/c) es inoculado en repetidas ocasiones con microgramos del RDP seleccionado (como la SEC. ID. N° 2) o un conjugado portador de los mismos durante un período de varias semanas. Posteriormente, se sacrifica el ratón y se aíslan las células del bazo que generan anticuerpos. Las células del bazo se fusionan mediante polietilenglicol con células de mieloma de ratón, y el exceso de células no fusionadas se destruyen mediante el crecimiento del sistema en medios selectivos entre los que se incluye la aminopterina (medios HAT). Las células fusionadas con éxito se diluyen y se colocan en partes alícuotas en pocillos de una placa de microtitulación en la que continúa el cultivo de las células. Los clones que producen anticuerpos son identificados por detección del anticuerpo en el fluido supernatante de los pocillos por procedimientos de inmunoensayo, como el ensayo ELISA, originalmente descrito por Engvall (*Enzymol.*, 70:419, 1980), y métodos derivados del mismo. Los clones positivos seleccionados se pueden expandir y su producto de anticuerpo monoclonal puede ser recogido para su utilización.

En otro ejemplo, se puede preparar un anticuerpo monoclonal para los epitopos en RDP con hibridomas de conejo, tal y como se describe en las Patentes estadounidenses n° 7 148 332, 5 675 063, o 4 859 595.

En otro ejemplo más, los anticuerpos monoclonales para los epitopos del dominio inhibidor del EGFR se pueden preparar inoculando de forma repetida a un mamífero no humano (como un ratón o conejo) uno o más plásmidos que codifican un RDP divulgado (como un plásmido que codifica la SEC. ID. N° 2). Por ejemplo, pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) o un vector obtenido del mismo se puede manipular utilizando métodos de biología molecular estándar para incluir una secuencia que codifica un RDP divulgado (por ejemplo, SEC. ID. N° 2). En un método de ejemplo, los ratones Balb/c (6-8 semanas de edad) son inmunizados en tres ocasiones con el plásmido apropiado (20 ng en solución tampón de fosfatos) y se puede administrar una dosis de refuerzo con células antes de la fusión. Los ratones pueden ser inyectados en tres ocasiones intradérmicamente en la base de la cola, en los días 0, 10 y 20, utilizando una jeringuilla de insulina con una aguja calibre 28. El suero se puede extraer los días 30 y 45 para evaluar la titulación anti-suero. Para estimular a los ratones inmunizados, se inyectan células que expresan el plásmido deseado (por ejemplo, como mínimo el día 50). Estas inyecciones pueden ser intravenosas e intraperitoneales. Los bazos se reogen entre 80 y 90 horas después de la última inyección de células para la fusión de las células.

Las fusiones de células de los esplenocitos se pueden realizar conforme al protocolo de Oi y Herzenberg (*Selected Methods in Cellular Immunology*, Freeman Press, San Francisco, 1980). Los esplenocitos y las células SP2/0 se mezclan, por ejemplo, a un ratio de 4:1. Las células mezcladas son centrifugadas y los gránulos de células son resuspendidos en polietilenglicol (como un 40-50% en peso de polietilenglicol) y el medio adecuado. La suspensión resultante se centrifuga y se resuspenden los gránulos de células en medio HAT, para después sembrarlos en placas de 96 pocillos a 100 u./ pocillo ( $2,5 \times 10^5$  células/pocillo) y se cultivan en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente de la fusión, se añaden 100 ul de medio HAT fresco que contiene 500 ug/ml de geneticina (Invitrogen). En los días 4 y 7 se sustituye la mitad del medio del bazo por medio HAT fresco que contiene 250 ug/ml de geneticina. El día 8, se comprueba el crecimiento del hibridoma en cada pocillo bajo un microscopio. La producción de mAb en el supernatante del cultivo se puede someter a ensayo el día 10, con ELISA, o los días 9 y 10, por análisis FACS. Los clones positivos se pueden expandir y los hibridomas específicos clonar mediante un método de dilución limitador.

Por otra parte, los protocolos para producir formas humanizadas de anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos monoclonales son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes estadounidenses nº 6 054 297, 6 407 213, 6 639 055, 6 800 738, y 6 719 971 y las Publicaciones de solicitudes de patentes estadounidenses nº 2005/0033031, y 2004/0236078). De forma similar, los métodos para producir anticuerpos de cadena simple han sido descritos y pueden resultar útiles para la producción de moléculas de unión al RD aquí divulgadas (véase, Buchner *et al.*, *Anal. Biochem.* 205:263-270, 1992; Pluckthun, *Biotechnology* 9:545, 1991; Huse *et al.*, *Science* 246:1275, 1989 y Ward *et al.*, *Nature* 341:544, 1989).

#### B. Realización de ejemplos de aptámeros de unión al RD

Los métodos para generar aptámeros (por ejemplo, aptámeros de ADN y ARN) están bien consolidados en la técnica. Por ejemplo, con el conocimiento de una secuencia de RD (véase la Sección V) se pueden seleccionar aptámeros que se unan a una secuencia de aminoácidos del RD.

En un ejemplo, los aptámeros de ADN y ARN se seleccionan utilizando el método *in vivo* SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial), por ejemplo utilizando el método de Fitzwater y Polisky (*Methods Enzymol.*, 267:275- 301, 1996). Este método se puede utilizar para identificar los aptámeros que se unen a RD como una especificidad elevada. El procedimiento selec SELEX normalmente se inicia con una biblioteca de ARN o ADN que contiene aproximadamente  $10^{14}$ - $10^{15}$  secuencias de oligonucleótidos aleatorias. En una biblioteca de oligonucleótidos totalmente aleatorizados, cada molécula mostrará una estructura terciaria única que será dependiente de la secuencia de nucleótidos de esa molécula. La afinidad de unión del oligonucleótido con un RD concreto se determinará por el ajuste entre las fracciones de la superficie del oligonucleótido y los epitopos del RD diana. Al comenzar con una librería de una diversidad abundante, se pueden identificar los aptámeros de afinidad nanomolar o subnanomolar por el RD diana con selectividad sobre el RD con respecto a otros RD con un alto grado de homología estructural. Por ejemplo, los péptidos del RD (o una porción de los mismos, como de 3 a 20 aminoácidos de un RD diana, por ejemplo un epitopo) se pueden unir a una superficie (como una placa de 96 pocillos u otra placa de múltiples pocillos de microtitulación). La biblioteca de moléculas de ácido nucleico se puede añadir al péptido unido en condiciones que permitan a los miembros de la librería unirse al péptido (por ejemplo, mediante incubación a 37°C durante 30 minutos). Los miembros no unidos de la librería se lavan y posteriormente los miembros unidos de la librería se eluyen (por ejemplo, mediante incubación a 95°C durante 10 minutos). La transcripción reversa se realiza (si los aptámeros son ARN) seguida de la reacción en cadena de polimerasa y la transcripción, a fin de generar ácidos nucleicos para la siguiente ronda de SELEX. La constante de disociación (Kd) del aptámero seleccionado resultante se puede determinar utilizando métodos rutinarios. Los aptámeros con una alta afinidad por el RD deseado se pueden seleccionar, como una Kd de menos de 100 nM, como de menos de 50 nM, menos de 10 nM, o menos de 1 nM (por ejemplo de 0,1 a 50 nM). Los aptámeros se pueden modificar para incrementar su vida útil, por ejemplo, modificarse con pirimidinas 2'-fluor sustituidas, purinas 2' ribo, enlace de polietilenglicol (PEG) y similares.

En un ejemplo, los aptámeros del péptido se seleccionan utilizando un sistema doble híbrido en levadura, por ejemplo, utilizando el método de Chassey *et al.* (*Molecular & Cellular Proteomics* 6:451-9, 2007). Se pueden encontrar revisiones, por ejemplo, en Borghouts *et al.* (*Comb. Chem. High Throughput Screen.* 11:135-45, 2008) y Buerger *et al.* (*J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 129:669-75,2003). Este método se puede utilizar para identificar aptámeros de péptidos que se unen a un RD con una especificidad alta. Se analiza una librería de aptámeros de péptidos de alta complejidad, como librerías de 20 mer u 8-12 mer. La librería puede basarse o no en información conocida sobre la secuencia del RD. En un ejemplo, la librería incluye oligonucleótidos que codifican péptidos variantes basándose en la secuencia de aminoácidos del RD diana. La librería incluye oligonucleótidos que codifican los péptidos variables insertados en un vector que codifica la proteína de soporte (por ejemplo, tiorredoxina). Cuando se expresan, las secuencias de péptidos «presas» se embeben en la proteína de soporte. Una secuencia de ácido nucleico o vector que codifica el RD diana que sirve de «cebo» fusionado de un módulo de transcripción (por ejemplo, Gal4 o LexA) se expresa en las células (por ejemplo, levadura) junto con las secuencias que codifican las «presas».

Si se utiliza el sistema doble híbrido en levadura, el aptámero del péptido «presa» se puede fusionar con el dominio de transactivación de Gal4 (Gal4-AD) y también puede incluir una señal de localización nuclear y una

etiqueta HA para la detección. Algunos ejemplos de vectores que se pueden utilizar para expresar el aptámero del péptido incluyen pRS424, pAD-Trx, pGAD424; pGAD-T7, pACT2, and pAD-Gal4-2.1. Un vector que codifica la proteína diana de «cebo» fusionada al dominio de unión del ADN de Gal4 se expresa en la levadura junto con las secuencias que codifican la «presa». Entre los ejemplos de vectores que se pueden utilizar para expresar el péptido de «cebo» se incluyen pPC97, pLex9, pGBK-T7, y pDB-Gal4Cam. En algunos ejemplos, la cadena de levadura indicadora en la que se introducen los vectores de cebo y presa incluye los genes His3, Ade2, Ura3 y LacZ bajo el control de una secuencia de activación en sentido ascendente de Gal, a fin de permitir la selección de clones a los que se unen específicamente el cebo y la presa. Para seleccionar los aptámeros de péptidos deseados, las células de levadura transformadas se colocan en medios que carecen de histidina, adenina o uracilo. Los ensayos de  $\beta$ -gal se pueden realizar para cuantificar la unión entre aptámeros identificados y la diana. Para incrementar la rigurosidad de la selección, se puede incrementar la cantidad de inhibidor 3-AT (por ejemplo, 10-100 mM). Las células que crecen indican la presencia del aptámero del péptido que se une al RD diana.

Si se utiliza el sistema de trampa de interacción de LexA, se puede utilizar un vector que codifica el aptámero del péptido «presa» fusionado con el dominio de transactivación ácido B42 o B112. Algunos ejemplos de vectores que se pueden utilizar para expresar el aptámero del péptido son pWPI, pWP2, pJG4-5, pJMI, pHA3). Un vector que codifica la proteína diana de «cebo» fusionada con el dominio de unión del ADN del represor de Lex A se expresa en la levadura junto con las secuencias que codifican la «presa». Un ejemplo de vector que se puede utilizar para expresar el péptido «cebo» es pEG202. La expresión del vector «presa» es inducida sin hay galactosa presente en el medio de cultivo. Para seleccionar aptámeros de péptidos deseados, las células de levadura transformadas son colocadas en medios con galactosa. Las interacciones entre la proteína de cebo y el aptámero del péptido se detectan en placas de galactosa que carecen de leucina. Las células que crecen indican la presencia del aptámero del péptido que se une al RD diana.

Los clones indicados para portar el aptámero de proteína deseado que se une al RD pueden ser seleccionados y el vector que codifica el aptámero puede ser aislado y clonado utilizando tecnología recombinante estándar.

#### **VII. Kits**

Cualesquiera de las moléculas de unión a RD descritas en la presente divulgación se pueden suministrar en forma de un kit útil, al menos, para la realización de los métodos aquí. En una realización de este kit, una cantidad apropiada de al menos una molécula de unión a RD (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal (como el clon 5B7) o un fragmento del mismo) se proporciona en uno o más recipientes. En otras realizaciones, al menos una molécula de unión a RD (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal (como el clon 5B7) o un fragmento del mismo) se puede proporcionar suspendida en una solución acuosa o en forma de polvo seco congelado o liofilizado, por ejemplo. El recipiente o los recipientes en los que se proporciona al menos una molécula de unión a RD (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal (como el clon 5B7) o un fragmento del mismo) puede ser cualquier recipiente convencional que sea capaz de contener la forma suministrada, por ejemplo, tubos de microfuga, ampollas o botellas. La cantidad de molécula de unión a RD suministrada (por ejemplo, anticuerpo monoclonal (como el clon 5B7) o un fragmento del mismo) puede ser cualquier cantidad apropiada, entre 1 y 5  $\mu$ g/ml.

En otras realizaciones, los portaobjetos de control en los que se encuentran montados uno o más tejidos o preparados de células (por ejemplo, xenoinjertos, granulados de células o células coaguladas) que pueden servir como control positivo y/o negativos para una molécula de unión al RD (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal (como el clon 5B7) o un fragmento del mismo) se pueden proporcionar en un recipiente apropiado y separado. En algunos casos, las células A431, DU145 y/o Caski (o xenoinjertos preparados con estas) pueden servir de controles positivos. En otros casos, las células MCF-7 (o xenoinjertos preparados con estas) pueden servir como control negativo.

Otras realizaciones del kit incluirán medios para la detección de la molécula de unión a RD, como anticuerpos secundarios (por ejemplo, anticuerpos de cabra anti-conejo o anticuerpos de conejo anti-ratón). En algunos de estos casos, el anticuerpo secundario estará directamente etiquetado con una fracción detectable (como se describe más adelante en la presente divulgación). En otros casos, el anticuerpo primario o secundario (o de mayor orden) se conjugará con un hapteno (como biotina, DNP, y/o FITC), que sea detectable mediante una molécula de unión al hapteno cognado etiquetado de forma detectable (por ejemplo, estreptavidina (SA)-peroxidasa de rábano, SA-fosfatasa alcalina y/o SA-QDot™). Algunas realizaciones del kit pueden incluir reactivos colorimétricos (por ejemplo, DAB y/o AEC) en recipientes adecuados que se utilizarán de acuerdo con los anticuerpos primarios o secundarios (o de mayor orden) etiquetados con enzimas para el desarrollo de estos reactivos colorimétricos.

En una realización, un kit incluye materiales de instrucción que revelan métodos de uso de los contenidos del kit (por ejemplo, molécula de unión a RD) en un método divulgado. Los materiales de instrucciones pueden estar escritos, en soporte electrónico (por ejemplo, un disco compacto) o ser visuales (por ejemplo, archivos de vídeo). Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación concreta para la que está diseñado el kit. Así, por ejemplo, los kits pueden incluir adicionalmente soluciones tampón y otros

reactivos empleados rutinariamente para la práctica de un método concreto. Estos kits y contenidos apropiados son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas realizaciones y/o características concretas. Estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de la invención a las características concretas ni a las realizaciones descritas.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

#### UN EJEMPLO DE ANTICUERPO MONOCLONAL ESPECÍFICO PARA EL DOMINIO REGULADOR DEL EGFR

Este Ejemplo describe un modelo de molécula de unión a RD; más concretamente, un anticuerpo monoclonal que se une a un epitopo en el subdominio inhibitor del EGFR. Este anticuerpo ofrece la ventaja añadida de que identificará no solamente el EGFR de longitud completa, sino también las formas truncadas y mutantes del EGFR, que se ha demostrado que están constitutivamente activadas (Pedersen *et al.*, *Ann. Oncol.*, 12(6):745-60, 2001).

Se ha utilizado un programa infométrico (DNASTAR™, Madison, WI) para la selección de las secuencias peptídicas inmunogénicas dentro del dominio intracelular del EGFR. El programa examinó la secuencia de proteína introducida para las secuencias cortas (por ejemplo, menos de 20 aminoácidos contiguos) que tenían una alta probabilidad de producir una respuesta del anticuerpo en animales inmunizados con inmunógenos que incluían estas secuencias cortas.

Una secuencia corta identificada fue LDNPDYQQDFFPKKAKPNG (Péptido L2G; SEC. ID. N° 2), que, según el análisis informático, presentaba una elevada antigenicidad, regiones hidrófilas y altas regiones de probabilidad de superficie. Esta secuencia de aminoácidos fue seleccionada y se sintetizó un péptido correspondiente utilizando un servicio disponible en el mercado (Anaspec, San Jose, CA).

El péptido sintetizado se conjugó con hemocianina de lapa californiana (KLH) utilizando métodos estándar. Los conejos fueron inmunizados con el conjugado de KLH-péptido mediante un servicio disponible en el mercado (Strategic Diagnostics, Inc. Newark, DE).

Los sueros de los conejos que contenían anticuerpos específicos para el Péptido L2G fueron identificados mediante un ensayo ELISA. El animal con la titulación sérica más importante fue seleccionado para una esplenectomía. El bazo viable fue enviado a Epitomics, Inc (Burlingame, CA) en 24 horas, donde las células del bazo inmunizadas fueron preparadas para la fusión con una línea de células inmortalizadas (240E-w) tal y como se describe, por ejemplo, en la Patente estadounidense n° 5675063 o en la Patente europea n° EP0815213B1.

Los supernatantes del hibridoma se ensayaron mediante ELISA para detectar la presencia de anticuerpos específicos para el Péptido L2G. Se seleccionó un hibridoma basándose en una titulación de anticuerpo relativamente elevada en el correspondiente supernatante. La especificidad de los anticuerpos producidos por la línea de células del hibridoma seleccionada se confirmó mediante pruebas de inmunohistoquímica (IHC) en tejidos EGFR positivos conocidos (incluyendo carcinoma de células escamosas del pulmón, adenocarcinomas de colon y piel normal). La línea de células del hibridoma suministrada por el fabricante fue subclonada hasta la homogeneidad para aislar un clon del hibridoma de alta producción denominado 5B7.

Se realizó un ensayo Western blot para comprobar la especificidad del clon 5B7. Se prepararon lisados de proteínas totales de las células A431, que se sabe que expresan unos niveles elevados de EGFR en su superficie celular, y de células BY474, que son EGFR negativas, pero que expresan los miembros de la familia del EGFR relacionados, EGFR2 y EGFR3. Tal y como se muestra en la Fig. 4, el clon 5B7 y un anticuerpo monoclonal de ratón específico para el dominio externo del EGFR (clon 3C6) reconocieron la misma banda de 170 kDa, lo que es coherente con el tamaño de la proteína del EGFR. La ausencia de tinción de los lisados de células BT474 en el caso de los dos anticuerpos indicó que ninguno de ellos se había sometido a una reacción cruzada con miembros de la familia del EGFR que tienen una homología conservada. Por tanto, los anticuerpos 3C6 y 5B7 eran específicos para el EGFR.

### Ejemplo 2

#### EJEMPLOS DE MÉTODOS PARA LA TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE TEJIDO CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA EL EGFR

La inmunohistoquímica es un método muy conocido y las variaciones de estos métodos podrán ser fácilmente determinadas mediante experimentación rutinaria por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Dabbs, *Diagnostic Immunohistochemistry*, Churchill Livingstone, 2002). Los métodos de ejemplo para la detección en tejido FFPE mediante ICH manual de una molécula de unión al RD del EGFR (por ejemplo, el clon 5B7 del

## ES 2 535 319 T3

anticuerpo monoclonal) o una molécula de unión a antígeno específica para el dominio extracelular del EGFR (por ejemplo, el clon 3C6 del anticuerpo monoclonal) se proporcionan en la tabla siguiente:

Paso nº	Ensayo inmunohistoquímico manual
0	Se coloca el tejido fresco en un fijador (como solución tampón de formalina neutra al 10%) durante aproximadamente 12-48 horas a temperatura ambiente. A continuación, se deshidrata el tejido mediante alcoholes de alta gradación (por ejemplo, del 50 al 70%, al 90%, al 95% o al 100% de Etoh) durante 1-2 horas a cada gradación y se infiltra un reactivo de limpieza (como xileno) durante 3-5 horas a temperatura ambiente. El tejido limpio se coloca en parafina fundida (aproximadamente a 63°C) durante 3-6 horas. Se retiran las muestras y se embeben en bloques de parafina para su posterior seccionamiento con un micrótopo. Se cortan secciones de 3-10 µm y se colocan en portaobjetos.
1	Desparafinar las secciones de tejido en xileno; a continuación, rehidratar a través de alcoholes de alta gradación hasta agua destilada.
2	Colocar las secciones de tejido en un 0,5% en peso de peróxido de hidrógeno/metanol durante aproximadamente 10 minutos.
3	Pretratar los portaobjetos para la recuperación del antígeno utilizando un método apropiado (por ejemplo, desenmascaramiento del antígeno a alta temperatura, tripsina, etc.), si es necesario.
4	Lavar los portaobjetos con agua destilada durante aproximadamente cinco minutos.
5	Lavar los portaobjetos con solución tampón salina (por ejemplo, PBS, TBS) durante cinco minutos.

Paso nº	Ensayo inmunohistoquímico manual
6	Cubrir las secciones de tejido con un reactivo de bloqueo (por ejemplo, 10% en peso de suero de conejo normal en solución tampón) durante aproximadamente 10 minutos.
7	Eliminar el exceso de reactivo de bloqueo y sustituir por anticuerpo primario (por ejemplo, anticuerpo monoclonal de conejo o anticuerpo monoclonal de ratón) diluido en reactivo de bloqueo cuando sea necesario, durante aproximadamente 60 minutos a 25°C o hasta el día siguiente a 4°C.
8	Lavar dos veces en solución tampón durante aproximadamente cinco minutos por lavado.
9	Eliminar el exceso de solución tampón e incubar las secciones de tejido con anticuerpo secundario biotinilado (por ejemplo, anticuerpo de conejo biotinilado anti-ratón o anticuerpo de cabra biotinilado anti-conejo, según corresponda para el anticuerpo primario del sujeto) diluido en reactivo de bloqueo durante 30 minutos a 25°C.
10	Lavar dos veces en solución tampón durante aproximadamente cinco minutos por lavado.
11	Eliminar el exceso de solución tampón e incubar las secciones de tejido con un conjugado de estraptavidina-peroxidasa de rábano (HRP) durante 30 minutos a 25°C.
12	Lavar dos veces en solución tampón durante aproximadamente cinco minutos por lavado.
13	Desarrollar un color detectable con 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) a temperatura ambiente durante aproximadamente 5-10 minutos.
14	Enjuagar los portaobjetos en agua.
15	Si se desea, aplicar contratinción con hematoxilina (por ejemplo, Carson, <i>Histotechnology: A Self-Instructional Text</i> , Chicago ASCP Press, 1997).
16	Deshidratar, limpiar y montar el cubreobjetos en los portaobjetos.

- 5 La IHC para la detección de anticuerpos específicos para el dominio regulador del EGFR también se puede realizar en plataformas de tinción automáticas, como los instrumentos de la serie BenchMark™ fabricados por Ventana Medical Systems (Tucson, AZ). Un ejemplo de ensayo para la detección de un anticuerpo monoclonal específico para el dominio regulador del EGFR (por ejemplo, clon 5B5) en una plataforma de tinción automática de tejidos de la serie BenchMark™ se describe en la tabla siguiente:

Paso nº	Tinción de anticuerpo anti-dominio regulador del EGFR (ensayo automático)
1	***** Select EZ Prep *****
2	***** Start Timed Steps *****
3	***** Mixers Off*****
4	Calentar el portaobjetos a 75°C e incubar durante 4 minutos.
5	Aplicar el ajuste del volumen de EZPrep
6	Enjuagar el portaobjetos
7	Aplicar el ajuste del volumen de EZPrep
8	Enjuagar el portaobjetos
9	Aplicar el ajuste del volumen de EZPrep
10	Aplicar cubreobjetos
11	Calentar el portaobjetos a 76°C e incubar durante 4 minutos
12	Enjuagar el cubreobjetos
13	Aplicar el ajuste de volumen Depar
14	Aplicar el cubreobjetos
15	Desactivar el calendador del portaobjetos
16	***** Mixers On *****
17	[Corto - Acondicionamiento de 8 minutos]

Paso nº	Tinción de anticuerpo anti-dominio regulador del EGFR (ensayo automático)
18	Enjuagar el portaobjetos
19	Aplicar el acondicionador de células largas nº 1
20	Aplicar el cubreobjetos largo CC
21	***** Select SSC Wash *****
22	Calentar el portaobjetos a 95°C e incubar durante 8 minutos
23	[Suave - acondicionamiento de 30 minutos]
24	Aplicar el acondicionador celular nº 1
25	Aplicar el cubreobjetos medio CC nº BB
26	Calentar el portaobjetos a 100°C e incubar durante 4 minutos
27	Aplicar el cubreobjetos medio CC nº BB
28	Aplicar el acondicionador celular nº 1
29	Aplicar el cubreobjetos medio CC nº BB
30	Aplicar el acondicionador celular nº 1
31	Aplicar el cubreobjetos medio CC nº BB
32	Aplicar el acondicionador celular nº 1

ES 2 535 319 T3

33	Aplicar el cubreobjetos medio CC nº BB
34	Aplicar el acondicionador celular nº 1
35	Aplicar el cubreobjetos medio CC nº BB
36	Aplicar el acondicionador celular nº 1
37	Aplicar el cubreobjetos medio CC nº BB
38	[Estándar - acondicionamiento de 60 minutos]
39	Aplicar el acondicionador celular nº 1
40	Aplicar el cubreobjetos medio CC nº BB
41	Aplicar el acondicionador celular nº 1
42	Aplicar el cubreobjetos medio CC nº BB
43	Aplicar el acondicionador celular nº 1
44	Aplicar el cubreobjetos medio CC nº BB
45	Aplicar el acondicionador celular nº 1
46	Aplicar el cubreobjetos medio CC nº BB
47	Aplicar el acondicionador celular nº 1
48	Aplicar el cubreobjetos medio CC nº BB
49	Aplicar el acondicionador de células cortas nº 1
50	Aplicar el cubreobjetos medio CC nº BB
51	Aplicar el acondicionador celular nº 1
52	Aplicar el cubreobjetos medio CC nº BB
53	Desactivar el calendador del portaobjetos
54	Incubar durante 8 minutos
55	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
56	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
57	Aplicar el cubreobjetos
58	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
59	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
60	Aplicar el cubreobjetos
61	***** Procedure Synchronization *****
62	Calentar el portaobjetos a 37°C e incubar durante 4 minutos
63	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
64	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
65	Aplicar una gota de I-VIEW INHIBITOR, aplicar el cubreobjetos e incubar durante 4 minutos

Paso nº	Tinción de anticuerpo anti-dominio regulador del EGFR (ensayo automático)
66	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
67	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
68	Aplicar el cubreobjetos

## ES 2 535 319 T3

69	Calentar el portaobjetos a 37°C e incubar durante 4 minutos
70	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
71	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
72	Aplicar el cubreobjetos
73	Aplicar una gota de anticuerpo (p. ej., clon 5B7) e incubar durante [0 horas 16 min]
74	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
75	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
76	Aplicar el cubreobjetos
77	Calentar el portaobjetos a 37°C e incubar durante 4 minutos
78	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
79	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
80	Aplicar una gota de I-VIEW BIOTIN Ig, aplicar el cubreobjetos e incubar durante 8 minutos
81	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
82	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
83	Aplicar una gota de I-VIEW SA-HRP, aplicar el cubreobjetos e incubar durante 8 minutos
84	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
85	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
86	Aplicar el cubreobjetos
87	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
88	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
89	Aplicar una gota de I-VIEW DAB y una gota de I-VIEW H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , aplicar el cubre objetos e incubar durante 8 minutos
90	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
91	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
92	Aplicar una gota de I-VIEW COPPER, aplicar el cubreobjetos e incubar durante 4 minutos
93	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
94	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
95	Aplicar una gota de [HEMATOXYLIN II] (contratinción), aplicar el cubreobjetos e incubar durante [4 minutos]
96	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
97	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
98	Aplicar el cubreobjetos
99	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
100	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
101	Aplicar una gota de [BLUING REAGENT] (tras contratinción), aplicar el cubreobjetos e incubar durante [4 minutos]
102	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
103	Aplicar el cubreobjetos
104	Desactivar el calendario del portaobjetos

## ES 2 535 319 T3

105	***** Select Optional Wash *****
106	***** Select SSC Wash *****
107	***** Start Timed Steps *****
108	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción

Un ejemplo de ensayo para la detección de un anticuerpo monoclonal específico para el dominio externo del EGFR (por ejemplo, clon 3C6) en una plataforma de tinción de tejidos automática de la serie BenchMark™ se describe en la tabla siguiente:

Paso nº	Tinción de anticuerpo anti-dominio externo del EGFR (ensayo automático)
1	***** Select EZ Prep *****
2	***** Start Timed Steps *****
3	***** Mixers Off*****
4	Calentar el portaobjetos a 75°C e incubar durante 4 minutos
5	Aplicar el ajuste del volumen de EZPrep
6	Enjuagar el portaobjetos
7	Aplicar el ajuste del volumen de EZPrep
8	Enjuagar el portaobjetos
9	Aplicar el ajuste del volumen de EZPrep
10	Aplicar el cubreobjetos
11	Calentar el portaobjetos a 76°C e incubar durante 4 minutos
12	Enjuagar el portaobjetos
13	Aplicar el ajuste de volumen Depar
14	Aplicar el cubreobjetos
15	Desactivar el calentador del portaobjetos
16	***** Mixers On *****
17	Desactivar el calentador del portaobjetos
18	***** Select SSC Wash *****
19	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
20	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
21	Aplicar el cubreobjetos
22	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
23	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
24	Aplicar el cubreobjetos
25	***** Procedure Synchronization *****
26	Calentar el portaobjetos a 37°C e incubar durante 4 minutos
27	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
28	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
29	Aplicar una gota de I-VIEW INHIBITOR, aplicar el cubreobjetos e incubar durante 4 minutos
30	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
31	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción

## ES 2 535 319 T3

32	Aplicar una gota de [PROTEASE 1] (enzima), aplicar el cubreobjetos e incubar durante [8 minutos]
33	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
34	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
35	Aplicar el cubreobjetos
36	Calentar el portaobjetos a 37°C e incubar durante 4 minutos
37	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
38	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
39	Aplicar el cubreobjetos
40	Aplicar una gota de anticuerpo (p. ej., clon 3C6) e incubar durante [0 horas 32 min]
41	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción

Paso nº	Tinción de anticuerpo anti-dominio externo del EGFR (ensayo automático)
42	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
43	Aplicar el cubreobjetos
44	Calentar el portaobjetos a 37°C e incubar durante 4 minutos
45	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
46	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
47	Aplicar una gota de I-VIEW BIOTIN Ig, aplicar el cubreobjetos e incubar durante 8 minutos
48	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
49	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
50	Aplicar una gota de I-VIEW SA-HRP, aplicar el cubreobjetos e incubar durante 8 minutos
51	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
52	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
53	Aplicar el cubreobjetos
54	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
55	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
56	Aplicar una gota de I-VIEW DAB y una gota de I-VIEW H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , aplicar el cubre objetos e incubar durante 8 minutos
57	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
58	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
59	Aplicar una gota de I-VIEW COPPER, aplicar el cubreobjetos e incubar durante 4 minutos
60	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
61	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
62	Aplicar una gota de [HEMATOXYLIN II] (contratinción), aplicar el cubreobjetos e incubar durante [4 minutos]
63	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
64	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
65	Aplicar el cubreobjetos

66	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
67	Ajustar el volumen del portaobjetos con una solución tampón de reacción
68	Aplicar una gota de [BLUING REAGENT] (tras contratinción), aplicar el cubreobjetos e incubar durante [4 minutos]
69	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción
70	Aplicar el cubreobjetos
71	Desactivar el calentador del portaobjetos
72	***** Select Optional Wash *****
73	***** Select SSC Wash *****
74	***** Start Timed Steps *****
75	Enjuagar el portaobjetos con una solución tampón de reacción

**Ejemplo 3**

**EL ANTICUERPO ESPECÍFICO PARA EL EPITOPO DEL DOMINIO REGULADOR DEL EGFR DE FORMA IMPREVISTA NO PRESENTA UNA UNIÓN SUSTANCIAL A ALGUNOS DE LOS TEJIDOS EGFR POSITIVOS**

5

Este Ejemplo demuestra que las moléculas de unión al RD, como el clon 5B7, presentaron una unión diferenciada a los tejidos EGFR positivos (detectada mediante un anticuerpo específico para el dominio externo del EGFR). Tal y como se describe detalladamente más abajo, aunque sin limitarse a una única teoría, se cree que esta unión diferenciada se debe a la expresión diferenciada de proteínas reguladoras del EGFR (por ejemplo, proteínas SOCS, tales como SOCS1 o SOCS3) en los tejidos EGFR positivos. Estas proteínas reguladoras, cuando están directamente asociadas con el dominio regulador del EGFR, enmascaran los epitopos de las moléculas de unión a RD.

10

**A. Tejidos humanos normales**

15

Se comparó la tinción mediante IHC de anticuerpos específicos para el dominio regulador del EGFR (es decir, el clon 5B7) y su dominio externo (es decir, el clon 3C6) en 30 tejidos humanos normales FFPE. Las matrices de tejido se obtuvieron de USBiomax (Ijamsville, MD; Cat. nº FDA801). Los protocolos de tinción automática descritos en el Ejemplo 2 se utilizaron para teñir las matrices de tejido en una plataforma de tinción de tejidos automática de la serie BenchMark™.

20

Tal y como se muestra en la Fig. 5, el clon 3C6 específico para el dominio extracelular tiñó positivamente los tejidos de piel, testículos, amígdalas, hígado y placenta, lo que es coherente con los patrones de expresión del EGFR conocidos en el tejido normal. La Fig. 5 muestra también que el clon 5B7 específico del dominio regulador reaccionó positivamente con el tejido de piel, testículos y amígdala normal. Sin embargo, sorprendentemente este anticuerpo no reaccionó con el hígado normal (véase, por ejemplo, la Fig. 5B) y demostró una reactividad variable en el caso del EGFR de la placenta en la fase de desarrollo de esta última (Virchows Archiv A Pathol Anat., 420:385 393, 1992).

25

**B. Tumores NSCLC humanos**

30

Se sabe que las células de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) expresan el EGFR en aproximadamente el 75% de los tumores. El clon 5B7 específico del dominio regulador y el clon 3C6 específico del dominio externo se utilizaron para teñir una cohorte de casos de NSCLC de tres micromatrices de tejido disponibles en el mercado (Array LC801 y Array LC819 (Biomax; Ijamsville, MD) y Array IMH-305 (Imgenex (San Diego, CA)).

35

Tal y como se muestra en la Tabla 3, Subparte A, el clon 3C6 detectó EGFR en el 83% de los casos de pulmón (como cabría esperar basándose en las estimaciones de la bibliografía sobre la tinción del EGFR en el NSCLC), mientras que el clon 5B7 obtuvo tinciones positivas en el 65% de los tumores de pulmón. Esto corresponde a una discordancia del 18,5% entre el clon 3C6 y el clon 5B7, donde este último no registró tinción alguna en 38 casos que fueron positivos para la tinción del clon 3C6. Tabla 3. Resumen del estudio de inmunohistoquímica del NSCLC

Subparte A			
5B7	3C6		
	Positivo	Negativo	Total

<b>Positivo</b>	132	1	133
<b>Negativo</b>	38	34	72
<b>Total</b>	170	35	205
Subparte B			
<b>Sensibilidad</b>	78%		
<b>Especificidad</b>	97%		
<b>Total</b>	81%		
<b>Kappa</b>	67%		

Tal y como se resume en la Tabla 3, Subparte B, los dos anticuerpos registraron una tinción positiva en el 78% de los casos (es decir, Sensibilidad (132/[132+38]); y los dos anticuerpos registraron una tinción negativa en el 97% de los casos (es decir, Especificidad (34/[1+34]). La concordancia total fue del 81% ((132+43)/205). La estadística de Kappa, que es otra medida de la concordancia, se puede interpretar como sigue: <0 =Ausencia de concordancia, 0,0-0,19=Bajo nivel de concordancia, 0,20-0,39=Justo nivel de concordancia, 0,40-0,59=Concordancia moderada, 0,60-0,79=Concordancia sustancial y 0,80-1,00=Concordancia casi perfecta (Landis y Koch, Biometrics, 33:159-174, 1977). La puntuación Kappa para el clon 3C6 frente al clon 5B7 fue del 67%, lo que la enmarca en la categoría de concordancia sustancial.

Algunos ejemplos concretos que demuestran las diferencias en la unión del clon 5B7 específico para el dominio regulador del EGFR y el clon 3C6 específico para el dominio externo del EGFR a carcinomas de células escamosas del pulmón se muestran en la Fig. 6. El Caso 1 (panel izquierdo) demostró una tinción equivalente de células por parte de los dos anticuerpos, lo que indica (entre otras cosas) que no existe una diferencia en la sensibilidad general del clon 5B7 en comparación con el clon 3C6 cuando el epítipo de cada uno resulta accesible. El Caso 2 (panel derecho) demostró una tinción notablemente diferente entre los dos anticuerpos, con el clon 5B7 siendo negativo y el clon 3C6 siendo 3+ positivo (escala de 0-3+).

La unión diferencial del clon 5B7 (específico para el dominio regulador intracelular del EGFR) en comparación con el clon 3C6 (específico para el dominio extracelular del EGFR) en tejidos normales y neoplásicos mostrada en este Ejemplo respalda firmemente la idea de que el epítipo del clon 5B7 resultaba accesible únicamente en algunos tejidos.

#### Ejemplo 4

##### MAPEO DEL EPITOPO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL, CLON 5B7

El epítipo del anticuerpo monoclonal específico para el dominio regulador del EGFR, el clon 5B7, se mapeó mediante estudios de inhibición de péptidos. Dado que el Péptido L2G se utilizó como inmunógeno para detectar clones positivos, se sabía que el epítipo de 5B7 debía encontrarse dentro de esa secuencia de 19 aminoácidos (véase la SEC. ID. N° 2). El Péptido L2G, un péptido que contiene los 13 residuos de aminoácidos C-terminales del Péptido L2G, y un péptido que contiene los seis residuos de aminoácidos N-terminales del Péptido L2G más tres residuos N-terminales adicionales (es decir, QIS) correspondientes a las respectivas posiciones en la secuencia del EGFR humano. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos en cuestión se muestran en la Fig. 7A. Los péptidos se sintetizaron en Genemed Synthesis, Inc. (South San Francisco, CA).

Se seleccionó un carcinoma de células escamosas de pulmón EGFR positivo conocido para el estudio de inhibición del péptido. El anticuerpo 5B7 fue preincubado con cada péptido durante una hora a temperatura ambiente antes de la aplicación al tejido. Se empleó un exceso molar de 1000 veces de péptido frente a anticuerpo.

Tal y como se muestra en la Fig. 7, el Péptido 1 provocó una inhibición parcial de la unión de 5B7, lo que indica que parte del epítipo estaba incluido dentro del Péptido 1. El Péptido 2 provocó una inhibición completa de la unión de 5B7, lo que indica que el epítipo primario estaba incluido en el Péptido 2. Lógicamente, los tres aminoácidos compartidos por los Péptidos 1 y 2 (es decir, QQD) deben contener al menos parte del epítipo complejo. El Péptido 3 también inhibió por completo la unión de 5B7; por tanto, la tirosina no contribuyó de forma significativa al epítipo de 5B7. Un epítipo medio tiene del orden de 7-12 aminoácidos contiguos; por tanto, los residuos que se encuentran dentro del recuadro de la Fig. 7 representan un probable epítipo de 5B7 de longitud completa con alguna posibilidad de 1-5 residuos adicionales en el extremo C-terminal.

#### Ejemplo 5

##### SOCS3 KNOCKOUT DESENASCARA EL EPITOPO DEL CLON 5B7

El Péptido L2G de la secuencia del EGFR se encuentra dentro de la región de unión para SOCS3 (Xia *et al*, *J. Biol Chem.*, 277(34):30716-23, 2002). Por tanto, se postula que SOCS3 puede estar enmascarando el epitopo de 5B7 en algunos tejidos. Para probar esta hipótesis, se obtuvieron hígados de un ratón con SOCS3knockout específicas hepáticas del laboratorio que desarrolló el modelo (Ogata *et al*, *Gastroenterology*, 131(1): 179-93, 2006). Las secciones de hígado fijadas con formalina y embebidas en parafina de ratones SOCS3 y de tipo salvaje se tiñeron con el clon 5B7 tal y como se describe en el Ejemplo 2.

Tal y como se muestra en los dos paneles de la izquierda de la Fig. 8, el clon 5B7 no tiñó el hígado normal, que expresa SOCS3. En comparación, tal y como se muestra en los dos paneles de la derecha de la Fig. 8, el clon 5B7 tiñó positivamente las membranas de las células de los hígados que carecían de SOCS3. Estos resultados indican que la pérdida o ausencia de SOCS3 permite la unión del clon 5B7 al dominio regulador del EGFR.

SOCS3 es solamente un ejemplo de molécula reguladora que interactúa directamente con el EGFR. Los resultados demostrados en el presente son generalmente aplicables a otras moléculas de unión específica para la interfaz que tienen epitopos en la interfaz entre los dos componentes de un complejo molecular, como entre el EGFR y sus múltiples proteínas reguladoras.

**Ejemplo 6**

**LAS MOLÉCULAS DE UNIÓN AL RD DEL EGFR, COMO EL CLON 5B7, PREDICEN LA RESPUESTA DE LOS PACIENTES CON CÁNCER NSCLC A LA TERAPIA INHIBIDORA DEL EGFR**

Este Ejemplo demuestra que una molécula de unión a RD divulgada (por ejemplo, el clon 5B7) predice la respuesta de los pacientes con NSCLC a la terapia inhibidora del EGFR (IRESSA™).

Se obtienen matrices de tejido que contienen muestras de biopsia de al menos 100 pacientes con cáncer NSCLC. Cada paciente es tratado con una terapia de IRESSA™ (inhibidor del EGFR) con una dosis oral de 250 mg/day. Cada paciente se somete a un seguimiento durante hasta cinco años después de la terapia. Cada muestra de biopsia es fijada con NBF al 10% y embebida en parafina. Se cortan secciones de cinco (5) micrones de cada muestra de biopsia y se disponen en una matriz sobre portaobjetos de vidrio de carga positiva. Los portaobjetos se tiñen con una molécula de unión a RD (por ejemplo, el clon 5B7) y una molécula de unión a ED (por ejemplo, el clon 3C6) conforme a los protocolos del Ejemplo 2. Los portaobjetos con las matrices teñidas resultantes reciben una puntuación bajo la luz del microscopio por parte de un patólogo, en función de los criterios siguientes:

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de tinción	Observación al microscopio
Positivo: Cualquier tinción IHC de las membranas de las células tumorales por encima del nivel de referencia, sea una tinción circunferencial completa o incompleta, en más del 0% de las células tumorales.	3+	Reactividad fuerte: Una tinción de color marrón oscuro a negro es habitual, aunque no se da siempre, en un patrón de membrana completa, lo que produce un perfilado grueso de la célula. La reactividad citoplasmática puede no producirse o ser moderadamente intensa cuando la tinción de la membrana es muy intensa. Puede observarse una acentuación citoplasmática submembranosa.
	2,5	Reactividad intensa: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) media. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	2+	Reactividad moderada: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) intermedia. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.

	1,5	Reactividad ligera: Tinción de intensidad intermedia que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de positividad.
	1 +	Reactividad débil: Reactividad de color marrón apagado o claro que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
Negativo: Ausencia de tinción de la membrana superior a la referencia en todas las células tumorales. Presencia de tinción citoplasmática en ausencia de tinción de la membrana.	0,5	Trazos de reactividad: Trazos de reactividad de color marrón donde la localización membranosa y citoplasmática es indeterminada.
	0	Ausencia de reactividad

5 La puntuación de cada caso se registra en una base de datos en la que se compara la puntuación de cada una de las moléculas de unión (p. ej., 5B7 o 3C6). El resultado de cada caso se asigna a una de las cuatro categorías que se describen en la Tabla 2. Se espera que aproximadamente el 65% de los casos correspondan a la categoría 1, el 19% a la categoría 2, menos del 1% a la categoría 3 y el 15% a la categoría 4. El resultado del paciente está directamente relacionado con la categoría de puntuación que se indica en la Tabla 2 para una terapia basada en ID. Los pacientes de las categorías 1 y 3 presentarán una respuesta objetiva a la terapia con IRESSA™ y los pacientes de las categorías 2 y 4 no presentarán una respuesta significativa a la terapia con IRESSA™.

10 **Ejemplo 7**

**LAS MOLÉCULAS DE UNIÓN AL RD DEL EGFR, COMO EL CLON 5B7, PREDICEN LA RESPUESTA DE LOS PACIENTES CON CÁNCER NSCLC A LA TERAPIA INHIBIDORA DEL EGFR**

Este Ejemplo demuestra que una molécula de unión a RD divulgada (por ejemplo, el clon 5B7) predice la respuesta de los pacientes con cáncer NSCLC a la terapia inhibidora del EGFR (TARCEVA™).

15 Se obtienen matrices de tejido que contienen muestras de biopsia de al menos 100 pacientes con cáncer NSCLC. Cada paciente es tratado con una terapia de TARCEVA™ (inhibidor del EGFR) con una dosis oral de 150 mg/día. Cada paciente se somete a un seguimiento durante hasta cinco años después de la terapia. Cada muestra de biopsia es fijada con NBF al 10% y embebida en parafina. Se cortan secciones de cinco (5) micrones de cada muestra de biopsia y se disponen en una matriz sobre portaobjetos de vidrio de carga positiva. Los portaobjetos se tiñen con una molécula de unión a RD (por ejemplo, el clon 5B7) y una molécula de unión a ED (por ejemplo, el clon 3C6) conforme a los protocolos del Ejemplo 2. Los portaobjetos con las matrices teñidas resultantes reciben una puntuación bajo la luz del microscopio por parte de un patólogo, en función de los criterios siguientes:

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de tinción	Observación al microscopio
Positivo: Cualquier tinción IHC de las membranas de las células tumorales por encima del nivel de referencia, sea una tinción circunferencial completa o	3+	Reactividad fuerte: Una tinción de color marrón oscuro a negro es habitual, aunque no se da siempre, en un patrón de membrana completa, lo que produce un perfilado grueso de la célula. La reactividad citoplasmática puede no producirse o ser moderadamente intensa cuando la tinción de la membrana es muy intensa. Puede observarse una acentuación citoplasmática submembranosa.

incompleta, en más del 0% de las células tumorales.	2,5	Reactividad intensa: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) media. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	2+	Reactividad moderada: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) intermedia. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	1,5	Reactividad ligera: Tinción de intensidad intermedia que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de tinción	Observación al microscopio
	1+	Reactividad débil: Reactividad de color marrón apagado o claro que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
Negativo: Ausencia de tinción de la membrana superior a la referencia en todas las células tumorales. Presencia de tinción citoplasmática en ausencia de tinción de la membrana.	0,5	Trazos de reactividad: Trazos de reactividad de color marrón donde la localización membranosa y citoplasmática es indeterminada.
	0	Ausencia de reactividad

5 La puntuación de cada caso se registra en una base de datos en la que se compara la puntuación de cada una de las moléculas de unión (p. ej., 5B7 o 3C6). El resultado de cada caso se asigna a una de las cuatro categorías que se describen en la Tabla 2. Se espera que aproximadamente el 65% de los casos correspondan a la categoría 1, el 19% a la categoría 2, menos del 1% a la categoría 3 y el 15% a la categoría 4. El resultado del paciente está directamente relacionado con la categoría de puntuación que se indica en la Tabla 2 para una terapia basada en ID. Los pacientes de las categorías 1 y 3 presentarán una respuesta objetiva a la terapia con TARCEVA™ y los pacientes de las categorías 2 y 4 no presentarán una respuesta significativa a la terapia con TARCEVA™.

#### Ejemplo 8

#### LAS MOLÉCULAS DE UNIÓN AL RD DEL EGFR, COMO EL CLON 5B7, PREDICEN LA RESPUESTA DE LOS PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL A LA TERAPIA INHIBIDORA DEL EGFR

15 Este Ejemplo demuestra que una molécula de unión a RD divulgada (por ejemplo, el clon 5B7) predice la respuesta de los pacientes con cáncer colorrectal a la terapia inhibidora del EGFR (ERBITUX™).

Se obtienen matrices de tejido que contienen muestras de biopsia de al menos 100 pacientes con cáncer colorrectal. Cada paciente es tratado con una terapia de ERBITUX™ (inhibidor del EGFR) con una dosis intravenosa de 400 mg/m<sup>2</sup>. Cada paciente se somete a un seguimiento durante hasta cinco años después de la terapia. Cada muestra de biopsia es fijada con NBF al 10% y embebida en parafina. Se cortan secciones de

cinco (5) micrones de cada muestra de biopsia y se disponen en una matriz sobre portaobjetos de vidrio de carga positiva. Los portaobjetos se tiñen con una molécula de unión a RD (por ejemplo, el clon 5B7) y una molécula de unión a ED (por ejemplo, el clon 3C6) conforme a los protocolos del Ejemplo 2. Los portaobjetos con las matrices teñidas resultantes reciben una puntuación bajo la luz del microscopio por parte de un patólogo, en función de los criterios siguientes:

5

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de tinción	Observación al microscopio
Positivo: Cualquier tinción IHC de las membranas de las células tumorales por encima del nivel de referencia, sea una tinción circunferencial completa o incompleta, en más del 0% de las células tumorales.	3+	Reactividad fuerte: Una tinción de color marrón oscuro a negro es habitual, aunque no se da siempre, en un patrón de membrana completa, lo que produce un perfilado grueso de la célula. La reactividad citoplasmática puede no producirse o ser moderadamente intensa cuando la tinción de la membrana es muy intensa. Puede observarse una acentuación citoplasmática submembranosa.
	2,5	Reactividad intensa: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) media. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	2+	Reactividad moderada: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) intermedia. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	1,5	Reactividad ligera: Tinción de intensidad intermedia que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
	1 +	Reactividad débil: Reactividad de color marrón apagado o claro que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
Negativo: Ausencia de tinción de la membrana superior a la referencia en todas las células tumorales. Presencia de tinción citoplasmática en ausencia de tinción de la membrana.	0,5	Trazos de reactividad: Trazos de reactividad de color marrón donde la localización membranosa y citoplasmática es indeterminada.
	0	Ausencia de reactividad

La puntuación de cada caso se registra en una base de datos en la que se compara la puntuación de cada una de las moléculas de unión (p. ej., 5B7 o 3C6). El resultado de cada caso se asigna a una de las cuatro categorías que se describen en la Tabla 2. Se espera que aproximadamente el 65% de los casos correspondan a la categoría 1, el 19% a la categoría 2, menos del 1% a la categoría 3 y el 15% a la categoría 4. El resultado del paciente está directamente relacionado con la categoría de puntuación que se indica en la Tabla 2 para una terapia basada en ED. Los pacientes de la categoría 1 presentarán una respuesta objetiva a la terapia con ERBITUX™ y los pacientes de las categorías 2, 3 y 4 no presentarán una respuesta significativa a la terapia con ERBITUX™

10

**Ejemplo 9**

**LAS MOLÉCULAS DE UNIÓN AL RD DEL EGFR, COMO EL CLON 5B7, PREDICEN LA RESPUESTA DE LOS PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL A LA TERAPIA INHIBIDORA DEL EGFR**

5 Este Ejemplo demuestra que una molécula de unión a RD divulgada (por ejemplo, el clon 5B7) predice la respuesta de los pacientes con cáncer colorrectal a la terapia inhibidora del EGFR (VECTIBIX™).

10 Se obtienen matrices de tejido que contienen muestras de biopsia de al menos 100 pacientes con cáncer colorrectal. Cada paciente es tratado con una terapia de VECTIBIX™ (inhibidor del EGFR) con una dosis intravenosa de 6 mg/kg. Cada paciente se somete a un seguimiento durante hasta cinco años después de la terapia. Cada muestra de biopsia es fijada con NBF al 10% y embebida en parafina. Se cortan secciones de cinco (5) micrones de cada muestra de biopsia y se disponen en una matriz sobre portaobjetos de vidrio de

10 cinco (5) micrones de cada muestra de biopsia y se disponen en una matriz sobre portaobjetos de vidrio de carga positiva. Los portaobjetos se tiñen con una molécula de unión a RD (por ejemplo, el clon 5B7) y una molécula de unión a ED (por ejemplo, el clon 3C6) conforme a los protocolos del Ejemplo 2. Los portaobjetos con las matrices teñidas resultantes reciben una puntuación bajo la luz del microscopio por parte de un patólogo, en función de los criterios siguientes:

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de tinción	Observación al microscopio
Positivo: Cualquier tinción IHC de las membranas de las células tumorales por encima del nivel de referencia, sea una tinción circunferencial completa o incompleta, en más del 0% de las células tumorales.	3+	Reactividad fuerte: Una tinción de color marrón oscuro a negro es habitual, aunque no se da siempre, en un patrón de membrana completa, lo que produce un perfilado grueso de la célula. La reactividad citoplasmática puede no producirse o ser moderadamente intensa cuando la tinción de la membrana es muy intensa. Puede observarse una acentuación citoplasmática submembranosa.
	2,5	Reactividad intensa: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) media. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	2+	Reactividad moderada: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) intermedia. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	1,5	Reactividad ligera: Tinción de intensidad intermedia que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.

15

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de tinción	Observación al microscopio
	1+	Reactividad débil: Reactividad de color marrón apagado o claro que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma,

		aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
Negativo: Ausencia de tinción de la membrana superior a la referencia en todas las células tumorales. Presencia de tinción citoplasmática en ausencia de tinción de la membrana.	0,5	Trazos de reactividad: Trazos de reactividad de color marrón donde la localización membranosa y citoplasmática es indeterminada.
	0	Ausencia de reactividad

La puntuación de cada caso se registra en una base de datos en la que se compara la puntuación de cada una de las moléculas de unión (p. ej., 5B7 o 3C6). El resultado de cada caso se asigna a una de las cuatro categorías que se describen en la Tabla 2. Se espera que aproximadamente el 65% de los casos correspondan a la categoría 1, el 19% a la categoría 2, menos del 1% a la categoría 3 y el 15% a la categoría 4. El resultado del paciente está directamente relacionado con la categoría de puntuación que se indica en la Tabla 2 para una terapia basada en ED. Los pacientes de la categoría 1 presentarán una respuesta objetiva a la terapia con VECTIBIX™ y los pacientes de las categorías 2, 3 y 4 no presentarán una respuesta significativa a la terapia con VECTIBIX™.

#### Ejemplo 10

#### LAS MOLÉCULAS DE UNIÓN AL RD DEL EGFR, COMO EL CLON 5B7, PREDICEN LA RESPUESTA DE LOS PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA A LA TERAPIA INHIBIDORA DEL EGFR

Este Ejemplo demuestra que una molécula de unión a RD divulgada (por ejemplo, el clon 5B7) predice la respuesta de los pacientes con cáncer de mama a la terapia inhibidora del EGFR o, más concretamente, a la terapia inhibidora de HER1 (EGFR)/Her2 (como lapatinib (TYKERB™)).

Se obtienen matrices de tejido que contienen muestras de biopsia de al menos 100 pacientes con cáncer de mama. Cada paciente es tratado con una terapia de lapatinib (TYKERB™ (inhibidor de HER1 (EGFR)/HER2) con una dosis oral de 1250-1500 mg/día. Cada paciente se somete a un seguimiento durante al menos 20 meses después de la terapia. Cada muestra de biopsia es fijada con un fijador estándar y embebida en parafina. Se cortan secciones de cada muestra de biopsia (por ejemplo, de 5 µm de grosor y se disponen en una matriz sobre portaobjetos de vidrio de carga positiva. Los portaobjetos se tiñen con una molécula de unión a RD (por ejemplo, el clon 5B7) y una molécula de unión a ED (por ejemplo, el clon 3C6) conforme a los protocolos del Ejemplo 2. Los portaobjetos con las matrices teñidas resultantes reciben una puntuación bajo la luz del microscopio por parte de un patólogo, en función de los criterios siguientes:

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de tinción	Observación al microscopio
Positivo: Cualquier tinción IHC de las membranas de las células tumorales	3+	Reactividad fuerte: Una tinción de color marrón oscuro a negro es habitual, aunque no se da siempre, en un patrón de membrana completa, lo que produce un perfilado grueso de la célula. La reactividad citoplasmática puede no producirse o ser moderadamente intensa cuando la tinción de la membrana es muy intensa. Puede observarse una acentuación citoplasmática submembranosa.
	2,5	Reactividad intensa: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) media. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.

por encima del nivel de referencia, sea una tinción circunferencial completa o incompleta, en más del 0% de las células tumorales.	2+	Reactividad moderada: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) intermedia. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	1,5	Reactividad ligera: Tinción de intensidad intermedia que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
	1 +	Reactividad débil: Reactividad de color marrón apagado o claro que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
Negativo: Ausencia de tinción de la membrana superior a la referencia en todas las células tumorales. Presencia de tinción citoplasmática en ausencia de tinción de la membrana.	0,5	Trazos de reactividad: Trazos de reactividad de color marrón donde la localización membranosa y citoplasmática es indeterminada.
	0	Ausencia de reactividad

La puntuación de cada caso se registra en una base de datos en la que se compara la puntuación de cada una de las moléculas de unión (p. ej., 5B7 o 3C6). El resultado de cada caso se asigna a una de las cuatro categorías que se describen en la Tabla 2. Se espera que aproximadamente el 20% de los casos correspondan a la categoría 1, el 16% a la categoría 2, el 3% a la categoría 3 y el 61% a la categoría 4. El resultado del paciente está directamente relacionado con la categoría de puntuación que se indica en la Tabla 2 para una terapia basada en ID. Los pacientes de las categorías 1 y 3 presentarán una respuesta objetiva a la terapia con lapatinib (TYKERB™) y los pacientes de las categorías 2 y 4 no presentarán una respuesta significativa a la terapia con lapatinib (TYKERB™).

**Ejemplo 11**

**LAS MOLÉCULAS DE UNIÓN AL RD DEL EGFR, COMO EL CLON 5B7, PREDICEN LA RESPUESTA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA HEPATOCELULAR A LA TERAPIA INHIBIDORA DEL EGFR.**

Este Ejemplo demuestra que una molécula de unión a RD divulgada (por ejemplo, el clon 5B7) predice la respuesta de los pacientes con carcinoma hepatocelular («HCC») (como un HCC reseccable) a la terapia inhibidora del EGFR (IRESSA™).

Se obtienen matrices de tejido que contienen muestras de biopsia de al menos 100 pacientes con cáncer HCC (véanse, por ejemplo, las muestras recogidas en JS 0414, «A Pilot Study of Adjuvant Therapy of Gefitinib (Iressa, ZD 183 9) in Patients with Resectable Hepatocellular Carcinoma», ClinicalTrials.gov Identificador nº NCT00228501). Cada paciente es tratado con una terapia de IRESSA™ (inhibidor del EGFR) con una dosis oral de 200-500 mg/día. Cada paciente se somete a un seguimiento durante al menos 12 meses después de la terapia. Cada muestra de biopsia es fijada en un fijador estándar (por ejemplo, NBF al 10%) y embebida en parafina. Se cortan secciones de cada muestra de biopsia (por ejemplo, de 5 µm de grosor) y se disponen en una matriz sobre portaobjetos de vidrio de carga positiva. Los portaobjetos se tiñen con una molécula de unión a RD (por ejemplo, el clon 5B7) y una molécula de unión a ED (por ejemplo, el clon 3C6) conforme a los protocolos del Ejemplo 2. Los portaobjetos con las matrices teñidas resultantes reciben una puntuación bajo la luz del microscopio por parte de un patólogo, en función de los criterios siguientes:

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de tinción	Observación al microscopio
-----------------------	--	----------------------------

<p>Positivo: Cualquier tinción IHC de las membranas de las células tumorales por encima del nivel de referencia, sea una tinción circunferencial completa o incompleta, en más del 0% de las células tumorales.</p>	3+	<p>Reactividad fuerte: Una tinción de color marrón oscuro a negro es habitual, aunque no se da siempre, en un patrón de membrana completa, lo que produce un perfilado grueso de la célula. La reactividad citoplasmática puede no producirse o ser moderadamente intensa cuando la tinción de la membrana es muy intensa. Puede observarse una acentuación citoplasmática submembranosa.</p>
	2,5	<p>Reactividad intensa: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) media. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.</p>
	2+	<p>Reactividad moderada: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) intermedia. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.</p>

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de tinción	Observación al microscopio
	1,5	<p>Reactividad ligera: Tinción de intensidad intermedia que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.</p>
	1 +	<p>Reactividad débil: Reactividad de color marrón apagado o claro que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.</p>
<p>Negativo: Ausencia de tinción de la membrana superior a la referencia en todas las células tumorales. Presencia de tinción citoplasmática en ausencia de tinción de la membrana.</p>	0,5	<p>Trazos de reactividad: Trazos de reactividad de color marrón donde la localización membranosa y citoplasmática es indeterminada.</p>
	0	<p>Ausencia de reactividad</p>

5 La puntuación de cada caso se registra en una base de datos en la que se compara la puntuación de cada una de las moléculas de unión (p. ej., 5B7 o 3C6). El resultado de cada caso se asigna a una de las cuatro categorías que se describen en la Tabla 2. Se espera que aproximadamente el 60% de los casos correspondan a la categoría 1, el 13% a la categoría 2, el 5% a la categoría 3 y el 22% a la categoría 4. El resultado del paciente está directamente relacionado con la categoría de puntuación que se indica en la Tabla 2 para una terapia basada en ID. Los pacientes de las categorías 1 y 3 presentarán una respuesta objetiva a la terapia con IRESSA™ y los pacientes de las categorías 2 y 4 no presentarán una respuesta significativa a la

10 terapia con IRESSA™.

**Ejemplo 12**

**EL ESTADO DEL CLON 5B7 ES UN INDICADOR CLARO DEL CÁNCER DE PULMÓN**

**PRONÓSTICO**

Este Ejemplo demuestra que el clon 5B7 predice el pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón.

Se obtuvieron matrices de tejido que contenían muestras de biopsias de pulmón de 109 pacientes con NSCLC en fase I o II (un subconjunto de la cohorte más amplia descrita en Olausson *et al.*, *New Engl. J. Med.*, 355(10):983-991, 2006). Ninguno de los pacientes de los que se obtuvieron las biopsias había sido tratado con una terapia basada en el EGFR (por ejemplo, ERBITUX™, VECTIBIX™, IRESSA™, o TARCEVA™). La supervivencia del paciente tras el diagnóstico se controló de forma continuada. Cada una de las muestras se embebió en parafina, las áreas cancerosas de la biopsia se identificaron, se retiró una parte central del área cancerosa y se colocó en un bloque de parafina con la matriz del donante. Se cortaron secciones de tres a cinco micrones del bloque de la matriz del donante y se colocaron en portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos que contenían secciones en serie del bloque de la matriz del donante se tiñeron con clon 5B7 o clon 3C6 de acuerdo con los protocolos del Ejemplo 2. Los portaobjetos teñidos resultantes reciben una puntuación bajo la luz del microscopio por parte de un patólogo, en función de los criterios siguientes:

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de la tinción	Observación al microscopio
Positivo: Cualquier tinción IHC de las membranas de las células tumorales por encima del nivel de referencia, sea una tinción circunferencial completa o incompleta, en más del 0% de las células tumorales.	3+	Reactividad fuerte: Una tinción de color marrón oscuro a negro es habitual, aunque no se da siempre, en un patrón de membrana completa, lo que produce un perfilado grueso de la célula. La reactividad citoplasmática puede no producirse o ser moderadamente intensa cuando la tinción de la membrana es muy intensa. Puede observarse una acentuación citoplasmática submembranosa.
	2,5	Reactividad intensa: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) media. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	2+	Reactividad moderada: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) intermedia. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	1,5	Reactividad ligera: Tinción de intensidad intermedia que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
	1 +	Reactividad débil: Reactividad de color marrón apagado o claro que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
Negativo: Ausencia de tinción de la membrana superior a la referencia en todas las células tumorales. Presencia de tinción citoplasmática en ausencia de tinción de la	0,5	Trazos de reactividad: Trazos de reactividad de color marrón donde la localización membranosa y citoplasmática es indeterminada.
	0	Ausencia de reactividad

membrana.		
-----------	--	--

La puntuación de cada una de las muestras de biopsia y el seguimiento asociado se muestran en la siguiente tabla:

<b>Muestra</b>	<b>3C6</b>	<b>5B7</b>	<b>Meses a la</b>	<b>Meses</b>
<b>Número</b>	<b>Puntuación</b>	<b>Puntuación</b>	<b>Recurrencia</b>	<b>Muerte</b>
P003	2	2	Ninguno	Ninguno
P005	2,5	0,5	35	36
P006	0	2	6	36
P007	0	2	Ninguno	Ninguno
P008	0	1	5	25

<b>Muestra</b>	<b>3C6</b>	<b>5B7</b>	<b>Meses a la</b>	<b>Meses</b>
<b>Número</b>	<b>Puntuación</b>	<b>Puntuación</b>	<b>Recurrencia</b>	<b>Muerte</b>
P163	2	1	Ninguno	Ninguno
P165	1	1	Ninguno	Ninguno
P167	0,5	1,5	Ninguno	Ninguno
P168	3	3	Ninguno	Ninguno
P169	2,5	2,5	Ninguno	Ninguno

<b>Muestra</b>	<b>3C6</b>	<b>5B7</b>	<b>Meses a la</b>	<b>Meses</b>
<b>Número</b>	<b>intensidad de la tinción</b>	<b>intensidad de la tinción</b>	<b>Recurrencia</b>	<b>Muerte</b>
P010	3	0,5	Ninguno	Ninguno
P011	2,5	0,5	42	57
P012	2,5	2	Ninguno	Ninguno
P014	2	2,5	70	Ninguno
P015	0	1	Ninguno	Ninguno
P016	1	1	Ninguno	Ninguno
P017	2,5	2	17	33
P018	2,5	2	Ninguno	Ninguno
P019	3	2	Ninguno	Ninguno
P020	0,5	1	Ninguno	Ninguno

P022	2	1,5	Ninguno	Ninguno
P023	0	2	17	Ninguno
P024	0	0,5	Ninguno	Ninguno
P025	0	2,5	Ninguno	Ninguno
P026	0	2,5	16	94
P029	0,5	1	47	24
P030	0	2	Ninguno	Ninguno
P031	2	1,5	36	70
P033	3	2	Ninguno	Ninguno
P037	0,5	4,5	Ninguno	96
P039	0	1	Ninguno	Ninguno
P041	0,5	1,5	Ninguno	Ninguno
P042	1	0	Ninguno	Ninguno
P044	1	1	Ninguno	Ninguno
P047	0	2	8	25
P050	1,5	0	Ninguno	Ninguno
P051	2,5	0,5	Ninguno	Ninguno
P057	1	0	90	Ninguno
P058	0	0,5	Ninguno	Ninguno
P061	2	1	Ninguno	Ninguno
P063	1,5	3	Ninguno	Ninguno
P064	1,5	2,5	65	Ninguno
P065	0	1,5	Ninguno	Ninguno
P066	0,5	0,5	Ninguno	Ninguno
P068	3	1	Ninguno	Ninguno
P070	1	1	5	7
P071	0,5	3	15	18

ES 2 535 319 T3

P072	3	2	22	25
P073	1	0,5	68	Ninguno
P074	2,5	0	Ninguno	Ninguno
P076	2	0,5	Ninguno	Ninguno
P078	3	1,5	Ninguno	Ninguno
P080	0,5	3	Ninguno	Ninguno
P161	0	0	Ninguno	Ninguno
P162	2	2	Ninguno	Ninguno

<b>Muestra</b>	<b>3C6</b>	<b>SB7</b>	<b>Meses a la Recurrencia</b>	<b>Meses a la Muerte</b>
<b>Número</b>	<b>intensidad de la tinción</b>	<b>intensidad de la tinción</b>	<b>Recurrencia</b>	<b>Muerte</b>
P170	2	2,5	Ninguno	Ninguno
P171	1	1	Ninguno	Ninguno
P172	0	0,5	19	28
PI 73	0	1	Ninguno	Ninguno
PI 74	2	2	Ninguno	Ninguno
P175	0,5	2	Ninguno	Ninguno
PI 76	0,5	0,5	Ninguno	Ninguno
P177	0,5	2	Ninguno	Ninguno
PI 78	2	2	Ninguno	Ninguno
P179	3	2,5	Ninguno	Ninguno
PI 80	1,5	1	Ninguno	Ninguno
P181	2,5	2,5	Ninguno	Ninguno
P182	3	3	Ninguno	Ninguno
PI 84	3	3	16	44
PI 87	2	2,5	Ninguno	Ninguno
P188	1	1	Ninguno	Ninguno
P189	0	1	17	Ninguno
P190	3	3	17	44
PI94	1,5	3	Ninguno	Ninguno
P197	0	1	Ninguno	Ninguno
P200	1	0,5	Ninguno	Ninguno
P202	3	3	8	20
P203	1,5	2	9	15

P207	1	2,5	Ninguno	Ninguno
P209	2,5	2,5	Ninguno	Ninguno
P210	2	1	Ninguno	Ninguno
P211	2	3	4	5
P212	1	1,5	Ninguno	Ninguno
P213	3	3	29	Ninguno
P214	2	2,5	Ninguno	Ninguno
P216	3	3	15	21
P217	3	3	19	Ninguno
P219	2	2	Ninguno	Ninguno
P220	2	2	Ninguno	Ninguno
P221	0	0,5	Ninguno	Ninguno
P222	0	1	6	12
P223	0	0,5	Ninguno	Ninguno
P224	3	2,5	24	53
P225	0	1	Ninguno	Ninguno
P226	1,5	2	5	9
P227	0,5	1,5	Ninguno	Ninguno
P228	1	2,5	Ninguno	Ninguno
P230	1,5	1,5	Ninguno	Ninguno
P231	1	2	Ninguno	Ninguno
P232	0	0,5	Ninguno	Ninguno

5 Tal y como se ilustra en la Fig. 9, la tinción del clon 3C6 (sea negativa o positiva) no tiene correlación alguna con la supervivencia total del paciente con NSCLC, mientras que el clon 5B7 describe claramente dos poblaciones. En particular, la tinción de 5B7 positiva (puntuación=1 o mayor) identificó a los pacientes con NSCLC (n=80) que presentaban malas expectativas de supervivencia y la tinción de 5B7 negativa (puntuación <1) identificó a los pacientes con NSCLC (n=20) con una supervivencia mayor. Por ejemplo, tal y como se muestra en la Fig. 9B, aproximadamente el 82% de los pacientes cuya muestra de biopsia obtuvo una tinción negativa para el clon 5B7 registraron una supervivencia de 8,3 años después del diagnóstico. En comparación, aproximadamente el 65% de los pacientes cuya muestra de biopsia obtuvo una tinción positiva para el clon 10 5B7 habían sobrevivido hasta ese mismo punto temporal.

Tal y como se ilustra en la Fig. 10, la tinción del clon 3C6 (sea negativa o positiva) no tiene correlación alguna con la supervivencia libre de enfermedad (DFS) del paciente con NSCLC, mientras que el clon 5B7 describe claramente dos poblaciones. En particular, la tinción de 5B7 positiva (puntuación=1 o mayor) identificó a los pacientes con NSCLC (n=80) que presentaban malas expectativas de DFS y la tinción de 5B7 negativa (puntuación <1) identificó a los pacientes con NSCLC (n=20) con una DFS mayor. Por ejemplo, tal y como se muestra en la Fig. 10B, aproximadamente el 75% de los pacientes cuya muestra de biopsia obtuvo una tinción negativa para el clon 5B7 registraron una supervivencia de 6 años después del diagnóstico. En comparación, aproximadamente el 62% de los pacientes cuya muestra de biopsia obtuvo una tinción positiva para el clon 5B7 habían sobrevivido hasta ese mismo punto temporal. Las curvas de 5B7-positiva y 5B7-negativa convergen aproximadamente 90 meses después del diagnóstico, muy probablemente debido a un efecto estadístico producido por un descenso del número de muestras 5B7-negativas en esos puntos temporales (y con posterioridad a esa fecha). Se espera que los pacientes con cáncer NSCLC y 5B7-negativo continúen teniendo un mejor pronóstico a los 90 meses y con posterioridad a esta fecha cuando se examine incluso una cohorte de pacientes más amplia.

Este Ejemplo demuestra que las moléculas de unión al RD del EGFR, como el clon 5B7, predicen el pronóstico (por ejemplo, la supervivencia total y/o la supervivencia libre de enfermedad) de los pacientes con NSCLC (por ejemplo, pacientes con NSCLC en fase temprana) con independencia del tratamiento

**Ejemplo 13**

**LAS MOLÉCULAS DE UNIÓN AL RD DEL EGFR, COMO EL CLON 5B7, SON INDICADORAS DEL PRONÓSTICO DEL CÁNCER COLORRECTAL**

Este Ejemplo demuestra que una molécula de unión al RD divulgada (por ejemplo, el clon 5B7) predice el pronóstico de los pacientes con cáncer colorrectal.

Se obtienen matrices de tejido que contienen muestras de biopsia de al menos 100 pacientes con cáncer colorrectal. Preferiblemente ninguno de los pacientes deberá haber sido tratado con una terapia basada en el EGFR (por ejemplo, ERBITUX™, VECTIBIX™, IRESSA™, o TARCEVA™). Cada paciente se somete a un seguimiento durante un periodo máximo de 5 años tras el diagnóstico. Cada muestra de biopsia es fijada con NBF al 10% y embebida en parafina. Se cortan secciones de cinco (5) micrones de cada muestra de biopsia y se disponen en una matriz sobre portaobjetos de vidrio de carga positiva. Los portaobjetos se tiñen con una molécula de unión a RD (por ejemplo, el clon 5B7) y una molécula de unión a ED (por ejemplo, el clon 3C6) conforme a los protocolos del Ejemplo 2.

Los portaobjetos con las matrices teñidas resultantes reciben una puntuación bajo la luz del microscopio por parte de un patólogo, en función de los criterios siguientes:

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de tinción	Observación al microscopio
Positivo: Cualquier tinción IHC de las membranas de las células tumorales por encima del nivel de referencia, sea una tinción circunferencial completa o incompleta, en más del 0% de las células tumorales.	3+	Reactividad fuerte: Una tinción de color marrón oscuro a negro es habitual, aunque no se da siempre, en un patrón de membrana completa, lo que produce un perfilado grueso de la célula. La reactividad citoplasmática puede no producirse o ser moderadamente intensa cuando la tinción de la membrana es muy intensa. Puede observarse una acentuación citoplasmática submembranosa.
	2,5	Reactividad intensa: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) media. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	2+	Reactividad moderada: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) intermedia. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más

		débil que la reactividad de la membrana.
	1,5	Reactividad ligera: Tinción de intensidad intermedia que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
	1 +	Reactividad débil: Reactividad de color marrón apagado o claro que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
Negativo: Ausencia de tinción de la membrana superior a la referencia en todas las células tumorales. Presencia de tinción citoplasmática en ausencia de tinción de la membrana.	0,5	Trazos de reactividad: Trazos de reactividad de color marrón donde la localización membranosa y citoplasmática es indeterminada.
	0	Ausencia de reactividad

5 La puntuación de cada caso se registra en una base de datos en la que se compara la puntuación de cada una de las moléculas de unión (p. ej., 5B7 o 3C6). El resultado de cada caso se asigna a una de las cuatro categorías que se describen en la Tabla 2. Se espera que aproximadamente el 65% de los casos correspondan a la categoría 1, el 19% a la categoría 2, menos del 1% a la categoría 3 y el 15% a la categoría 4. El resultado del paciente está directamente relacionado con la categoría de puntuación que se indica en la Fig. 3 y en la Tabla 2. Los pacientes de las categorías 1 y 3 tendrán un mal pronóstico y los pacientes de las categorías 2 y 4 tendrán un pronóstico mejor.

**Ejemplo 14**

10 **LAS MOLÉCULAS DE UNIÓN AL RD DEL EGFR, COMO EL CLON 5B7, SON INDICADORAS DEL PRONÓSTICO EN EL CÁNCER DE CUELLO Y CABEZA.**

Este Ejemplo demuestra que una molécula de unión al RD divulgado (por ejemplo, el clon 5B7) predice el pronóstico de los pacientes con cáncer de cuello y cabeza.

15 Se obtuvieron matrices de tejido que contenían muestras de biopsias de al menos 100 pacientes con cáncer de cuello y cabeza. Preferiblemente ninguno de los pacientes debería haber sido tratado con una terapia basada en el EGFR (por ejemplo, ERBITUX™, VECTIBIX™, IRESSA™, o TARCEVA™). Cada paciente se somete a un seguimiento durante un periodo máximo de 5 años tras el diagnóstico. Cada muestra de biopsia es fijada con NBF al 10% y embebida en parafina. Se cortan secciones de cinco (5) micrones de cada muestra de biopsia y se disponen en una matriz sobre portaobjetos de vidrio de carga positiva. Los portaobjetos se tiñen  
20 con una molécula de unión a RD (por ejemplo, el clon 5B7) y una molécula de unión a ED (por ejemplo, el clon 3C6) conforme a los protocolos del Ejemplo 2. Los portaobjetos con las matrices teñidas resultantes reciben una puntuación bajo la luz del microscopio por parte de un patólogo, en función de los criterios siguientes:

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de tinción	Observación al microscopio
	3+	Reactividad fuerte: Una tinción de color marrón oscuro a negro es habitual, aunque no se da siempre, en un patrón de membrana completa, lo que produce un perfilado grueso de la célula. La reactividad citoplasmática puede no producirse o ser moderadamente intensa cuando la tinción de la membrana es muy intensa. Puede observarse una acentuación citoplasmática submembranosa.

<p>Positivo: Cualquier tinción IHC de las membranas de las células tumorales por encima del nivel de referencia, sea una tinción circunferencial completa o incompleta, en más del 0% de las células tumorales.</p>	2,5	<p>Reactividad intensa: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) media. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.</p>
	2+	<p>Reactividad moderada: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) intermedia. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.</p>
	1,5	<p>Reactividad ligera: Tinción de intensidad intermedia que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.</p>
	1 +	<p>Reactividad débil: Reactividad de color marrón apagado o claro que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.</p>
<p>Negativo: Ausencia de tinción de la membrana superior a la referencia en todas las células tumorales. Presencia de tinción citoplasmática en ausencia de tinción de la membrana.</p>	0,5	<p>Trazos de reactividad: Trazos de reactividad de color marrón donde la localización membranosa y citoplasmática es indeterminada.</p>
	0	<p>Ausencia de reactividad</p>

5 La puntuación de cada caso se registra en una base de datos en la que se compara la puntuación de cada una de las moléculas de unión (p. ej., 5B7 o 3C6). El resultado de cada caso se asigna a una de las cuatro categorías que se describen en la Tabla 2. Se espera que aproximadamente el 65% de los casos correspondan a la categoría 1, el 19% a la categoría 2, menos del 1% a la categoría 3 y el 15% a la categoría 4. El resultado del paciente está directamente relacionado con la categoría de puntuación que se indica en la Fig. 3 y en la Tabla 2. Los pacientes de las categorías 1 y 3 tendrán un mal pronóstico y los pacientes de las categorías 2 y 4 tendrán un pronóstico mejor.

**Ejemplo 15**

10 **LAS MOLÉCULAS DE UNIÓN AL RD, COMO EL CLON 5B7, SON INDICADORAS DEL PRONÓSTICO DEL CÁNCER GÁSTRICO**

Este Ejemplo demuestra que una molécula de unión al RD divulgada (por ejemplo, el clon 5B7) predice el pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico.

15 Se obtienen matrices de tejido que contienen muestras de biopsia de al menos 100 pacientes con cáncer gástrico. Preferiblemente ninguno de los pacientes deberá haber sido tratado con una terapia basada en el EGFR (por ejemplo, ERBITUX™, VECTIBIX™, IRESSA™, o TARCEVA™). Cada paciente se somete a un seguimiento durante un periodo máximo de 5 años tras el diagnóstico. Cada muestra de biopsia es fijada en NBF al 10% y embebida en parafina. Se cortan secciones de cinco (5) micrones de cada muestra de biopsia y se disponen en una matriz sobre portaobjetos de vidrio de carga positiva. Los portaobjetos se tiñen con una  
 20 molécula de unión a RD (por ejemplo, el clon 5B7) y una molécula de unión a ED (por ejemplo, el clon 3C6)

conforme a los protocolos del Ejemplo 2. Los portaobjetos con las matrices teñidas resultantes reciben una puntuación bajo la luz del microscopio por parte de un patólogo, en función de los criterios siguientes:

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de tinción	Observación al microscopio
Positivo: Cualquier tinción IHC de las membranas de las células tumorales por encima del nivel de referencia, sea una tinción circunferencial completa o incompleta, en más del 0% de las células tumorales.	3+	Reactividad fuerte: Una tinción de color marrón oscuro a negro es habitual, aunque no se da siempre, en un patrón de membrana completa, lo que produce un perfilado grueso de la célula. La reactividad citoplasmática puede no producirse o ser moderadamente intensa cuando la tinción de la membrana es muy intensa. Puede observarse una acentuación citoplasmática submembranosa.
	2,5	Reactividad intensa: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) media. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	2+	Reactividad moderada: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) intermedia. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	1,5	Reactividad ligera: Tinción de intensidad intermedia que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
	1 +	Reactividad débil: Reactividad de color marrón apagado o claro que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
Negativo: Ausencia de tinción de la membrana superior a la referencia en todas las células tumorales. Presencia de tinción citoplasmática en ausencia de tinción de la membrana.	0,5	Trazos de reactividad: Trazos de reactividad de color marrón donde la localización membranosa y citoplasmática es indeterminada.
	0	Ausencia de reactividad

5 La puntuación de cada caso se registra en una base de datos en la que se compara la puntuación de cada una de las moléculas de unión (p. ej., 5B7 o 3C6). El resultado de cada caso se asigna a una de las cuatro categorías que se describen en la Tabla 2. Se espera que aproximadamente el 65% de los casos correspondan a la categoría 1, el 19% a la categoría 2, menos del 1% a la categoría 3 y el 15% a la categoría 4. El resultado del paciente está directamente relacionado con la categoría de puntuación que se indica en la Fig. 3 y en la Tabla 2. Los pacientes de las categorías 1 y 3 tendrán un mal pronóstico y los pacientes de las categorías 2 y 4 tendrán un pronóstico mejor.

10

**Ejemplo 16**

**LAS MOLÉCULAS DE UNIÓN AL RD DEL EGFR, COMO EL CLON 5B7, SON INDICADORAS DEL PRONÓSTICO DEL CÁNCER EN EL GLIOBLASTOMA**

5 Este Ejemplo demuestra que una molécula de unión al RD divulgada (por ejemplo, el clon 5B7) predice el pronóstico de los pacientes con glioblastoma.

10 Se obtienen matrices de tejido que contienen las muestras de biopsia de al menos 100 pacientes con glioblastoma. Preferiblemente ninguno de los pacientes deberá haber sido tratado con una terapia basada en el EGFR (por ejemplo, ERBITUX™, VECTIBIX™, IRESSA™, o TARCEVA™). Cada paciente se somete a un seguimiento durante un periodo máximo de 5 años tras el diagnóstico. Cada muestra de biopsia es fijada con NBF al 10% y embebida en parafina. Se cortan secciones de cinco (5) micrones de cada muestra de biopsia y se disponen en una matriz sobre portaobjetos de vidrio de carga positiva. Los portaobjetos se tiñen con una molécula de unión a RD (por ejemplo, el clon 5B7) y una molécula de unión a ED (por ejemplo, el clon 3C6) conforme a los protocolos del Ejemplo 2. Los portaobjetos con las matrices teñidas resultantes reciben una puntuación bajo la luz del microscopio por parte de un patólogo, en función de los criterios siguientes:

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de tinción	Observación al microscopio
Positivo: Cualquier tinción IHC de las membranas de las células tumorales por encima del nivel de referencia, sea una tinción circunferencial completa o incompleta, en más del 0% de las células tumorales.	3+	Reactividad fuerte: Una tinción de color marrón oscuro a negro es habitual, aunque no se da siempre, en un patrón de membrana completa, lo que produce un perfilado grueso de la célula. La reactividad citoplasmática puede no producirse o ser moderadamente intensa cuando la tinción de la membrana es muy intensa. Puede observarse una acentuación citoplasmática submembranosa.
	2,5	Reactividad intensa: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) media. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	2+	Reactividad moderada: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) intermedia. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	1,5	Reactividad ligera: Tinción de intensidad intermedia que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
	1 +	Reactividad débil: Reactividad de color marrón apagado o claro que Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.

15

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de tinción	Observación al microscopio
Negativo: Ausencia de tinción de la membrana superior a la referencia en todas las células tumorales. Presencia de tinción citoplasmática en ausencia de tinción de la membrana.	0,5	Trazos de reactividad: Trazos de reactividad de color marrón donde la localización membranosa y citoplasmática es indeterminada.
	0	Ausencia de reactividad

La puntuación de cada caso se registra en una base de datos que compara la puntuación de cada molécula de unión (p. ej., 5B7 y 3C6). Los resultados de cada caso se atribuirán a una de las cuatro categorías descritas en la Tabla 2. Se espera que aproximadamente el 65% de los casos correspondan a la categoría 1, el 19% a la categoría 2, menos del 1% a la categoría 3 y el 15% a la categoría 4. El resultado del paciente estará directamente relacionado con la categoría de puntuación indicada en la Fig. 3 y en la Tabla 2. Los pacientes de las categorías 1 y 3 tendrán un mal pronóstico, mientras que los pacientes de las categorías 2 y 4 tendrán un pronóstico mejor.

#### Ejemplo 17

#### 10 LAS MOLÉCULAS DE UNIÓN AL RD DEL EGFR, COMO EL CLON 5B7, SON INDICADORAS DEL PRONÓSTICO DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR

Este ejemplo demuestra que una molécula de unión al RD divulgada (por ejemplo, el clon 5B7) predice el pronóstico de los pacientes con cáncer HCC (como un HCC reseccable).

15 Se obtienen las matrices de tejido que contienen muestras de biopsia de al menos 100 pacientes con cáncer HCC (véase, por ejemplo, el brazo de control de las muestras recogidas en «A Pilot Study of Adjuvant Therapy of Gefitinib (Iressa, ZD 1839) in Patients with Resectable Hepatocellular Carcinoma», ClinicalTrials.gov Identificador nº NCT00228501). Preferiblemente ninguno de los pacientes deberá haber sido tratado con una terapia basada en el EGFR (por ejemplo, ERBITUX™, VECTIBIX™, IRESSA™, o TARCEVA™). Cada paciente se somete a un seguimiento durante un periodo máximo de 5 años tras el diagnóstico. Cada una de las muestras es fijada en un fijador estándar (por ejemplo, NBF al 10%) y embebida en parafina. Las secciones de cada muestra de biopsia (por ejemplo, con un grosor de 5 µm) se cortan y se disponen en matrices sobre portaobjetos de vidrio de carga positiva. Los portaobjetos se tiñen con una molécula de unión a RD (por ejemplo, el clon 5B7) y una molécula de unión a ED (por ejemplo, el clon 3C6) conforme a los protocolos del Ejemplo 2. Los portaobjetos con las matrices teñidas resultantes reciben una puntuación bajo la luz del microscopio por parte de un patólogo, en función de los criterios siguientes:

Resultado del informe	Puntuación de la intensidad de tinción	Observación al microscopio
Positivo: Cualquier tinción IHC de las membranas de las células tumorales	3+	Reactividad fuerte: Una tinción de color marrón oscuro a negro es habitual, aunque no se da siempre, en un patrón de membrana completa, lo que produce un perfilado grueso de la célula. La reactividad citoplasmática puede no producirse o ser moderadamente intensa cuando la tinción de la membrana es muy intensa. Puede observarse una acentuación citoplasmática submembranosa.
	2,5	Reactividad intensa: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) media. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.

por encima del nivel de referencia, sea una tinción circunferencial completa o incompleta, en más del 0% de las células tumorales.	2+	Reactividad moderada: Tinción en tonos marrón de una oscuridad (intensidad) intermedia. La reactividad membranosa es habitualmente completa, aunque no siempre, lo que produce un perfil circular de la célula neoplásica. La reactividad de la membrana incompleta de una intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática tiene una intensidad más débil que la reactividad de la membrana.
	1,5	Reactividad ligera: Tinción de intensidad intermedia que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
	1 +	Reactividad débil: Reactividad de color marrón apagado o claro que es membranosa. Se puede observar una reactividad citoplasmática que es uniforme y afecta a la totalidad del citoplasma, aunque no se deberá evaluar a efectos de la positividad.
Negativo: Ausencia de tinción de la membrana superior a la referencia en todas las células tumorales. Presencia de tinción citoplasmática en ausencia de tinción de la membrana.	0,5	Trazos de reactividad: Trazos de reactividad de color marrón donde la localización membranosa y citoplasmática es indeterminada.
	0	Ausencia de reactividad

5 La puntuación de cada caso se registra en una base de datos en la que se compara la puntuación de cada una de las moléculas de unión (p. ej., 5B7 o 3C6). El resultado de cada caso se asigna a una de las cuatro categorías que se describen en la Tabla 2. Se espera que aproximadamente el 60% de los casos correspondan a la categoría 1, el 13% a la categoría 2, el 5% a la categoría 3 y el 22% a la categoría 4. El resultado del paciente está directamente relacionado con la categoría de puntuación que se indica en la Fig. 3 y en la Tabla 2. Los pacientes de las categorías 1 y 3 tendrán un mal pronóstico y los pacientes de las categorías 2 y 4 tendrán un pronóstico mejor.

10 A pesar de que la presente divulgación se ha descrito haciendo especial hincapié en determinadas realizaciones, para los expertos en la técnica resultará obvio que se pueden utilizar variaciones de determinadas realizaciones y está previsto que la divulgación se pueda practicar de forma distinta a la descrita específicamente en el presente. Por consiguiente, esta divulgación incluye todas las modificaciones incluidas en el ámbito de aplicación de la divulgación, que se define mediante las reivindicaciones siguientes:

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Ventana Medical Systems, Inc.  
Powell, William C
- 5 Willoughby Kivi, Linda  
Roche, Patrick C  
Gooch, Gary  
Gaire, Fabien
- 10 <120> MOLÉCULAS DE UNIÓN AL ANTÍGENO DEL EGFR Y SUS USOS
- <130> 7668-78975-03
- <150> US 60/949 792
- 15 <151> 2007-07-13
- <150> US 60/988 196  
<151> 15/11/2007
- 20 <160> 6
- <170> Versión de la patente 3.5
- <210> 1
- 25 <211> 1210  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens
- <400> 1
- 30

ES 2 535 319 T3

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln  
 20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe  
 35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn  
 50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys  
 65 70 75 80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val  
 85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr  
 100 105 110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn  
 115 120 125

ES 2 535 319 T3

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu  
130 135 140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu  
145 150 155 160

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met  
165 170 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro  
180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln  
195 200 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg  
210 215 220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys  
225 230 235 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp  
245 250 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro  
260 265 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly  
275 280 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His  
290 295 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu  
305 310 315 320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val  
325 330 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn  
340 345 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp  
355 360 365

ES 2 535 319 T3

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr  
 370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu  
 385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp  
 405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln  
 420 425 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu  
 435 440 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser  
 450 455 460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu  
 465 470 475 480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu  
 485 490 495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro  
 500 505 510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn  
 515 520 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly  
 530 535 540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro  
 545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro  
 565 570 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val  
 580 585 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp  
 595 600 605

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys

ES 2 535 319 T3

610						615										620
Thr 625	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly 630	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly 635	Cys	Pro	Thr	Asn	Gly 640	
Pro	Lys	Ile	Pro	Ser 645	Ile	Ala	Thr	Gly	Met 650	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu 655	
Leu	Leu	Val	Val 660	Ala	Leu	Gly	Ile	Gly 665	Leu	Phe	Met	Arg	Arg 670	Arg	His	
Ile	Val	Arg 675	Lys	Arg	Thr	Leu	Arg 680	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu 685	Arg	Glu	Leu	
Val	Glu 690	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser 695	Gly	Glu	Ala	Pro	Asn 700	Gln	Ala	Leu	Leu	
Arg 705	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr 710	Glu	Phe	Lys	Lys	Ile 715	Lys	Val	Leu	Gly	Ser 720	
Gly	Ala	Phe	Gly	Thr 725	Val	Tyr	Lys	Gly	Leu 730	Trp	Ile	Pro	Glu	Gly 735	Glu	
Lys	Val	Lys	Ile 740	Pro	Val	Ala	Ile	Lys 745	Glu	Leu	Arg	Glu	Ala 750	Thr	Ser	
Pro	Lys	Ala 755	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu 760	Asp	Glu	Ala	Tyr	Val 765	Met	Ala	Ser	
Val 770	Asp	Asn	Pro	His	Val	Cys 775	Arg	Leu	Leu	Gly	Ile 780	Cys	Leu	Thr	Ser	
Thr 785	Val	Gln	Leu	Ile	Thr 790	Gln	Leu	Met	Pro	Phe 795	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp 800	
Tyr	Val	Arg	Glu	His 805	Lys	Asp	Asn	Ile	Gly 810	Ser	Gln	Tyr	Leu	Leu	Asn 815	
Trp	Cys	Val	Gln 820	Ile	Ala	Lys	Gly	Met 825	Asn	Tyr	Leu	Glu	Asp 830	Arg	Arg	
Leu	Val	His 835	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala 840	Arg	Asn	Val	Leu	Val 845	Lys	Thr	Pro	
Gln 850	His	Val	Lys	Ile	Thr	Asp 855	Phe	Gly	Leu	Ala	Lys 860	Leu	Leu	Gly	Ala	

ES 2 535 319 T3

Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp  
 865 870 875 880

Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp  
 885 890 895

Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser  
 900 905 910

Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu  
 915 920 925

Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr  
 930 935 940

Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys  
 945 950 955 960

Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln  
 965 970 975

Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro  
 980 985 990

Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp  
 995 1000 1005

Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe  
 1010 1015 1020

Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu  
 1025 1030 1035

Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn  
 1040 1045 1050

Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg  
 1055 1060 1065

Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp  
 1070 1075 1080

Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro  
 1085 1090 1095

ES 2 535 319 T3

Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln  
 1100 1105 1110

Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro  
 1115 1120 1125

His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln  
 1130 1135 1140

Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala  
 1145 1150 1155

Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln  
 1160 1165 1170

Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys  
 1175 1180 1185

Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln  
 1190 1195 1200

Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala  
 1205 1210

<210> 2

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys  
 1 5 10 15

10 Pro Asn Gly

<210> 3

<211> 225

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 535 319 T3

Met Val Thr His Ser Lys Phe Pro Ala Ala Gly Met Ser Arg Pro Leu  
1 5 10 15

Asp Thr Ser Leu Arg Leu Lys Thr Phe Ser Ser Lys Ser Glu Tyr Gln  
20 25 30

ES 2 535 319 T3

Leu Val Val Asn Ala Val Arg Lys Leu Gln Glu Ser Gly Phe Tyr Trp  
 35 40 45

Ser Ala Val Thr Gly Gly Glu Ala Asn Leu Leu Leu Ser Ala Glu Pro  
 50 55 60

Ala Gly Thr Phe Leu Ile Arg Asp Ser Ser Asp Gln Arg His Phe Phe  
 65 70 75 80

Thr Leu Ser Val Lys Thr Gln Ser Gly Thr Lys Asn Leu Arg Ile Gln  
 85 90 95

Cys Glu Gly Gly Ser Phe Ser Leu Gln Ser Asp Pro Arg Ser Thr Gln  
 100 105 110

Pro Val Pro Arg Phe Asp Cys Val Leu Lys Leu Val His His Tyr Met  
 115 120 125

Pro Pro Pro Gly Ala Pro Ser Phe Pro Ser Pro Pro Thr Glu Pro Ser  
 130 135 140

Ser Glu Val Pro Glu Gln Pro Ser Ala Gln Pro Leu Pro Gly Ser Pro  
 145 150 155 160

Pro Arg Arg Ala Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gly Gly Glu Lys Ile Pro Leu  
 165 170 175

Val Leu Ser Arg Pro Leu Ser Ser Asn Val Ala Thr Leu Gln His Leu  
 180 185 190

Cys Arg Lys Thr Val Asn Gly His Leu Asp Ser Tyr Glu Lys Val Thr  
 195 200 205

Gln Leu Pro Gly Pro Ile Arg Glu Phe Leu Asp Gln Tyr Asp Ala Pro  
 210 215 220

Leu  
 225

<210> 4

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Motivo de acoplamiento al péptido de SH2.  
<220>  
5 <221> misc\_feature  
<222> (2) .. (3)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido naturalmente presente

<220>  
10 <221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa puede ser cualquier Leu o Val

<400> 4  
15  
Tyr Xaa Xaa Xaa  
1

<210> 5  
<211> 4  
20 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Motivo de acoplamiento al péptido de SH2.  
25

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2) .. (3)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido naturalmente presente  
30

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa puede ser cualquier Pro o Asp  
35

<400> 5  
Tyr Xaa Xaa Xaa  
1

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Secuencia de consenso del péptido del dominio regulador

<220>

10 <221> misc\_feature

<222> (1) .. (6)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido naturalmente presente

<220>

15 <221> misc\_feature

<222> (14)..(19)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido naturalmente presente

20

<400> 6

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Xaa Xaa Xaa  
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa

25

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende una molécula de unión al dominio regulador (RD) del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), cuya unión al EGFR es inhibida competitivamente mediante un péptido aislado que se compone de los residuos de aminoácidos 1167-1185 de la SEC. ID. N° 1 o un fragmento inmunogénico de dicho péptido, donde la molécula de unión a RD es un anticuerpo, que se une específicamente a los residuos 1167-1185 de la SEC. ID. N° 1.
2. Una composición conforme a la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente a un péptido que se compone de los residuos de aminoácidos 1167-1185 de la SEC. ID. N° 1 o un fragmento inmunogénico de dicho péptido.
- 10 3. Una composición conforme a la reivindicación 2, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
4. Una composición conforme a la reivindicación 3, donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal de conejo.
- 15 5. Un método no terapéutico de producir un anticuerpo específico para el EGFR que se une específicamente a los residuos 1167-1185 de la SEC. ID. N° 1, que consiste en la inmunización de un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende una proteína portadora y un péptido que se compone de los residuos de aminoácidos 1167-1185 de la SEC. ID. N° 1 o un fragmento inmunogénico de dicho péptido.
6. Un método conforme a la reivindicación 5 que comprende también el aislamiento del suero del mamífero no humano y el aislamiento del anticuerpo policlonal específico para el inmunógeno.
- 20 7. Un método conforme a la reivindicación 5 que comprende también la fusión de las células del bazo de animales no humanos con un elemento asociado de la célula de fusión para obtener hibridomas que producen anticuerpos.
8. Un método de inmunotinción que consiste en poner en contacto una muestra biológica, que contiene una o más células, con la composición de la reivindicación 1 y detectar la unión específica del anticuerpo de la composición con un antígeno de la célula o células.
9. Un método conforme a la reivindicación 8, donde el antígeno es EGFR.
- 25 10. El método de la reivindicación 8 o 9, donde la muestra biológica se monta sobre el portaobjetos de un microscopio.
11. Un método conforme a la reivindicación 10, donde la muestra biológica es una sección de tejido, particularmente donde la muestra de tejido es un tejido neoplásico.
- 30 12. Un método conforme a la reivindicación 11, donde el tejido neoplásico es un cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico o glioblastoma.
13. Un método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, donde la sección de tejido está fijada con formalina y embebida en parafina.
14. Un método conforme a la reivindicación 8, para predecir la respuesta de una neoplasia, que se caracteriza por la expresión del EGFR, a un inhibidor del EGFR. Este método consiste en:
  - 35 detectar en una muestra biológica, que comprende una o más células neoplásicas, la unión específica del anticuerpo de la composición de la reivindicación 1 a una o más de las células neoplásicas;
  - donde la unión específica del anticuerpo a una o más de las células neoplásicas indica que las células neoplásicas responderán a un inhibidor del EGFR.
- 40 15. Un método conforme a la reivindicación 14, donde la respuesta de la célula neoplásica es una ralentización del crecimiento.
16. Un método conforme a la reivindicación 15, donde el crecimiento ralentizado es un crecimiento cero neto o un crecimiento negativo neto, o donde el crecimiento ralentizado es al menos un 10% inferior al crecimiento de las células neoplásicas previo al tratamiento con el inhibidor del EGFR.
- 45 17. Un método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde la respuesta de la célula neoplásica es la apoptosis.
18. Un método conforme a la reivindicación 17, donde al menos el 10% de las células neoplásicas es objeto de apoptosis.
19. Un método conforme a la reivindicación 8 para predecir si un candidato para el tratamiento con un inhibidor del EGFR es probable que responda a este tratamiento. Este método consiste en:
  - 50 detectar en una muestra biológica de un candidato para el tratamiento con un inhibidor del EGFR, cuya muestra biológica comprende una o más células neoplásicas, la unión específica del anticuerpo de la composición de la reivindicación 1 a una o más de las células neoplásicas;

donde la unión específica del anticuerpo a una o más de las células neoplásicas indica que es probable que el candidato responda al tratamiento con un inhibidor del EGFR.

5 20. Un método conforme a la reivindicación 19, donde la unión específica del anticuerpo al menos a un 10% de las células neoplásicas de la muestra biológica indica que es probable que el candidato responda al tratamiento con un inhibidor del EGFR.

21. Un método conforme a la reivindicación 8 para predecir la respuesta de una neoplasia, que se caracteriza por la expresión del EGFR, a un inhibidor del EGFR, que consiste en:

10 detectar en una muestra biológica que comprende una o más células neoplásicas EGFR positivas la ausencia de una unión específica del anticuerpo de la composición de la reivindicación 1 con una o más de las células neoplásicas EGFR positivas;

donde la ausencia de una unión específica del anticuerpo a las células neoplásicas EGFR positivas indica que las células neoplásicas no presentarán una respuesta sustancial a un inhibidor del EGFR.

22. Un método conforme a la reivindicación 21, que comprende asimismo la detección en la muestra biológica de la unión específica de un segundo anticuerpo específico para el dominio externo del EGFR.

15 23. Un método conforme a la reivindicación 21, que comprende asimismo la detección en un material biológico de control de la unión específica del anticuerpo al EGFR.

24. El método conforme a la reivindicación 23, donde el material biológico de control es piel normal, testículos normales o amígdalas normales.

20 25. Un método conforme a la reivindicación 8 para predecir el pronóstico de una enfermedad neoplásica, que se caracteriza por la expresión del EGFR, y que consiste en lo siguiente:

detectar en una muestra biológica de un paciente que padece una enfermedad neoplásica la unión específica del anticuerpo de la composición de la reivindicación 1 con una o más células neoplásicas EGFR positivas en la muestra biológica;

25 donde la unión específica del anticuerpo de la célula o células neoplásicas EGFR positivas predice un mal pronóstico de la enfermedad neoplásica del paciente.

26. Un método conforme a la reivindicación 25, donde el anticuerpo se une específicamente al menos a un 10% de las células neoplásicas EGFR positivas de la muestra biológica.

27. Un método conforme a la reivindicación 26, donde el anticuerpo se une específicamente al menos a un 50 % de las células neoplásicas EGFR positivas de la muestra biológica.

30 28. Un método conforme a la reivindicación 25, donde un mal pronóstico es una supervivencia del paciente inferior a cinco años tras el diagnóstico inicial de la enfermedad neoplásica.

29. Un método conforme a la reivindicación 28, donde un mal pronóstico es una supervivencia del paciente inferior a dos años tras el diagnóstico inicial de la enfermedad neoplásica.

35 30. Un método conforme a la reivindicación 8 para predecir el pronóstico de una enfermedad neoplásica, que se caracteriza por la expresión del EGFR, y que consiste en:

detectar en una muestra biológica de un paciente que padece una enfermedad neoplásica la unión específica del anticuerpo de la composición de la reivindicación 1 con una o más células neoplásicas EGFR positivas en la muestra biológica;

40 donde la ausencia de una unión específica del anticuerpo de una o más de las células neoplásicas EGFR positivas predice un buen pronóstico de la enfermedad neoplásica del paciente.

31. Un método conforme a la reivindicación 30, donde un buen pronóstico es una supervivencia del paciente superior a cinco años tras el diagnóstico inicial de la enfermedad neoplásica.

32. Un método conforme a la reivindicación 31, donde un buen pronóstico es una supervivencia del paciente superior a dos años tras el diagnóstico inicial de la enfermedad neoplásica.

45 33. Un método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, donde la enfermedad es cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico o glioblastoma.

34. Un método conforme a la reivindicación 8 para detectar una interacción directa entre el EGFR y una proteína reguladora del EGFR, que consiste en lo siguiente:

50 poner en contacto una muestra biológica, que comprende una o más células EGFR positivas, con la composición de la reivindicación 1 y detectar la unión específica del anticuerpo de la composición a una o más células EGFR positivas, donde la unión específica del anticuerpo a una o más células EGFR positivas detecta que el EGFR no está interactuando con una proteína reguladora del EGFR, donde una interacción entre el EGFR y la proteína reguladora del EGFR enmascara el epitopo del anticuerpo.

donde la proteína reguladora del EGFR es una proteína SOCS.

35. Un método conforme a la reivindicación 8 para detectar una interacción directa entre el EGFR y una proteína reguladora del EGFR, que consiste en lo siguiente:

- 5 poner en contacto una muestra biológica, que comprende una o más células EGFR positivas, con la composición de la reivindicación 1 y detectar la unión específica del anticuerpo de la composición a una o más células EGFR positivas, donde la ausencia de unión específica del anticuerpo a una o más células EGFR positivas detecta que el EGFR está interactuando con una proteína reguladora del EGFR, donde una interacción entre el EGFR y la proteína reguladora del EGFR enmascara el epítipo del anticuerpo.

donde la proteína reguladora del EGFR es una proteína SOCS.

- 10 36. El método de la reivindicación 34 o 35 donde la proteína SOCS es SOCS1 o SOCS3.

FIG. 1

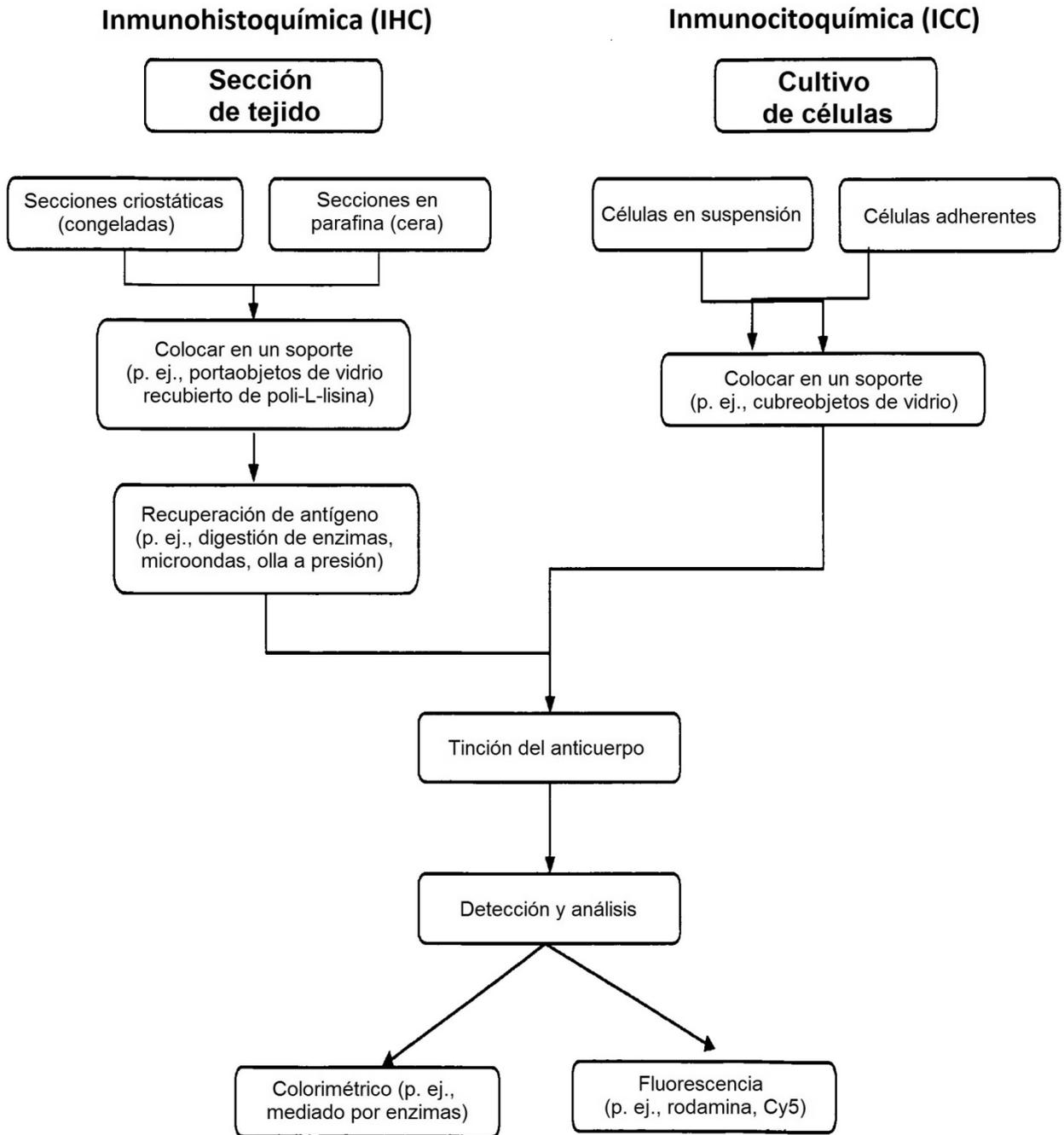
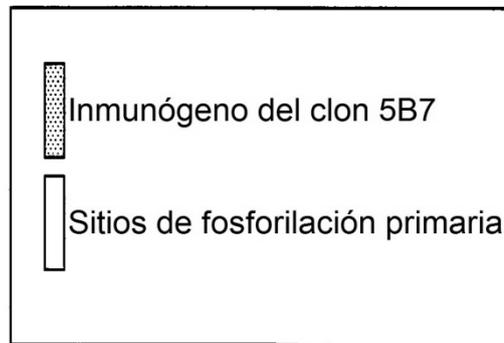
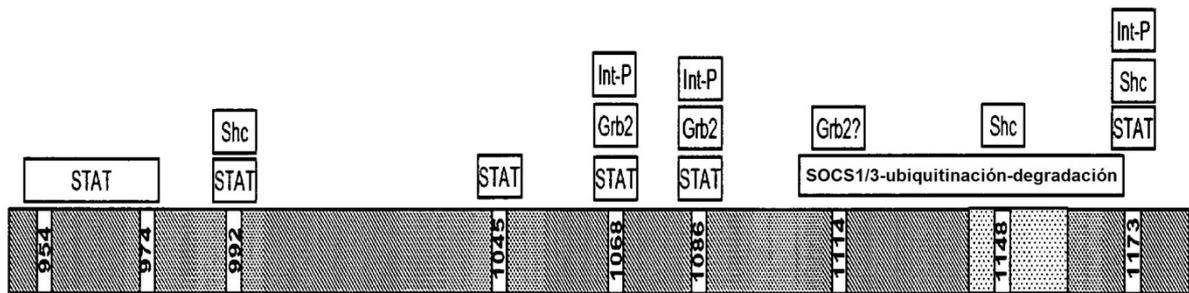


FIG. 2



**FIG. 3**

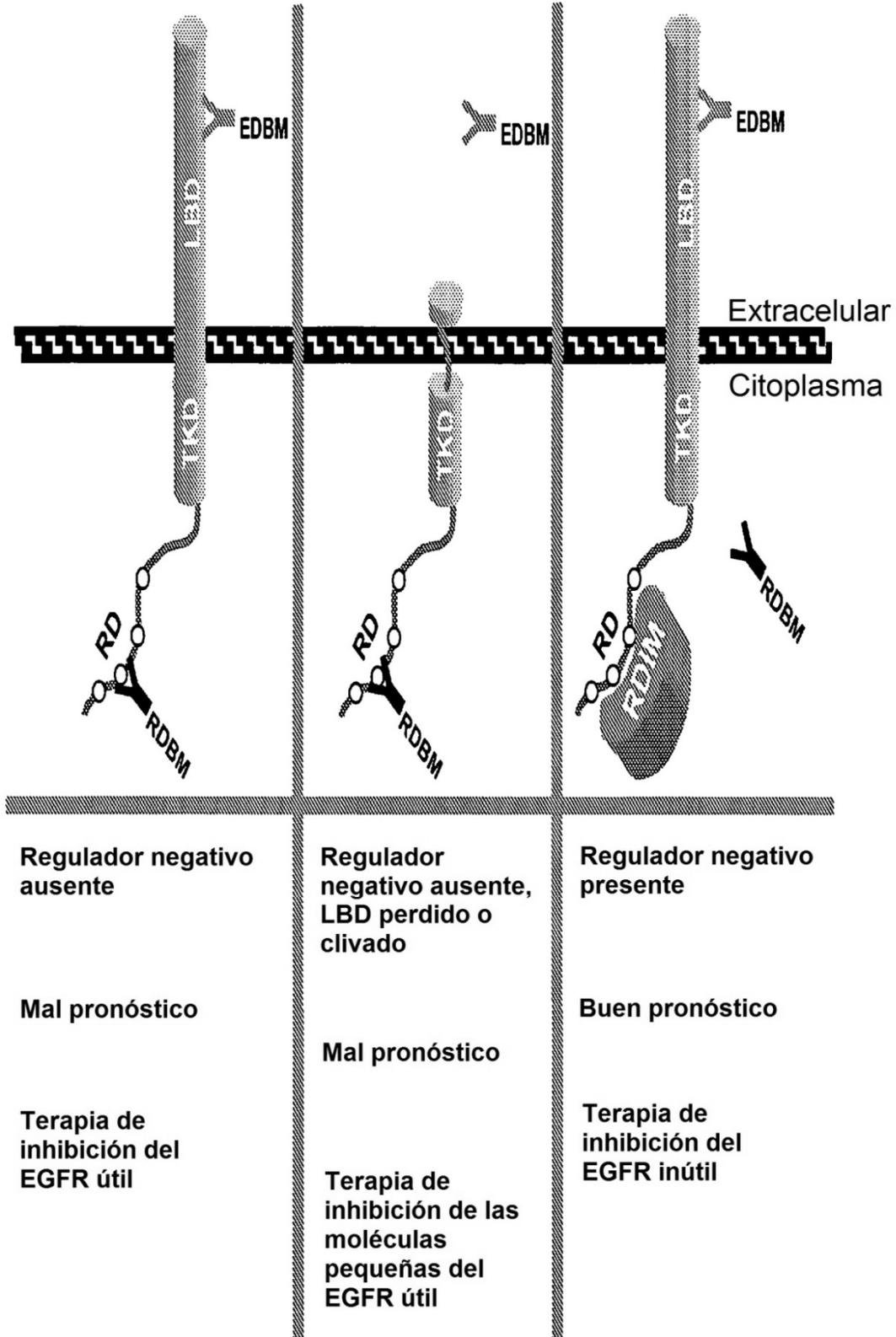
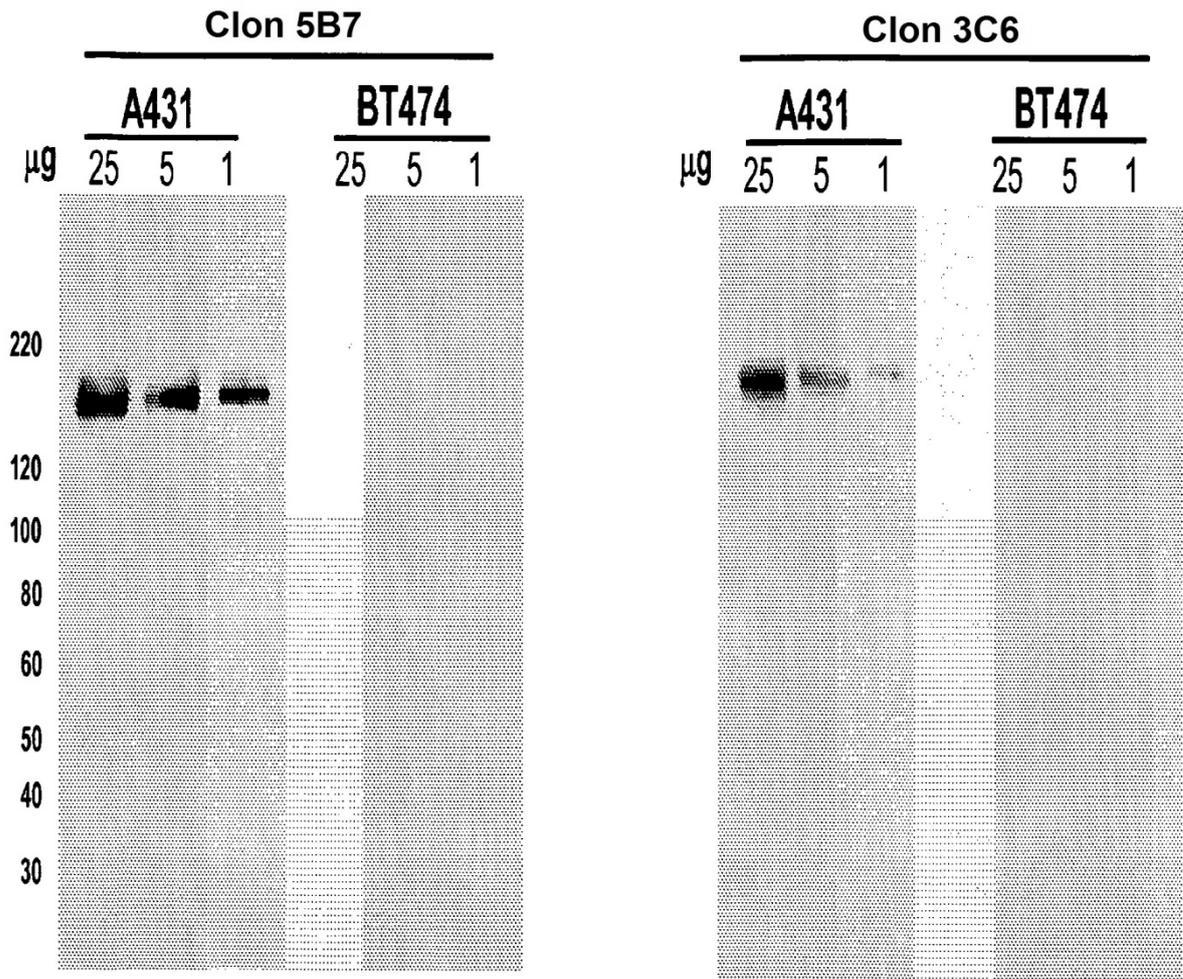


FIG. 4



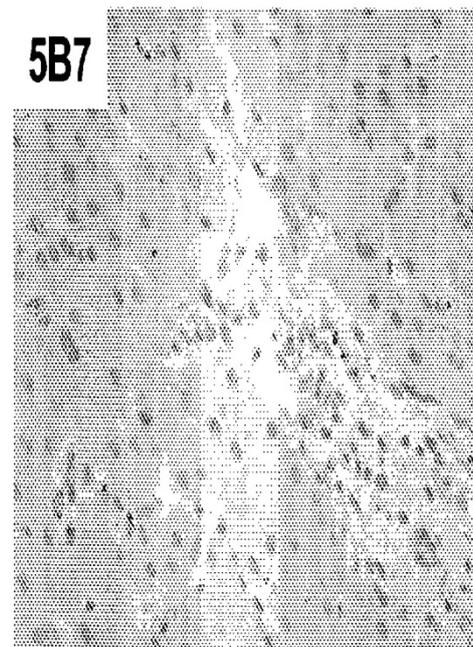
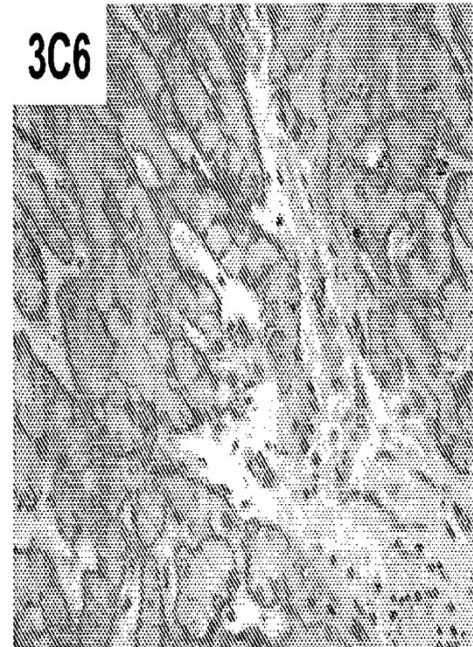
**FIG. 5**

**A**

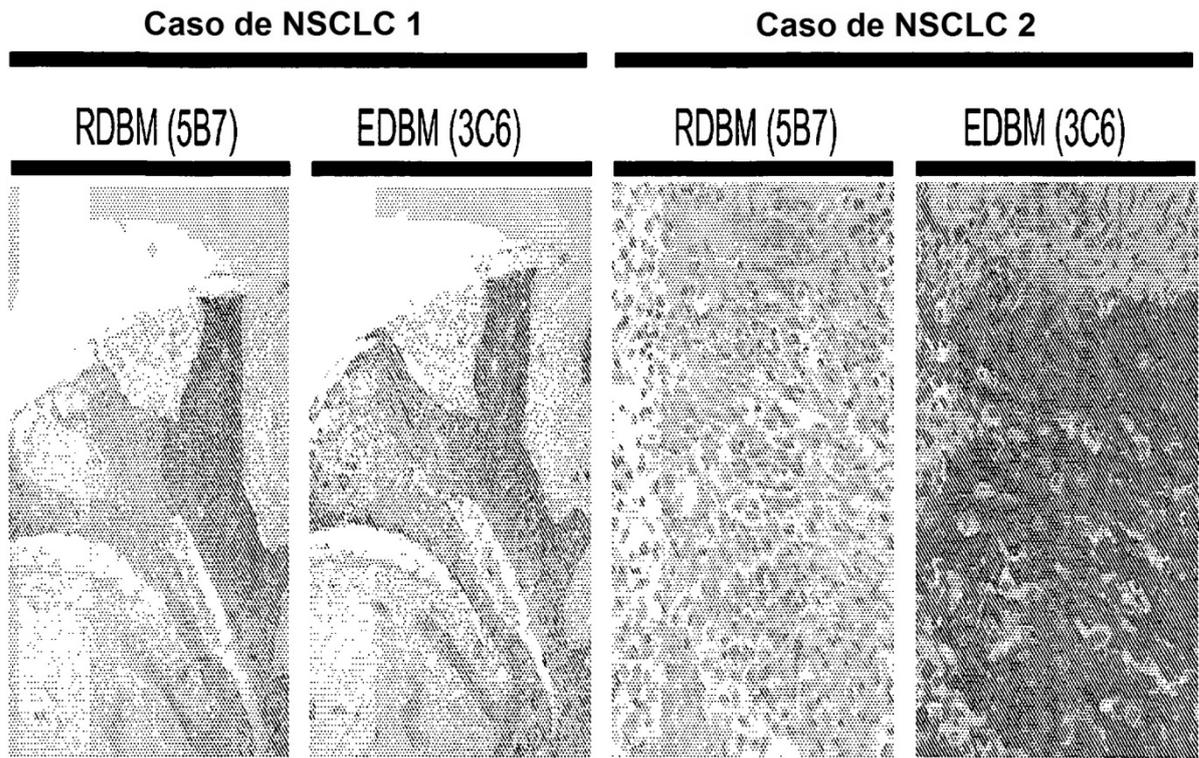
Tejido	3C6	5B7
Piel	Pos	Pos
Testículos	Pos	Pos
Amígdala	Pos	Pos
Hígado	Pos	Neg
Placenta	Pos	Neg

**B**

Hígado normal



**FIG. 6**

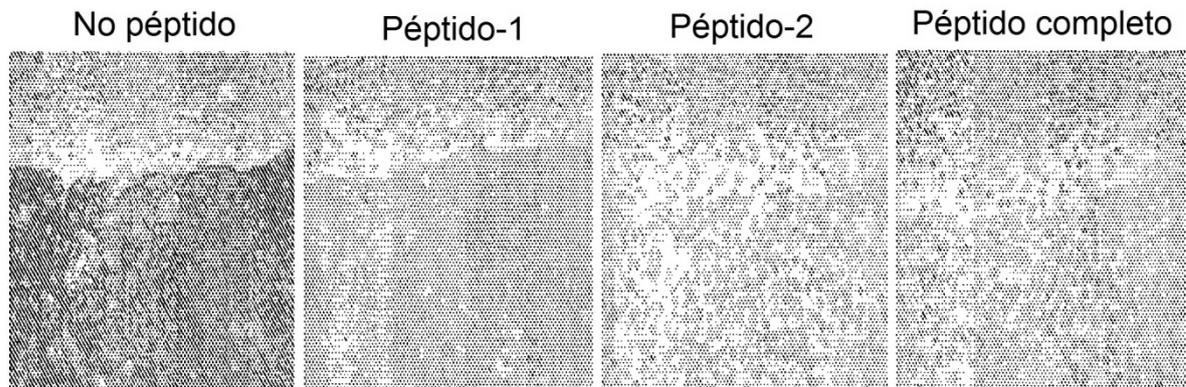


**FIG. 7**

**A**

Número de péptido	Secuencia	Nivel de inhibición
Péptido 1	QISLDNPDYQQD	Parcial
Péptido 2	QQDFFPKEAKPNG	Completo
Péptido 3	LDNPDYQQDFFPKEAKPNG	Completo

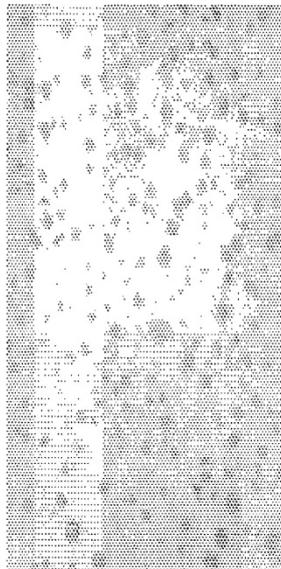
**B**



**FIG. 8**

**Hígados de ratón normales  
(2) teñidos con RDBM (5B7)**

**Hígados de ratón knockout SOCS-  
3 (2) teñidos con RDBM (5B7)**



Membrana negativa

Membrana negativa



Membrana positiva

Membrana positiva

FIG. 9A

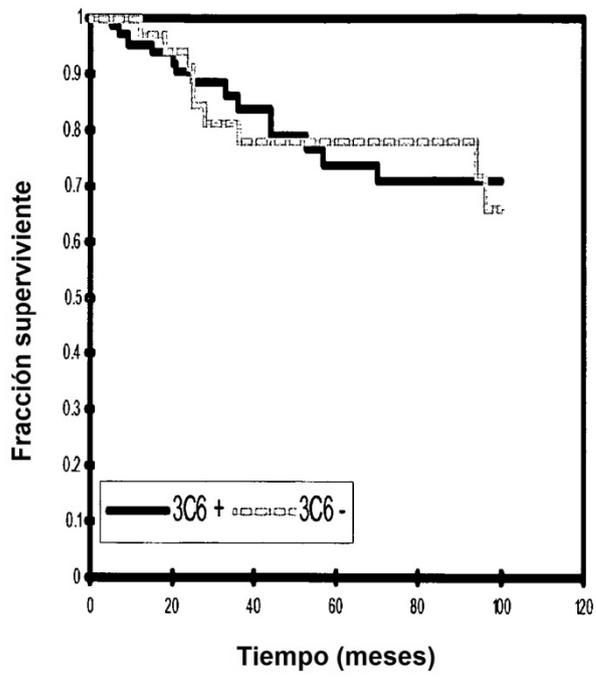


FIG. 9B

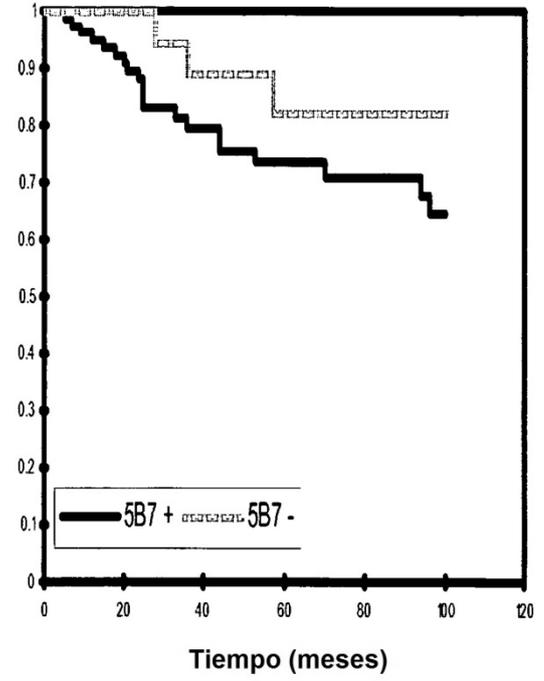


FIG. 10A

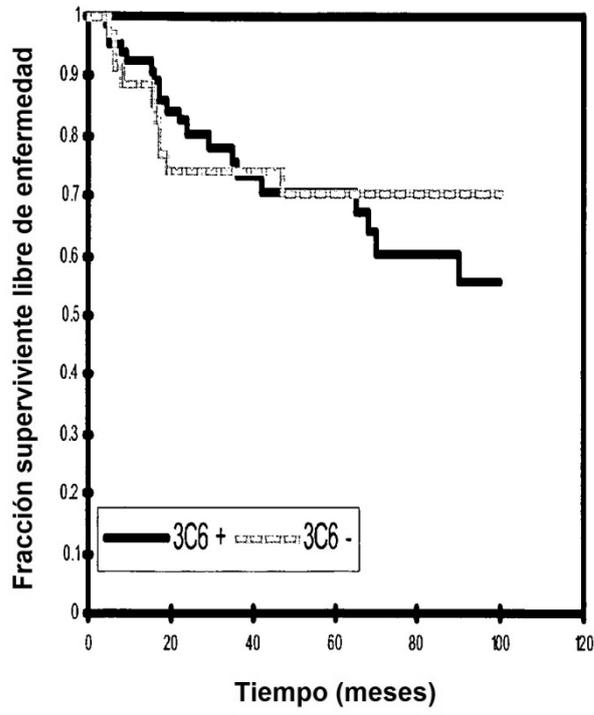


FIG. 10B

