

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 215**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2012 E 12729030 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2714740**

54 Título: **Anticuerpo neutralizante contra el receptor de prolactina Mat3 y su uso terapéutico**

30 Prioridad:

**03.06.2011 EP 11168644**

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

**30.05.2016**

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH  
(100.0%)  
Alfred-Nobel-Strasse 10  
40789 Monheim, DE**

72 Inventor/es:

**FREIBERG, CHRISTOPH;  
OTTO, CHRISTIANE;  
LINDEN, LARS;  
HARRENGA, AXEL;  
TRAUTWEIN, MARK;  
GREVEN, SIMONE y  
WILMEN, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 572 215 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

Anticuerpo neutralizante contra el receptor de prolactina Mat3 y su uso terapéutico

La presente invención se refiere al anticuerpo contra el receptor de prolactina Mat3 y proporciona regiones de unión a antígeno recombinantes del anticuerpo Mat3 y fragmentos funcionales que contienen dichas regiones de unión a antígeno que se unen específicamente y neutralizan el receptor de prolactina, a secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anterior, a vectores que los contienen, a composiciones farmacéuticas que los contienen y a su uso en el tratamiento o la prevención de la endometriosis o de otras enfermedades que podrían beneficiarse de la inhibición de la señalización mediada por el receptor de prolactina.

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica compuesta por 199 aminoácidos. La PRL pertenece a la familia de polipéptidos de hormonas del crecimiento (GH) de lactógenos placentarios (PL) y se sintetiza en las células lactotróficas de la pituitaria y en diversos tejidos extrapituitarios, tales como linfocitos, las células del epitelio mamario, el miometrio y la próstata. Dos promotores diferentes regulan la síntesis de PRL en la pituitaria y fuera de ella (BioEssays 28:1051-1055, 2006).

La PRL se une al receptor de PRL (PRLR), un receptor transmembrana individual que pertenece a la superfamilia de los receptores de citocinas de clase 1 (Endocrine Reviews 19:225-268, 1998). El PRLR existe en tres isoformas diferentes, la forma corta, la forma larga y la forma intermedia, que pueden distinguirse por la longitud de sus colas citoplasmáticas. Tras la unión al ligando, un procedimiento secuencial da lugar a la activación de PRLR. La PRL interactúa a través de su sitio de unión 1 con una molécula de PRLR y después atrae a través de su sitio de unión 2 a una segunda molécula receptora, dando lugar a un dímero activo de PRLR. La dimerización del PRLR da como resultado una activación notable de la vía JAK/STAT (Janus cinasa/transductores de señales y activadores de la transcripción). Una vez que el receptor se dimeriza, las JAK (predominantemente JAK2) que están asociadas al receptor, se fosforilan y se activan mutuamente. Además, el PRLR también se fosforila y puede unirse a proteínas que contienen el dominio SH2, tales como los STAT. Posteriormente, los STAT que están unidos a los receptores se fosforilan, se separan de dichos receptores y se traslocan hacia el núcleo, donde estimulan la transcripción de genes diana. También se ha descrito la activación de la vía Ras-Raf-MAPK y la activación de la cinasa citoplasmática src por los PRLR (para una revisión, véase Endocrine Reviews 19: 225-268, 1998).

La señalización mediada por el PRLR tiene un papel en una diversidad de procedimientos, tales como el desarrollo de las glándulas mamarias, la lactancia, la reproducción, el crecimiento de tumores mamarios y de próstata, enfermedades autoinmunitarias, el crecimiento y el metabolismo en general y la modulación inmunitaria (Endocrine Reviews 19: 225-268, 1998; Annu. Rev. Physiol. 64: 47-67, 2002).

En la actualidad, no hay medicaciones disponibles que permitan la interferencia completa de la señalización mediada por el PRLR, aparte de la inhibición de la secreción de la PRL en la pituitaria mediante el uso de bromocriptina y otros agonistas del receptor de dopamina del tipo 2 (Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism 2(10): 571-581, 2006). Sin embargo, estos agentes no suprimen la síntesis de la PRL fuera de la pituitaria que puede compensar con éxito la inhibición de la síntesis de la PRL en la pituitaria, llevando a una señalización mediada por el PRLR casi sin alterar (Endocrine Reviews 19:225-268, 1998). Por lo tanto, no resulta sorprendente que los agonistas del receptor de dopamina del tipo 2 no hayan producido beneficios en aquellos pacientes que padecían cánceres de mama o enfermedades autoinmunitarias tales como el lupus sistémico o la artritis reumatoide (Breast Cancer Res. Treat. 14:289-29,1989; Lupus 7:414-419,1998) aunque la prolactina intervenga en estas enfermedades. La síntesis local de prolactina en células de cáncer de mama o linfocitos, que desempeña un papel central en el carcinoma de mama o en enfermedades autoinmunitarias respectivamente, no se bloqueaba por agonistas del receptor de dopamina.

En el documento WO2003/004989 (de Millenium Pharmaceuticals) se describieron por primera vez anticuerpos que se unen al PRLR para diagnosticar el cáncer de mama. En dicho documento WO2004/004989, numerosos genes y las proteínas correspondientes que incluían PRLR sobreexpresado en varios tejidos de tumor mamario se consideraron marcadores adecuados para la detección temprana de neoplasias. En el documento WO03/008583, que se centra en linfomas y leucemia, se describen genes y proteínas, que incluyen el PRLR, que están asociados a carcinomas.

Además, en el documento WO2006/110585 (de Novartis) se describió la sobreexpresión del PRLR como indicador de cáncer y el uso de anticuerpos específicos contra el PRLR para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de mama y otros tipos de cáncer (cáncer de pulmón, cáncer de próstata y cáncer de piel). Esta vez, se reivindicaron anticuerpos monoclonales que presentaban una actividad antagónica basándose en dos evidencias experimentales a) el bloqueo de la expresión del PRLR por ARNs específicos de PRLR en las células de cáncer de mama MCF7 llevaba a la inhibición de la proliferación de estas células y b) la prolactina induce la fosforilación de STAT5 y de la MAPK en diversas células de cáncer de mama tales como T47D. Sin embargo, no se proporcionó ninguna evidencia de que un anticuerpo monoclonal efectivamente inhibiera la proliferación de las líneas de células cancerosas ni se desveló ningún anticuerpo concreto.

La primera evidencia *in vivo* del concepto de que los antagonistas del PRLR interfieren con éxito en el desarrollo del cáncer de mama se publicó en 1988. En un modelo de tumores de mama DMBA en ratones, con un anticuerpo monoclonal contra el PRLR fue posible reducir la incidencia de tumores en las mamas (Am. J. Pathol. 133:589-

595,1988).

5 En el documento US 2007/0269438 (de Biogen) se describieron por primera vez anticuerpos contra el PRLR que podrían usarse para prevenir o tratar el cáncer de mama. Se indicó que los productos de la expresión (anticuerpos) en cinco líneas celulares de hibridomas podían unirse con gran afinidad a las líneas de células cancerosas de las mamas T47D y MCF7 y bloquear la señalización mediada por la PRL (es decir, la fosforilación de STAT5, de la MAPK y de la AKT). Sin embargo, no se ha desvelado ninguna prueba de concepto *in vivo*. Tampoco se ha proporcionado ninguna evidencia más allá del conocimiento actual que respalde la afirmación de que, especialmente después de que el cáncer del paciente se haya vuelto independiente de antiestrógenos, se puede administrar al paciente el anticuerpo anti-PRLR.

10 En el documento WO2008/022295 (de Novartis) se describe un segundo conjunto de anticuerpos monoclonales específicos contra el PRLR, así como sus secuencias primarias desveladas. Aunque se indica que estos anticuerpos pueden ser usados como agentes terapéuticos para tratar el cáncer de mama, el cáncer de pulmón y el cáncer de próstata, un modelo de linfoma sirvió para demostrar el efecto antiproliferativo de estos agentes *in vivo*.

15 Por otro lado, los antagonistas peptidérgicos del PRLR que derivan de la prolactina y que presentan una supresión en el extremo N y una mutación puntual (por ejemplo, la prolactina delta1-9G129R) también se comportan como antagonistas del PRLR, sin embargo, estos antagonistas presentan una semivida breve (de 15-20 minutos) y una potencia baja en comparación con la prolactina (Pituitary 6:89-95,2003). Según esto, los anticuerpos neutralizadores del PRLR son superiores, especialmente en el contexto de la inhibición de la señalización autocrina incrementada de la prolactina, que cumple una función importante en el cáncer de mama y en el cáncer de próstata.

20 También se investigó la participación de la señalización mediada por el PRLR en el contexto de la endometriosis benigna. En un estudio, se analizó el patrón de expresión del PRLR en muestras de endometrio y de endometrio eutópico obtenidas de pacientes que padecían endometriosis (Acta Obstet. Gynecol. Scand. 81:5-10, 2002) durante la fase proliferativa media/tardía del ciclo menstrual. Se demostró que el ARNm del PRLR estaba presente en el endometrio eutópico del 79% de los pacientes con endometriosis analizados, mientras que estaba ausente en las lesiones en el endometrio del 86% de los pacientes con endometriosis. Estos datos sugirieron una posible regulación diferencial de la expresión del PRLR entre el tejido normal y el tejido con endometriosis. Sin embargo, según los datos relacionados con la expresión, no puede concluirse que la inhibición del PRLR represente una terapia apropiada para la endometriosis, especialmente debido a que no fue posible detectar la expresión del PRLR en las lesiones provocadas por la endometriosis (Acta Obstet. Gynecol. Scand. 81:5-10, 2002).

30 En conclusión, aunque la señalización mediada por el PRLR cumple una función en diversos procedimientos celulares, se han desvelado muy pocos resultados y parcialmente contradictorios que demuestren el valor terapéutico del antagonismo del PRLR en el contexto de la mayor parte de las enfermedades benignas, incluyendo la endometriosis.

35 Se han publicado muchos datos que indican que el PRLR podría tener un papel causativo en el cáncer de mama. Y como concepto, los antagonistas potentes del PRLR podrían ser agentes apropiados para demostrar el valor terapéutico de la inhibición del PRLR en el contexto del cáncer de mama. Sin embargo, hasta ahora no se han proporcionado pruebas de concepto *in vivo* de que el bloqueo del PRLR efectivamente dé como resultado la inhibición del crecimiento de los tumores (excepto en el contexto del tratamiento de los linfomas y de la inhibición del desarrollo del cáncer de mama) ni de la posibilidad de usar los anticuerpos que antagonizan el PRLR en el tratamiento de las enfermedades benignas que podrían beneficiarse del bloqueo de la señalización de PRLR. Por lo tanto, los anticuerpos disponibles en la actualidad no pueden usarse en modelos predictivos en los cuales puedan basarse los estudios de pruebas de concepto.

45 Existe la necesidad de anticuerpos que se unan con una afinidad elevada al PRLR humano, de mono o de ratón, sin que compitan con la PRL y que, de esta manera, neutralicen la señalización mediada por el PRLR en estas tres especies y que permitan llevar a cabo estudios de prueba de concepto preclínicos en ratones y, mediante el uso de dosis razonables, también en monos.

50 Por consiguiente, el problema subyacente de la presente invención es proporcionar nuevos anticuerpos contra el PRLR que puedan usarse en modelos predictivos en los cuales puedan basarse estudios de prueba de concepto preclínicos y que puedan usarse para tratar enfermedades que se benefician del bloqueo de la señalización del receptor de prolactina.

55 Este problema se soluciona proporcionando el nuevo anticuerpo Mat3. Ahora se ha descubierto que dicho anticuerpo es sorprendentemente específico y tiene una afinidad elevada por el PRLR humano, de mono y de ratón en estudios bioquímicos así como en estudios de unión celular, sin unirse competitivamente a la PRL, y por lo tanto neutraliza la señalización mediada por el PRLR en las tres especies, en contraste con los anticuerpos que se describen en el documento WO2008/022295, tales como HE06642, que se unen de forma no competitiva a la PRL. De esta manera, este anticuerpo puede ser de utilidad para realizar estudios de prueba de concepto preclínicos en ratones y, en dosis razonables, también en monos. Más aun, ahora se ha descubierto que con este anticuerpo puede obtenerse un beneficio terapéutico en los sujetos, ya que se trata de un

anticuerpo más potente y que se encuentra relacionado más estrechamente con las secuencias de la línea germinal humana y, por lo tanto, presenta un mejor perfil de efectos colaterales, es decir, un menor riesgo de desencadenar una reacción inmunitaria debido a la menor dosificación y mayor similitud con secuencias de la línea germinal humana, en comparación con los anticuerpos que se desvelan en el documento WO2008/022295, tales como HE06642, que se unen de manera no competitiva a la PRL.

El anticuerpo novedoso Mat3 preferentemente presenta reacción cruzada con PRLR de diversas especies, tales como *Macaca mulatta* (macaco), *Macaca fascicularis* (mono cangrejero), *Mus musculus* (ratón) y *Homo sapiens* (ser humano). La reactividad cruzada aquí significa que las afinidades (el valor de  $K_D$ ) y los valores de  $CE_{50}$  de unión celular de dicho anticuerpo al PRLR humano, de mono y de ratón son menores que  $10 \times 10^{-9}$  M (véanse la tabla 1 y los ejemplos 9, 10, 13 y 14), y que los valores de  $CI_{50}$  en el contexto de la inhibición de la proliferación son inferiores a  $20 \times 10^{-9}$  M (véanse los ejemplos 1 a 3). La presente invención se basa en el descubrimiento del anticuerpo novedoso Mat3 que puede proporcionar un beneficio terapéutico en los sujetos (las secuencias del anticuerpo novedoso se describen en SEQ ID NO: 1-10). El anticuerpo de la invención, que más preferentemente es un anticuerpo completamente humano muy relacionado con secuencias de la línea germinal humana o que puede ser un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o una variante obtenida por ingeniería genética del mismo que comprende las CDR de la versión completamente humana, puede usarse en diversos contextos, los cuales se describirán con mayor detalle más adelante.

Para demostrar la superioridad que presenta dicho anticuerpo en el contexto de la potencia y la reactividad cruzada en el ser humano, en el mono y en el ratón, en comparación con el anticuerpo conocido bien caracterizado que se describe en el documento WO 2008/022295, que se une de manera no competitiva a la PRL, en estudios de proliferación *in vitro* se ha comparado dicho anticuerpo con HE06642 del documento WO 2008/022295 (ejemplos 1-3). Los anticuerpos aquí mencionados HE06642, HE06.642 y 06.642, contienen los dominios variables que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 14 y 15, que son idénticas a la secuencia de he06.642-2, que se describe en el documento WO 2008/022295.

El anticuerpo Mat3 se caracterizó en diversos sistemas celulares para determinar su especificidad de especie y su potencia, así como su eficacia en distintos paradigmas de análisis en el contexto de la inactivación de la señalización y la proliferación mediadas por el PRLR. Los análisis de proliferación se llevaron a cabo en líneas de células Ba/F que habían sido transfectadas de manera estable con un PRLR humano (ejemplo 1), con un PRLR murino (ejemplo 2) o con un PRLR de macaco (ejemplo 3). El anticuerpo Mat3 inhibió por completo la proliferación de las células en las que se expresaba el PRLR humano, murino o de macaco (ejemplos 1-3). El anticuerpo HE06642 (WO 2008/022295) no presentó actividad sobre las células en las que se expresaba el PRLR murino y presentó una actividad muy reducida sobre las células en las que se expresaba el PRLR de macaco en comparación con Mat3. El anticuerpo Mat3 también presentó una potencia superior en el PRLR humano que el anticuerpo humano HE06.642. También hay evidencias de que Mat3 inhibe la proliferación de las células de linfoma de rata NB2 con una potencia mayor que HE06422. Además de los análisis basados en la proliferación celular, se pusieron en práctica ensayos en los que se usó una enzima luciferasa como indicador y una línea de células HEK293 que habían sido transfectadas de manera estable con un PRLR humano o murino (ejemplo 12) y que habían sido transfectadas de manera transitoria con un gen indicador que codificaba la luciferasa, bajo el control de los LHRE (los elementos que participan en la respuesta a las hormonas lactogénicas). Mediante el uso de estos sistemas, fue posible confirmar que hay un elemento promotor que depende de la señalización mediada por el PRLR que se desactiva en presencia del anticuerpo Mat3. De esta manera, se comprobó una vez más la incapacidad del anticuerpo HE06.642 de bloquear de manera eficiente la señalización mediada por el PRLR en ratones.

Según lo anterior, puede concluirse que el anticuerpo Mat3 es apropiado para analizar la inhibición de la señalización mediada por el PRLR en modelos basados en ratones o en monos.

El anticuerpo contiene dominios variables que son más similares a los que están codificados por los genes V de la línea germinal humana, en comparación con el anticuerpo HE06642. En la figura 6 se muestra que los dominios VH y VL son 90% idénticos a los que codifican los genes V de la cadena ligera lambda y V de la cadena pesada de la línea germinal humana (base de datos VBSE2; Retter, I., Althaus, H. H., Munich, R., Müller, W.: VBASE2, an integrative V gene database. Nucleic Acids Res. 1 de Enero de 2005; 33 (Database issue):D671-4). HE06642 presenta una identidad de 89% con las secuencias de la línea germinal del dominio VH traducido, pero su identidad con la secuencia de V de cadena ligera kappa de la línea germinal traducida más parecida encontrada en VBSE2 es de apenas 80%. Este descubrimiento ofrece la oportunidad de conseguir menor riesgo de inmunogenicidad al tratar a los pacientes con Mat3.

A través de los estudios basados en la unión de Mat3 y de HE06642 a los dominios extracelulares de los PRLR humano, de mono y de ratón, se indicó que los dos anticuerpos interactúan con estos dominios en formas purificadas (véanse el ejemplo 10 y la tabla 1 más adelante). Sin embargo, cuando estos dominios se exponen en la superficie de las células, pueden observarse diferencias más pronunciadas entre el anticuerpo Mat3 y el anticuerpo HE06642. Vale destacar que HE06642 no se une al PRLR murino expresado en las células Ba/F, en contraste con el anticuerpo Mat3 (tabla 2, figura 5 y ejemplo 9). Este descubrimiento es consistente con la observación de que el anticuerpo Mat3 bloquea la señalización y la proliferación mediadas por el PRLR en los ratones, en contraste con el anticuerpo HE06642. Mediante un análisis de péptidos que se llevó a cabo con el dominio extracelular del PRLR humano unido a Mat3 y HE06642 en una forma purificada o expresado en la superficie de las células, fue posible

demostrar que el anticuerpo Mat3 se une al subdominio S2 (ejemplo 11), al igual que el anticuerpo HE06642 como se ha indicado previamente (documento WO 2008/022295). Con este análisis, también se demostró que había diferencias en la unión a los dominios S2 entre los anticuerpos Mat3 y HE06642 (figura 8). Recientemente se publicó que las diferencias en la unión de anticuerpos observadas por dicho análisis de péptidos podían usarse como un fundamento para explicar las diferencias entre las propiedades de los anticuerpos (Niederfellner y col., Blood., 28 de Marzo de 2011: doi 10.1182/blood-2010-09-305847). Como conclusión, los resultados del análisis de péptidos indican las causas de las diferencias que hay en la especificidad de especie y en la potencia entre el anticuerpo Mat3 y el anticuerpo HE06642.

Se proporciona un anticuerpo monoclonal humano Mat3, de acuerdo con la tabla 5 (SEQ ID NO: 1-10), o fragmentos de unión a antígeno de éste, que antagoniza la señalización mediada por el receptor de prolactina. El anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular (ECD) de PRLR (SEQ ID NO: 12) o a las variantes polimórficas humanas de SEQ ID NO: 12, tales como las variantes I146L e I76V, que se describen en PNAS 105 (38), 14533, 2008, y en J. Clin. Endocrinol. Metab. 95 (1), 271, 2010. Más aun, el anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular (ECD) del PRLR de macaco y de mono cangrejero (SEQ ID NO: 11) y al PRLR murino (SEQ ID NO: 13).

En una forma de realización, se describe el anticuerpo humano Mat3, una variante humanizada, modificada por ingeniería genética o quimérica de éste o un fragmento de unión a antígeno de éste, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 3 y una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1, así como una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 4 y una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2, que antagoniza la señalización mediada por el receptor de prolactina.

También se describe un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que comprenden las CDR del anticuerpo descrito anteriormente, donde la región variable de la cadena pesada contiene las secuencias de CDR correspondientes a SEQ ID NO: 5, 6 y 7 y la región variable de la cadena ligera contiene las secuencias de CDR correspondientes a SEQ ID NO: 8, 9 y 10.

En otra forma de realización de la presente invención, el anticuerpo Mat3 consiste en una región de unión al antígeno que se une específicamente a una o más regiones del dominio extracelular del PRLR humano, de mono o de ratón, donde las secuencias de aminoácidos del PRLR humano se representan por las secuencias de aminoácidos desde la posición 1 a 210 de SEQ ID NO: 12 y las variantes polimórficas humanas de SEQ ID NO: 12, y por las secuencias de aminoácidos desde la posición 1 a 210 del PRLR de mono según SEQ ID NO: 11 y del PRLR de ratón según SEQ ID NO: 13.

En otra forma de realización de la presente invención, el anticuerpo Mat3 consiste en una región de unión al antígeno cuya afinidad por el dominio extracelular del PRLR humano, de mono o de ratón es de al menos 100 nM, preferentemente es menor que aproximadamente 100 nM, más preferentemente es menor que aproximadamente 30 nM, y aún más preferentemente es menor que aproximadamente 10 nM.

En otra forma de realización, el anticuerpo Mat3 consiste en una región de unión al antígeno que se une específicamente a una o más regiones del dominio extracelular del PRLR humano con una afinidad de al menos 10 nM, más preferentemente con una afinidad menor que aproximadamente 1 nM.

También es un objeto de la presente invención el Mat3 anteriormente mencionado, en el que los dominios constantes de cadena pesada determinan una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 modificada o no modificada.

En la tabla 1 se proporciona un resumen de las constantes de disociación (que representan la afinidad) y las velocidades de disociación del anticuerpo Mat3 de la invención, que pueden determinarse mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore) con dominios extracelulares monoméricos (que abarcan los aminoácidos 1 a 210) del PRLR humano (SEQ ID NO: 12), del PRLR de macaco y de mono cangrejero PRLR (SEQ ID NO: 11, donde la fusión con la región Fc-His ha sido eliminada por medio de una digestión con el factor proteolítico Xa), y del PRLR murino (SEQ ID NO: 13), sobre el anticuerpo inmovilizado de manera directa (ejemplo 10).

**Tabla 1. Constantes de disociación monovalentes y velocidades de disociación determinadas con dominios extracelulares purificados del PRLR humano, de macaco/mono cangrejero o de ratón expresados en células HEK293, según una resonancia de plasmón superficial, con el anticuerpo Mat3 en forma de una molécula de IgG humana (véase el ejemplo 10)**

	PRLR humano	PRLR de macaco/mono cangrejero	PRLR de ratón
<b>K<sub>D</sub> [M]</b>	0,9 x 10 <sup>-9</sup>	7,1 x 10 <sup>9</sup>	0,4 x 10 <sup>9</sup>
<b>K<sub>d</sub> [1/s]</b>	4,4 x 10 <sup>-4</sup>	1,1 x 10 <sup>-3</sup>	2,1 x 10 <sup>-4</sup>

En el documento WO2008/022295, se indica que la afinidad de HE06642 sobre el dominio extracelular del PRLR humano es de  $2,6 \times 10^{-9}$  M, que es de  $38,9 \times 10^{-9}$  M sobre el dominio extracelular del PRLR de mono cangrejero, y que es de  $2,7 \times 10^{-9}$  M sobre el dominio extracelular del PRLR murino.

5 La afinidad del anticuerpo Mat3 en las células se determinó según una clasificación de las células activadas por fluorescencia (FACS), en combinación con un análisis de Scatchard (ejemplo 9).

En la tabla 2 se detalla la fuerza de la unión que presenta el anticuerpo Mat3, en forma de una molécula de IgG2 humana, en una línea de células HEK293 que han sido transfectadas de manera estable con un PRLR humano o de macaco, respectivamente.

10 **Tabla 2. Potencia de la unión del anticuerpo anti-PRLR Mat3, en forma de una molécula de IgG2 humana, en una línea de células HEK293 que han sido transfectadas de manera estable con un PRLR humano o de macaco, determinada por medio de una FACS (véase el ejemplo 9)**

Anticuerpo	CE <sub>50</sub> [M]	
	HEK293 con el PRLR humano	Ba/F con el PRLR de macaco
Mat3	$0,53 \times 10^{-9}$	$2,94 \times 10^{-9}$

Generación de los anticuerpos

15 Para aislar un panel de anticuerpos con capacidad de bloquear de manera funcional el PRLR humano y murino, se investigaron en paralelo dos formatos de la biblioteca de presentación de anticuerpos humanos sintéticos en fagos denominada n-CoDeR®, de Bioinvent (Söderlind y col. 2000, Nature BioTechnology. 18, 852-856), donde se expresaban fragmentos scFv y Fab, respectivamente. Los blancos usados para la selección de los fragmentos scFv o Fab fueron el ECD soluble del PRLR humano (los aminoácidos entre las posiciones 1 y 210 de SEQ ID NO: 12) y del PRLR de ratón (los aminoácidos entre las posiciones 1 y 210 de SEQ ID NO: 13), que se aplicaron como variantes biotiniladas (con biotina NHS-LC, Pierce) y no biotiniladas, así como la línea de células de cáncer de mama humano T47D, donde se expresaba el PRLR.

20 Se usó una combinación de diversos abordajes con una tecnología de presentación en fagos (PDT) para aislar anticuerpos monoclonales con especificidad y una gran afinidad por el PRLR mediante Se trató de una combinación de análisis de proteínas y ensayos en células completas que comprendió el desarrollo de herramientas específicas. Las herramientas y los procedimientos usados para el análisis incluyen el ECD del PRLR humano y de ratón expresados de manera recombinante en una fusión con un dominio Fc (R&D Systems, n.º de catálogo 1167-PR y 1309-PR, respectivamente, posiciones 1-216 de SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente, cada uno fusionado al dominio Fc de la IgG1 humana, posiciones 100-330 de la IgG1 humana), el dominio extracelular del PRLR humano expresado de manera recombinante en una fusión con una marca de seis histidinas (SEQ ID NO: 12), la línea de células HEK293 y la línea de células de linfoma murino Ba/F, cada una transfectada de manera estable con el PRLR humano y murino, respectivamente, así como la línea de células de cáncer de mama T47D y la línea de células de linfoma de rata Nb2, en cada una de las cuales se expresaba de manera natural el PRLR. También abarcaron el desarrollo de procedimientos y ensayos de búsqueda con los que pudieran identificarse los anticuerpos neutralizadores con capacidad de unirse de manera preferencial al PRLR en la superficie de las células, y que también pudieran reaccionar con los PRLR de ratón.

35 El análisis comprendió primero identificar los componentes que se unieran al PRLR humano y eventualmente al PRLR de ratón en pruebas de ELISA, mediante el uso de antígenos expresados de manera recombinante. La combinación de estos procedimientos específicos permitió el aislamiento – entre otros – del anticuerpo “005-C04”. Por maduración de afinidad de “005-C04” en los dominios extracelulares del PRLR humano y PRLR murino, se identificaron sustituciones beneficiosas de acuerdo al procedimiento descrito en el ejemplo 8. Finalmente, las sustituciones individuales beneficiosas para una afinidad mejorada se evaluaron de acuerdo a su influencia en la termoestabilidad del anticuerpo. Especialmente, el despliegue cooperativo del dominio Fab durante la desnaturalización de los anticuerpos maduros (por ejemplo por elevación de la temperatura) debería haber sido asegurado (referencia respecto al despliegue cooperativo: Roethlisberger, D. y col., J. Mol. Biol. 2005: 347, 773–789). El anticuerpo Mat3 surgió del descubrimiento del anticuerpo descrito anteriormente y estrategia de maduración.

VARIANTES DE LOS PÉPTIDOS

50 Los anticuerpos de la invención no se limitan a las secuencias peptídicas específicas que se proporcionan en el presente documento. Por el contrario, la invención también abarca variantes de estos polipéptidos. Con relación a la presente invención y a la tecnología y las referencias disponibles en la actualidad, aquellos versados en la técnica han de poder preparar, evaluar y utilizar variantes funcionales de los anticuerpos que se describen en el presente documento, pero también han de apreciar que las variantes que puedan unirse al PRLR y lo bloqueen de manera funcional quedarán dentro del alcance de la presente invención.

Una variante puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo que tiene al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) (hipervariable) y/o un dominio/una posición del marco (FR) (variable) alterados respecto

de la secuencia peptídica que se describe en el presente documento. Para ilustrar con mayor detalle este concepto, a continuación se proporcionará una descripción breve de la estructura de los anticuerpos.

Un anticuerpo está compuesto por dos cadenas peptídicas, cada una de las cuales contiene un dominio constante de la cadena ligera o tres dominios constantes de la cadena pesada y una región variable (VL, VH). En cada caso, esta última está compuesta por cuatro regiones FR (VH: HFR1, HFR2, HFR3, HFR4; VL: LFR1, LFR2, LFR3, LFR4) y tres CDR separadas (VL: LCDR1, LCDR2, LCDR3; VH: HCDR1, HCDR2, HCDR3). El sitio de unión al antígeno está formado por una o más CDR, pero son las regiones FR las que proporcionan el marco estructural para las CDR, por lo que tienen una función importante en la unión al antígeno. Por medio de la alteración de uno o más restos de aminoácidos en una región CDR o FR, aquellos versados en la técnica han de poder generar o diversificar de manera convencional las secuencias de los anticuerpos. Estas secuencias pueden analizarse contra el antígeno, por ejemplo, para establecer si presentan propiedades novedosas o mejoradas.

En la figura 4 se proporcionan esquemas de la numeración de la posición de cada aminoácido en los dominios variables VL y VH. En las tablas 3 (VH) y 4 (VL) se detallan las regiones de las CDR del anticuerpo Mat3 de la invención y se comparan los aminoácidos en una posición dada con una secuencia de consenso correspondiente o con un "gen maestro", en cuyo caso las regiones de las CDR están marcadas con una "X". En las tablas 5 y 6 se detallan las asignaciones de los números de los identificadores de secuencias para los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos y las variantes del PRLR que se proporcionan en esta invención.

**Tabla 3. Secuencia VH del anticuerpo Mat3 que incluye anotación de CDR**

				-HCDR1-		
Mat3 VH	EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	S.YMMHWVRQ	APGKGLEWVS	
Consenso	EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTXX	XXXXXXXXXVRQ	APGKGLEWVX	
				----HCDR2-----		-
Mat3 VH	DIARL.SSYT	NYADSVKGRF	TISRDNKNT	LYLQMNSLRA	EDTAVYYCAR	
Consenso	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXF	TISRDNKNT	LYLQMNSLRA	EDTAVYYCXX	
				--HCDR3-----		
Mat3 VH	GLDA.....R	RMDYWGQGTL	VTVSS			
Consenso	XXXXXXXXXX	XXXXWGQGTL	VTVSS			

**Tabla 4. Secuencia VL del anticuerpo Mat3 que incluye anotación de CDR**

				---LCDR1-----		
Mat3 VL	QSVLTQPPSA	SGTPGQRVTI	SCTGSSSNIG	AGYVWHWYQQ	LPGTAPKLLI	
Consenso	QSVLTQPPSA	SGTPGQRVTI	SCXXXXXXXXX	XXXXXXXXWYQQ	LPGTAPKLLI	
				LCDR2		----LCDR3--
Mat3 VL	YRNNQRPSGV	PDRFSGSKSG	TSASLAI SGL	RSEDEADYYC	AAWDDSLNG.	
Consenso	YXXXXXXXXGV	PDRFSGSKSG	TSASLAI SGL	RSEDEADYYX	XXXXXXXXXX	
				-		
Mat3 VL	WLFGGGTKLT	VLGQ				
Consenso	XXFGGGTKLT	VLGQ				

Tabla 5. Secuencias de los anticuerpos

Anticuerpo	HCDR1		HCDR2		HCDR3		LCDR1		LCDR2		LCDR3		Proteína VH		Proteína VL		Nucleótido VH		Nucleótido VL				
	SEQ ID	6	SEQ ID	7	SEQ ID	8	SEQ ID	9	SEQ ID	10	SEQ ID	1	SEQ ID	2	SEQ ID	3	SEQ ID	4	SEQ ID	16	SEQ ID	17	
Mat3	5																						
HE06.642	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	15	16	17						

**Tabla 6. Secuencias de los dominios extracelulares de PRLR de humano, mono y ratón**

Anticuerpo	SEQ ID
<b>ECD PRLR humano (Proteína)</b>	<b>12</b>
<b>ECD PRLR murino (Proteína)</b>	<b>13</b>
<b>ECD PRLR de macaco y mono cangrejero (Proteína)</b>	<b>11</b>

Aquellos versados en la técnica han de poder usar los datos en las tablas 3, 4 y 5 para diseñar variantes de los péptidos que se hallen dentro del alcance de la presente invención. Es preferible que las variantes se construyan cambiando los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR. Una variante también puede presentar una o más regiones del marco (FR) alteradas. Por ejemplo, puede alterarse un péptido en el dominio de la FR para obtener una desviación respecto de la secuencia de la línea germinal.

Además, las variantes pueden obtenerse por maduración, es decir, usando un anticuerpo como punto de partida para la optimización, mediante la diversificación de uno o más restos de aminoácidos en el anticuerpo, preferentemente los restos de aminoácidos en una o más CDR, a lo que sigue el análisis la colección resultante de variantes del anticuerpo, con el objeto de obtener variantes con propiedades mejoradas. En particular, se prefiere la diversificación de uno o más restos de aminoácidos en la LCDR3 de la VL, en la HCDR3 de la VH, en la LCDR1 de la VL y/o en la HCDR2 de la VH. La diversificación puede efectuarse sintetizando una colección de moléculas de ADN con la tecnología de mutagénesis de trinucleótidos (TRIM) [Virnekås, B., Ge, L., Plückthun, A., Schneider, K.C., Wellenhofer, G., y Moroney S.E. (1994) Trinucleotide phosphoramidites: ideal reactants for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. Nucl. Acids Res. 22, 5600]. Véase además el ejemplo 8.

#### Variantes de aminoácidos conservativas

Pueden prepararse variantes de los polipéptidos que conservan la estructura molecular general de un anticuerpo con una secuencia peptídica como las que se describen en el presente documento. Cuando se analizan las propiedades de los aminoácidos individuales, es posible reconocer algunas sustituciones racionales. Las sustituciones de aminoácidos, es decir, las "sustituciones conservativas", pueden realizarse, por ejemplo, según la similitud en la polaridad, la carga, la solubilidad, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los restos en cuestión.

Por ejemplo, (a) los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen la alanina, la leucina, la isoleucina, la valina, la prolina, la fenilalanina, el triptofano y la metionina; (b) los aminoácidos polares neutros incluyen la glicina, la serina, la treonina, la cisteína, la tirosina, la asparagina y la glutamina; (c) los aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen la arginina, la lisina y la histidina; y (d) los aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico. Las sustituciones típicamente pueden efectuarse dentro de los grupos (a)-(d). Además, es posible reemplazar glicina por prolina, o viceversa, según su capacidad de interrumpir las hélices  $\alpha$ . De manera similar, determinados aminoácidos, tales como la alanina, la cisteína, la leucina, la metionina, el ácido glutámico, la glutamina, la histidina y la lisina, pueden hallarse con mayor frecuencia en las hélices  $\alpha$ , mientras que la valina, la isoleucina, la fenilalanina, la tirosina, el triptofano y la treonina pueden hallarse con mayor frecuencia en las láminas plegadas  $\beta$ . La glicina, la serina, el ácido aspártico, la asparagina y la prolina pueden hallarse con frecuencia en los giros. A continuación se detallan grupos de sustitución preferidos: (i) S y T; (ii) P y G; y (iii) A, V, L y I. Al tomar en consideración el código genético conocido y las técnicas de ADN recombinante y sintético, aquellos versados en la técnica han de poder construir con facilidad ADN que codifican las variantes de aminoácidos conservativas.

Tal como se usa en el presente documento, la "identidad de secuencia" entre dos secuencias de polipéptidos hace referencia al porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias. La "homología de secuencia" hace referencia al porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias preferidas de polipéptidos de la invención contienen secuencias de aminoácidos, en donde

- la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 es idéntica a SEQ ID NO: 5 en al menos 7 de 8 aminoácidos, y
- la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 es idéntica a SEQ ID NO: 6 en al menos 14 de 19, más preferido 15 de 19, más preferido 16 de 19, más preferido 17 de 19, o incluso más preferido 18 de 19 aminoácidos, y
- la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 es idéntica a SEQ ID NO: 7 en al menos 8 of 11, más preferido 9 de 11, o incluso más preferido 10 de 11 aminoácidos, y
- la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 es idéntica a SEQ ID NO: 8 en al menos 12 de 14, o más preferido 13 de 14 aminoácidos, y
- la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 es idéntica a SEQ ID NO: 9 en al menos 4 de 7, más preferido 5 de 7, o incluso más preferido 6 de 7 aminoácidos, y
- la secuencia de aminoácidos de la LCR3 es idéntica a SEQ ID NO: 10 en al menos 11 de 12 aminoácidos.

Moléculas de ADN de la invención

La presente invención también se refiere a moléculas de ADN que codifican los anticuerpos de la invención. Estas secuencias incluyen, sin limitaciones, las moléculas de ADN que se detallan en SEQ ID NO: 3 y 4.

5 Las moléculas de ADN de la invención no se limitan a las secuencias que se describen en el presente documento, sino que también incluyen variantes de éstas. Las variantes de ADN en el contexto de la invención pueden describirse en referencia a sus propiedades físicas en la hibridación. Aquellos versados en la técnica han de reconocer que el ADN puede usarse para identificar su complemento, y como el ADN tiene dos cadenas, sus equivalentes u homólogos, por medio de procedimientos de hibridación de ácidos nucleicos. También ha de reconocerse que la hibridación puede ocurrir con una complementariedad menor que 100%. Sin embargo, si se seleccionan las condiciones apropiadas, los procedimientos de hibridación pueden usarse para distinguir las secuencias de ADN según sus relaciones estructurales con una sonda particular. Para hallar lineamientos sobre estas condiciones, véanse Sambrook y col., 1989 [Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, EE.UU.] y Ausubel y col., 1995 [Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A., y Struhl, K., editores (1995). Current Protocols in Molecular Biology. Nueva York: John Wiley and Sons].

La similitud estructural entre las secuencias de los dos polinucleótidos puede expresarse en función de la "rigurosidad" de las condiciones bajo las que las dos secuencias hibridan una con otra. Tal como se usa en el presente documento, el término "rigurosidad" hace referencia a la medida en que las condiciones desfavorecen la hibridación. Las condiciones severas desfavorecen fuertemente la hibridación, de modo que, bajo estas condiciones, solamente podrán hibridar las moléculas muy relacionadas desde el punto de vista estructural. Por otro lado, las condiciones no severas favorecen la hibridación de aquellas moléculas que presentan un menor grado de relación estructural. Por consiguiente, la rigurosidad de la hibridación está correlacionada directamente con las relaciones estructurales entre las dos secuencias de ácidos nucleicos. Las siguientes ecuaciones son útiles para correlacionar la hibridación y las relaciones entre las secuencias (donde  $T_m$  es la temperatura de fusión de una dupla de ácidos nucleicos):

a.  $T_m = 69,3 + 0,41 (G+C)\%$

b. La  $T_m$  de una dupla de ADN disminuye  $1^\circ\text{C}$  al incrementarse 1% la cantidad de pares de bases no coincidentes.

c.  $(T_m)_{\mu 2} - (T_m)_{\mu 1} = 18,5 \log_{10} \mu 2 / \mu 1$ , donde  $\mu 1$  y  $\mu 2$  son las fuerzas iónicas de las dos soluciones.

30 La rigurosidad de la hibridación es una función de diversos factores, incluyendo la concentración general del ADN, la fuerza iónica, la temperatura, el tamaño de la sonda y la presencia de agentes que alteran los enlaces de hidrógeno. Los factores que promueven la hibridación incluyen las concentraciones elevadas de ADN, las fuerzas iónicas elevadas, las temperaturas reducidas, las sondas de gran tamaño y la ausencia de agentes que destruyen los enlaces de hidrógeno. La hibridación típicamente se lleva a cabo en dos fases: la fase de "unión" y la fase de "lavado".

35 Primero, en la fase de unión, la sonda se une al blanco en condiciones que favorecen la hibridación. En esta etapa, la rigurosidad usualmente se controla alterando la temperatura. Para obtener una rigurosidad elevada, la temperatura usualmente se fija entre  $65^\circ\text{C}$  y  $70^\circ\text{C}$ , a menos que se usen oligonucleótidos cortos (de menos de 20 nucleótidos). Una solución de hibridación representativa comprende SSC 6x, 0,5% de SDS, solución de Denhardt 5x y  $100 \mu\text{g}$  de ADN de transporte no específico [véase Ausubel y col., sección 2.9, suplemento 27 (1994)]. Evidentemente, se conocen condiciones de amortiguación muy diferentes que pueden ser equivalentes desde el punto de vista funcional. Cuando el grado de relación es menor, puede seleccionarse una menor temperatura. Las temperaturas de unión propias de las rigurosidades menores son de aproximadamente entre  $25^\circ\text{C}$  y  $40^\circ\text{C}$ . La rigurosidad media tiene lugar entre al menos aproximadamente  $40^\circ\text{C}$  y menos de aproximadamente  $65^\circ\text{C}$ . La rigurosidad elevada ocurre a al menos aproximadamente  $65^\circ\text{C}$ . En segundo lugar, se retira la sonda en exceso por lavado. En esta fase, usualmente se aplican condiciones más severas. Por lo tanto, la etapa de "lavado" es la más importante para determinar la relación por hibridación. Las soluciones de lavado típicamente contienen menores concentraciones de sal. Un ejemplo de una solución de lavado de rigurosidad mediana contiene SSC 2x y 0,1% de SDS. Una solución de lavado de rigurosidad alta contiene el equivalente (en términos de la fuerza iónica) de SSC menos de aproximadamente 0,2x, y una solución de lavado severa preferida contiene SSC aproximadamente 0,1x. Las temperaturas asociadas a los diversos grados de rigurosidad en el lavado son idénticas a las que se describieron con anterioridad para la "unión". La solución de lavado típicamente también es reemplazada una cantidad de veces durante el lavado. Por ejemplo, las condiciones de lavado de gran rigurosidad típicas comprenden dos lavados de 30 minutos a  $55^\circ\text{C}$  y tres lavados de 15 minutos a  $60^\circ\text{C}$ .

55 Por consiguiente, un objeto de la presente invención es una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo y los fragmentos de unión al antígeno de la presente invención.

Otra forma de realización de la presente invención es la secuencia de ácido nucleico aislada mencionada con anterioridad, que codifica los anticuerpos de la presente invención, donde las secuencias de ácidos nucleicos son como las que se detallan en la tabla 5.

Por consiguiente, la presente invención abarca aquellas moléculas de ácidos nucleicos que hibridan con las moléculas que se detallan en la Tabla 5 en condiciones de unión y lavado de gran rigurosidad, donde estas moléculas de ácidos nucleicos codifican un anticuerpo o un fragmento funcional de éste, que tienen propiedades como las que se describen en el presente documento. Las moléculas preferidas (desde la perspectiva del ARNm) son aquellas que tienen al menos 75% u 80% (preferentemente al menos 85%, más preferentemente al menos 90% y más preferentemente al menos 95%) de identidad de secuencia con una de las moléculas de ADN que se describen en el presente documento. Las moléculas bloquean la señalización mediada por el receptor de prolactina.

Variantes funcionalmente equivalentes

Otra clase más de variantes de ADN que se hallan dentro del alcance de la invención puede describirse en referencia al producto que codifican. Estos genes funcionalmente equivalentes se caracterizan porque codifican las mismas secuencias peptídicas que se proporcionan en SEQ ID NO: 1 y 2, debido a la degeneración del código genético.

Se reconoce que las variantes de las moléculas de ADN que se proporcionan en el presente documento pueden construirse de diversas maneras. Por ejemplo, es posible construirlas como ADN completamente sintético. Los procedimientos para sintetizar de manera eficiente oligonucleótidos con tamaños en el intervalo de entre 20 y aproximadamente 150 nucleótidos están ampliamente disponibles. Véase Ausubel y col., sección 2.11, suplemento 21 (1993). Los oligonucleótidos superpuestos pueden sintetizarse y ensamblarse de una manera que fue descrita por primera vez por Khorana y col., J. Mol. Biol. 72:209-217 (1971); véase también Ausubel y col., anteriormente citado, sección 8.2. El ADN sintético preferentemente se sintetiza con la inserción de sitios de restricción convenientes en los extremos 5' y 3' del gen, con el propósito de facilitar la clonación en un vector apropiado.

Como se indicó, un procedimiento para generar las variantes comprende comenzar con los ADN que se describen en el presente documento y luego llevar a cabo una mutagénesis dirigida a un sitio. Véase Ausubel y col., anteriormente citado, capítulo 8, suplemento 37 (1997). En un procedimiento típico, se clona un ADN blanco en un vehículo basado en un bacteriófago con ADN de cadena simple. El ADN de cadena simple se aísla y se hace hibridar con un oligonucleótido que contiene una o más alteraciones deseadas a nivel de los nucleótidos. Se sintetiza la cadena complementaria y se introduce el fago de cadena doble en un huésped. Parte de la progenie resultante contendrá la mutación deseada, lo cual podrá confirmarse por medio de una secuenciación del ADN. Además, hay diversos procedimientos disponibles que permiten incrementar la probabilidad de que la mutación deseada se halle en los fagos de la progenie. Estos procedimientos son bien conocidos por aquellos versados en la técnica, y hay kits disponibles comercialmente para generar estas mutaciones.

Construcciones de ADN recombinante y su expresión

En la presente invención también se proporcionan construcciones de ADN recombinantes que comprenden una o más de las secuencias de nucleótidos de la presente invención. Las construcciones recombinantes de la presente invención se usan en conexión con un vector, tal como un plásmido, un fago o un vector viral, en el cual se inserta una molécula de ADN que codifica un anticuerpo de la invención.

El gen codificado puede producirse con las técnicas que se describen en Sambrook y col., 1989, y Ausubel y col., 1989. Como alternativa, las secuencias de ADN pueden sintetizarse por medios químicos, usando, por ejemplo, sintetizadores. Véanse, por ejemplo, las técnicas que se describen en Oligonucleotide Synthesis (1984, Gait, editor, IRL Press, Oxford), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Aquellos versados en la técnica han de ser capaces de fusionar el ADN que codifica los dominios variables con fragmentos de genes que codifican regiones constantes de diversos isotipos humanos de IgG o derivados de éstos, tanto en formas mutadas como en formas no mutadas. La tecnología de ADN recombinante puede aplicarse para fusionar ambos dominios variables en un formato de una sola cadena, mediante el uso de conectores, por ejemplo, extensiones de quince aminoácidos que contienen tres motivos de glicina-glicina-glicina-glicina-serina. Las construcciones recombinantes de la invención están compuestas por vectores de expresión a partir de los cuales puede expresarse el ARN y/o los productos proteicos codificados por el ADN. El vector también puede comprender secuencias de regulación, incluyendo un promotor unido operativamente al marco abierto de lectura (ORF). El vector también puede comprender una secuencia marcadora de selección. También pueden ser necesarias señales de inicio y secreción específicas para bacterias para que tenga lugar una traducción eficiente de las secuencias insertadas que codifican los genes deseados.

En la presente invención también se proporcionan células huésped que contienen al menos un ADN de la presente invención. La célula huésped podrá ser virtualmente cualquier célula para la que haya disponibles vectores de expresión. Por ejemplo, podrá tratarse de una célula huésped eucariota superior, tal como una célula de mamífero, o una célula huésped eucariota inferior, tal como una célula de levadura, y también puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. La construcción recombinante podrá introducirse en la célula huésped por medio de una transfección mediada por fosfato de calcio o DEAE, a través de una transfección mediada por dextrano, por electroporación o por medio de una infección con un fago.

Expresión en bacterias

Los vectores de expresión útiles para usar en bacterias se construyen insertando una secuencia de ADN estructural que codifica la proteína deseada, en combinación con señales apropiadas para el inicio y la terminación de la traducción, en un marco de lectura operativo con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más

marcadores de selección fenotípica, un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector, y de resultar deseable, para proporcionar la amplificación en el huésped. Los huéspedes procariontes apropiados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*.

Los vectores bacterianos pueden estar basados, por ejemplo, en bacteriófagos, en plásmidos o en fagémidos. Estos vectores pueden contener un marcador de selección y un origen de replicación para bacterias derivado de plásmidos disponibles comercialmente, que típicamente contienen elementos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017). Una vez realizada la transformación de la cepa huésped apropiada y de cultivarla hasta alcanzar la densidad celular apropiada, se desreprime/induce el promotor seleccionado por medios apropiados (por ejemplo, variaciones en la temperatura o inducción química) y se cultivan las células durante un período adicional. Las células típicamente se cosechan por centrifugación y se destruyen por medios físicos o químicos, y el extracto en bruto resultante se retiene para continuar con la purificación.

En los sistemas bacterianos, pueden seleccionarse numerosos vectores de expresión en función del uso que se desee darle a la proteína expresada. Por ejemplo, cuando se desee producir una gran cantidad de esta proteína para generar anticuerpos o analizar bibliotecas de péptidos, por ejemplo, resultarán deseables aquellos vectores que dirijan la expresión de productos de fusión de proteínas que puedan ser purificados con facilidad en niveles elevados.

Entonces, un objeto de la presente invención es un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica los anticuerpos novedosos de la presente invención.

#### Expresión en mamíferos y purificación

Las secuencias de regulación preferidas para la expresión en células huésped de mamíferos incluyen los elementos virales que dirigen la expresión de proteínas en niveles elevados en las células de mamíferos, tales como los promotores y/o los potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador del CMV), del virus del simio 40 (SV40) (tales como el promotor/potenciador de SV40), de adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío mayor del adenovirus (AdMLP)) y de poliomias. Para hallar una descripción más detallada de los elementos de regulación virales y de las secuencias que los codifican, véanse, por ejemplo, el documento U.S. 5.168.062, de Stinski, el documento U.S. 4.510.245, de Bell y *col.*, y el documento U.S. 4.968.615, de Schaffner y *col.* Los vectores de expresión recombinantes también pueden incluir orígenes de replicación y marcadores de selección (véanse, por ejemplo, los documentos U.S. 4.399.216, 4.634.665 y U.S. 5.179.017, de Axel y *col.*). Los marcadores de selección apropiados incluyen genes que le confieren resistencia a drogas, tales como el G418, la higromicina o el metotrexato, a la célula huésped en la que se introduce el vector. Por ejemplo, el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) confiere resistencia al metotrexato y el gen neo confiere resistencia al G418.

La transfección del vector de expresión a una célula huésped puede realizarse de acuerdo con procedimientos convencionales, tales como la electroporación, la precipitación con fosfato de calcio y la transfección mediada por DEAE-dextrano.

Las células huésped de mamíferos apropiadas para expresar los anticuerpos, las porciones de unión al antígeno o los derivados de éstos que se proporcionan en el presente documento incluyen las células de ovario de hámster chino (células CHO) [incluyendo las células CHO dhfr-, descritas por Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, que se usan con un marcador de selección DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621]], las células de mieloma NSO, las células COS y las células SP2. En algunas formas de realización, el vector de expresión está diseñado de manera tal que la proteína expresada es secretada hacia el medio de cultivo en el que se desarrollan las células huésped. Los anticuerpos, las porciones de unión al antígeno o los derivados de éstos pueden recuperarse del medio de cultivo usando procedimientos de purificación de proteínas convencionales.

Los anticuerpos de la invención o los fragmentos de unión al antígeno de éstos pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos recombinantes de acuerdo con procedimientos bien conocidos, incluyendo, sin limitaciones, la precipitación con sulfato de amonio o con etanol, la extracción con ácido, la cromatografía con la proteína A, la cromatografía con la proteína G, la cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, la cromatografía con fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrófoba, la cromatografía por afinidad, la cromatografía con hidroxilapatita y la cromatografía con lectina. Para la purificación, también puede emplearse una cromatografía líquida de alto desempeño ("HPLC"). Véanse, por ejemplo, Colligan, Current Protocols in Immunology, o Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001), por ejemplo, los capítulos 1, 4, 6, 8, 9, 10, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Los anticuerpos de la presente invención o los fragmentos de unión al antígeno de éstos incluyen los productos purificados por medios naturales, los productos de procedimientos de síntesis química y los productos que se obtienen mediante técnicas recombinantes a partir de un huésped eucariota, incluyendo, por ejemplo, una levadura, una planta superior, un insecto o una célula de mamífero. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, el anticuerpo de la presente invención puede estar glicosilado o no glicosilado. Estos procedimientos se describen en muchos manuales de laboratorio, tales como Sambrook, anteriormente citado, en las secciones 17.37-17.42, o Ausubel, anteriormente citado, en los capítulos 10, 12, 13, 16, 18 y 20.

Entonces, un objeto de la presente invención también son las células huésped que comprenden un vector o una molécula de ácido nucleico, donde la célula huésped puede ser una célula huésped eucariota superior, tal como una

célula de mamífero, o una célula huésped eucariota inferior, tal como una célula de levadura, y también puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para usar la célula huésped para producir un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, que comprende cultivar la célula huésped en condiciones apropiadas y recuperar dicho anticuerpo.

Entonces, otro objeto de la presente invención es el anticuerpo descrito En la presente invención, que es producido por las células huésped de la presente invención y es purificado hasta alcanzar una homogeneidad de al menos el 95% en peso.

#### Endometriosis y adenomiosis (endometriosis interna)

La endometriosis es un trastorno ginecológico benigno dependiente de estrógenos que se caracteriza por la presencia de tejido endometrial (glándulas y estroma) fuera de la cavidad uterina. Las lesiones en el endometrio se hallan principalmente en el peritoneo pélvico, en los ovarios y en el septo rectovaginal (Obstet. Gynecol. Clin. North. Am. 24:235-238, 1997). La endometriosis frecuentemente está asociada a la infertilidad y a síntomas dolorosos como la dismenorrea. Además, muchos pacientes sufren enfermedades autoinmunitarias (Hum. Reprod. 17(19):2715-2724, 2002). La adenomiosis uterina, también conocida como endometriosis interna, es una subforma de la endometriosis que está restringida al útero. En el caso de la adenomiosis uterina, las glándulas endometriales invaden el miometrio y la pared del útero.

De acuerdo con la teoría del trasplante, los fragmentos del endometrio son transportados por la menstruación retrógrada hacia la cavidad peritoneal en los pacientes y en las mujeres saludables (Obstet. Gynecol. 64:151-154, 1984). A continuación se detallan los cuatro factores principales que parecen tener una participación crítica en el establecimiento exitoso de las lesiones endometriales en la cavidad pélvica de los pacientes.

a) En el caso de la fase de secreción del ciclo menstrual, las células endometriales en las mujeres saludables se tornan apoptóticas. En los pacientes, la extensión de la apoptosis en las células endometriales se reduce claramente (Fertil. Steril. 69:1042-1047, 1998). Entonces, en los pacientes hay una mayor probabilidad que en las mujeres saludables de que los fragmentos del endometrio que hayan sido transportados a la cavidad peritoneal por medio de la menstruación retrógrada no mueran y se implanten con éxito.

b) Para que tenga lugar un implante exitoso en el peritoneo y para que los fragmentos del endometrio ectópicos presenten una supervivencia a largo plazo, es necesario que se formen nuevos vasos sanguíneos (British Journal of Pharmacology, 149:133-135, 2006).

c) Muchos pacientes sufren enfermedades autoinmunitarias, por lo que presentan un sistema inmune comprometido (Hum. Reprod. 17(19): 2002, 2715-2724, 2002). A partir de esto, puede concluirse que una respuesta inmune intacta, como la que ocurre en las mujeres saludables, puede ser fundamental para la prevención del establecimiento de las lesiones endometriales.

d) Es necesario que las lesiones se desarrollen, para lo cual dependen de la presencia de estímulos mitogénicos y factores de crecimiento.

A continuación se detallan los abordajes disponibles actualmente para el tratamiento de la endometriosis.

a) Los análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) dan como resultado la supresión de la síntesis de estradiol en el ovario e inducen la atrofia de los implantes endometriales ectópicos que dependen de manera crítica de la presencia de estradiol para su crecimiento.

b) Los inhibidores de la aromatasas inhiben la producción local de estradiol por los implantes endometriales, inducen la apoptosis e inhiben la proliferación de los fragmentos ectópicos del endometrio.

c) Los moduladores selectivos del receptor de estrógeno presentan una actividad antagónica sobre el receptor de estrógeno en los implantes endometriales normales y ectópicos, lo que resulta en la atrofia del tejido endometrial ectópico implantado.

d) Los agonistas del receptor de progesterona inhiben la proliferación de las células endometriales normales y ectópicas e inducen la diferenciación y la apoptosis.

e) Los anticonceptivos orales combinados mantienen el *status quo*, previenen el progreso de la enfermedad e inducen la atrofia del endometrio ectópico y eutópico.

f) La extracción quirúrgica de las lesiones.

Los análogos de la GnRH, los SERM y los inhibidores de la aromatasas tienen efectos colaterales severos y dan como resultado calores y pérdida de hueso en las mujeres jóvenes que sufren endometriosis. El tratamiento con agonistas del receptor de progesterona da como resultado la inhibición de la ovulación, una hemorragia menstrual irregular seguida por amenorrea, ganancia de peso corporal y depresión. Debido al riesgo incrementado de tromboembolia venosa, los anticonceptivos orales combinados no están indicados para mujeres con edades mayores que 35 años, para las personas que fuman y para los individuos que sufren exceso de peso. La extracción quirúrgica de las lesiones es susceptible a tasas de recurrencia elevadas.

El anticuerpo de la presente invención interfiere con la señalización mediada por el PRLR, que es estimulada por la prolactina producida en la pituitaria y de manera local, o que también puede deberse a mutaciones de activación del PRLR, por lo que son más efectivos que los agonistas del receptor de dopamina 2, que solamente interfieren con la

secreción de prolactina en la pituitaria.

Por lo tanto un objetivo de la presente invención es el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno como se describe en la presente invención como un medicamento.

5 La PRL y el PRLR se expresan en el útero y participan en la fisiología normal del útero; la PRL puede actuar como un mitógeno potente y cumple una función de inmunomodulación. En la presente invención, se demuestra que las alteraciones en el sistema de la PRL/el PRLR es importante en la endometriosis humana. En las figuras 1 y 2 se ilustra un análisis de PCR cuantitativa Taqman de la expresión de la PRL y el PRLR en endometrio de mujeres saludables y en endometrio y lesiones de pacientes (véase el ejemplo 4).

10 Como se demuestra en la figura 1 (expresión de la PRL) y en la figura 2 (expresión del PRLR), tanto la PRL y como su receptor están regulados de una manera notablemente positiva en las lesiones del endometrio. Estos hallazgos son sorprendentes y en contraste con un estudio publicado previamente (Acta Obstet Gynecol Scand 81:5-10, 2002) que describe una ausencia casi completa de la expresión de PRLR en lesiones endometriósicas humanas.

15 Los descubrimientos de la presente invención generan por primera vez evidencias experimentales de que la señalización autocrina de la PRL cumple una función fundamental en el establecimiento, el crecimiento y el mantenimiento de las lesiones del endometrio.

20 El anticuerpo Mat3 contra el PRLR fue evaluado con éxito en un modelo de endometriosis interna en animales, es decir, la adenomiosis uterina en ratones (véase el ejemplo 5). La adenomiosis se caracteriza por el crecimiento infiltrativo de las glándulas endometriales en la capa del miometrio del endometrio. Se asemeja a una forma de la endometriosis restringida al útero, la única forma de endometriosis que puede desarrollarse en los individuos sin menstruación.

El danazol, que es efectivo en el tratamiento clínico de los pacientes que sufren endometriosis, también es efectivo en el tratamiento de la adenomiosis uterina (Life Sciences 51:1119-1125, 1992). Sin embargo, el danazol es una progestina androgénica y da como resultado efectos colaterales androgénicos severos en las mujeres jóvenes, lo que limita su uso.

25 El anticuerpo de la presente invención soluciona este problema, ya que constituye nuevos agentes para el tratamiento o la prevención de la endometriosis y presentan menos efectos colaterales que las terapias convencionales que se usan en la actualidad.

También se desvela el uso del anticuerpo Mat3 y los fragmentos de unión al antígeno que se describen En la presente invención para el tratamiento o la prevención de la endometriosis y la adenomiosis (endometriosis interna).

### 30 Enfermedad mamaria benigna y mastalgia

La enfermedad mamaria benigna abarca una variedad de síntomas, tales como la enfermedad fibroquística mamaria, el fibroadenoma, la mastalgia y los macroquistes. Entre el 30 y 50% de las mujeres premenopáusicas sufren la enfermedad fibroquística mamaria (Epidemiol. Rev. 19:310-327, 1997). Dependiendo de la edad de la mujer, la enfermedad mamaria benigna puede presentar fenotipos diferentes (J. Mammal Gland Biol. Neoplasia 10:325-335, 2005): durante las prime-ras fases de la reproducción (entre los 15 años y los 25 años), cuando ocurre el desarrollo lobular en la mama normal, la enfermedad mamaria benigna da como resultado fibroadenomas. Se observan fibroadenomas gigantes individuales y también adenomas múltiples. Estos fibroadenomas están compuestos por células del estroma y del epitelio y surgen de los lóbulos. En la fase reproductiva madura (entre los 25 años y los 40 años), la mama pasa por cambios cíclicos durante cada ciclo menstrual. Las mujeres enfermas se caracterizan por una mastalgia cíclica y por diversos nódulos en sus mamas. Más tarde (entre los 35 años y los 55 años de edad), la mama normal involuciona, pero en la mama enferma se observan macroquistes e hiperplasia epitelial, con atipia o sin ella. Las formas de la enfermedad mamaria benigna que están acompañadas por una proliferación incrementada de las células epiteliales se caracterizan por un mayor riesgo de desarrollar carcinomas mamarios. Este riesgo puede ser de hasta 11% si hay atipias celulares presentes en la fracción de las células en proliferación (Zentralbl Gynäkol 119:54-58,1997). 25% de las mujeres con edades de 60–80 años también sufren la enfermedad mamaria benigna. Frecuentemente, la terapia de reemplazo del estrógeno o la adiposidad son las razones de la persistencia de la enfermedad mamaria benigna después de la menopausia (Am. J. Obstet. Gynecol. 154:161-179, 1986).

La patofisiología de la enfermedad fibroquística mamaria está determinada por la predominancia del estrógeno y la deficiencia de progesterona, lo que da como resultado una hiperproliferación en los tejidos conectivos (una fibrosis), a lo que sigue una proliferación facultativa de las células epiteliales. Como ya se mencionó, el riesgo de desarrollar un cáncer de mama es elevado en los pacientes que presentan una proliferación incrementada de las células epiteliales en los focos fibroquísticos. La enfermedad fibroquística mamaria se caracteriza por dolor y sensibilidad en las mamas. 70% de los pacientes que sufren la enfermedad fibroquística mamaria también sufren insuficiencias en el cuerpo lúteo o anovulación (Am. J. Obstet. 154:161-179,1986). Las insuficiencias en el cuerpo lúteo dan como resultado los niveles reducidos de progesterona y la predominancia del estrógeno.

La mastalgia (el dolor en las mamas) afecta a aproximadamente 70% de las mujeres en algún momento de su vida reproductiva. El dolor en las mamas puede estar asociado o no a otros criterios del síndrome premenstrual. Se ha demostrado que las mujeres que sufren mastalgia responden con una liberación excesiva de prolactina después de la estimulación del eje del hipotálamo y la pituitaria (Clin. Endocrinol. 23:699-704,1985).

A continuación se detallan las terapias convencionales para la enfermedad mamaria benigna y la mastalgia.

1) Bromocriptina

Como agonista de la dopamina, la bromocriptina solamente bloquea la síntesis de prolactina en la pituitaria, pero no la síntesis local de prolactina en las células del epitelio mamario. Por lo tanto, solamente es efectiva en aquellas formas de la mastalgia y la enfermedad mamaria benigna que se deben a niveles elevados de prolactina a nivel sistémico. Los efectos colaterales más importantes de la bromocriptina son:

Las náuseas, los vómitos, el edema, la hipotensión, los mareos, la pérdida de cabello, las cefaleas y las alucinaciones.

2) Danazol

El danazol es una progestina androgénica que, a través de su actividad antigonadotrófica, contrarresta la predominancia del estrógeno que se observa en la enfermedad mamaria benigna. Sus efectos colaterales más importantes son las irregularidades menstruales, la depresión, el acné, el hirsutismo, la adquisición de un tono grave en la voz y los calores, así como la ganancia de peso.

3) Tamoxifeno

El tamoxifeno es un modulador selectivo del receptor de estrógeno que presenta actividad antiestrogénica en las mamas y actividad estrogénica en el útero. Sus efectos colaterales más importantes incluyen:

Síntomas posmenopáusicos como la pérdida de hueso y los calores, los quistes ováricos y el carcinoma endometrial.

4) Progestinas

Las progestinas inhiben la enfermedad mamaria benigna a través de la supresión del eje de la pituitaria y las gónadas, la inhibición de la ovulación y la eliminación del estrógeno. La eliminación del estrógeno da como resultado síntomas menopáusicos como la pérdida de hueso y los calores.

5) Dosis reducidas de anticonceptivos orales combinados

Este tratamiento no está indicado para las mujeres con edades superiores a 35 años, para las mujeres fumadoras o para los pacientes diabéticos y con sobrepeso.

En general, se ha descubierto que los niveles de prolactina están incrementados en un tercio de las mujeres que sufren la enfermedad mamaria benigna. Como los estrógenos incrementan la secreción de prolactina en la pituitaria, se cree que el incremento en los niveles de prolactina en el suero es una consecuencia de la predominancia de los estrógenos en esta enfermedad. Se ha informado que frecuentemente hay una mutación de activación del PRLR en las mujeres que sufren múltiples adenomas de mama, lo que es similar a un subtipo de la enfermedad fibroquística mamaria (Paul Kelly, Breast Congress, Turín, 2007, y Proc. Natl. Acad. Sci. 105:14533-14538;2008).

La enfermedad mamaria benigna, la mastalgia y la tensión mamaria premenstrual tienen un mecanismo patofisiológico en común: la señalización incrementada de la prolactina. La señalización incrementada de la prolactina puede ser una consecuencia de los siguientes factores:

- una hiperprolactinemia sistémica (debida a un adenoma en la pituitaria),
- una hiperprolactinemia local (debida a la síntesis de prolactina en las células en proliferación en el epitelio de la glándula mamaria), que no se traduce en niveles elevados de prolactina en la sangre,
- una señalización constitutivamente activa del PRLR en presencia de niveles normales de prolactina (debida a una mutación de activación del PRLR).

Como determinadas formas de la enfermedad mamaria benigna pueden dar lugar a un cáncer de mama, hay una necesidad médica relacionada con el tratamiento de esta enfermedad.

Para demostrar la eficacia del anticuerpo Mat3 neutralizador contra el PRLR en un modelo preclínico de la enfermedad mamaria benigna, se empleó un modelo de la hiperprolactinemia sistémica basado en ratones. Se sometieron ratones Balb/c adultos a isoinjertos de pituitaria bajo la cápsula del riñón como se describe en el ejemplo 16 (véase Methods in Mammal Gland Biology and Breast Cancer Research, 101–107,2000). En el modelo ratón de la presente invención para la enfermedad de mama benigna, no se ha usado un carcinógeno tal como DMBA; los ratones sólo fueron trasplantados con glándulas pituitarias con el objetivo de estudiar las consecuencias de la aplicación de anticuerpo Mat3 en la proliferación mejorada de células epiteliales benignas. En un estudio previo los animales isoinjertados de pituitaria se trataron además con el carcinógeno DMBA y se analizaron los efectos de un anticuerpo monoclonal diferente contra PRLR anticuerpo en el desarrollo de cáncer de mama (Am J Pathol 133:589-595,1988). Estos anticuerpos fueron eficaces para tratar el cáncer de mama, sin embargo no se analizaron los efectos en la enfermedad de mama benigna (Am J Pathol 133:589-595,1988).

En el modelo de la presente invención, la hiperprolactinemia sistémica provocó una proliferación aumentada de las células en la glándula mamaria, y desarrollo estimulado de ramificación lateral y lobuloalveolar en comparación con

ratones control vírgenes no tratados. Como se describe en el ejemplo 6, el anticuerpo neutralizador Mat3 contra PRLR se ensayó en este modelo de ratón Balb/c en comparación con un anticuerpo inespecífico respecto a su habilidad para:

- 5       ▪ bloquear el desarrollo de ramificación lateral y lobuloalveolar
- inhibir la proliferación de células epiteliales mamarias
- inhibir la expresión del gen blanco de prolactina elf5

El anticuerpo neutralizador Mat3 contra PRLR inhibió la ramificación lateral (Figura 3A) y la expresión del gen blanco de prolactina elf5 (Figura 3B).

10 También se desvela el uso del anticuerpo Mat3 y fragmentos de unión a antígeno como se describe en la presente invención para el tratamiento de enfermedad de mama benigno y mastalgia en mujeres pre y postmenopáusicas.

Otras indicaciones que se benefician del bloqueo de la señalización mediada por PRLR por el anticuerpo Mat3:

Anticonceptivos femeninos no hormonales:

Las estrategias actuales para la anticoncepción femenina son las siguientes:

- 15       a) Anticonceptivos orales combinados que contienen estrógenos y progestinas.  
 Los componentes progestogénicos median los efectos anticonceptivos por medio de una retroalimentación negativa en el eje hipotalámico-pituitario-gonadal. El componente estrogénico asegura un buen control del sangrado y potencia la acción gestagénica por medio de la inducción del receptor de progesterona en células blanco.
- 20       b) Dispositivos intrauterinos que contienen progestinas solamente.  
 La progestina liberada localmente pone al endometrio en un estado resistente a la implantación. Adicionalmente, el moco cervical se vuelve casi impermeable a las células espermáticas.
- c) Píldoras sólo de progestina e implantes.  
 La progestina inhibe la ovulación por medio de una retroalimentación negativa en el eje hipotalámico-pituitario-gonadal. Adicionalmente la permeabilidad del moco cervical a células espermáticas está reducida.
- 25       d) Anillos vaginales que contienen etinilestradiol más progestinas.

El efecto secundario principal de anticonceptivos orales combinados es el riesgo elevado de tromboembolismos venoso (VTE). Adicionalmente, las mujeres con sobrepeso o que fuman, así como mujeres que padecen de enfermedades autoinmunitarias tal como lupus y mujeres mayores de 35 años no pueden usar anticonceptivos combinados orales.

30 Los dispositivos intrauterinos e implantes que contienen progestinas sólo pueden llevar a un sangrado uterino disfuncional.

Las píldoras de progestina sola pueden provocar patrones irregulares de sangrado, manchas de sangre, amenorrea. El riesgo de embarazos ectópicos aumenta. El aumento y reducción de peso en la densidad de masa ósea son efectos secundarios adicionales.

35 Los anillos vaginales pueden llevar a vaginitis, leucorrea o expulsión.

Los ratones deficientes de PRLR han sido generados unos años atrás (Genes Dev 11:167-178, 1997). Interesantemente, los ratones hembras deficientes de PRLR, pero no los machos, son completamente estériles. Las hembras PRLR<sup>-/-</sup> muestran una detención del desarrollo del óvulo inmediatamente luego de la fertilización, es decir que muestran una detención del desarrollo preimplantación si bien la ovulación fue normal. Sólo unos pocos ovocitos alcanzaron el estadio de blastocisto y no tuvieron la capacidad de implantarse en hembras mutantes pero se desarrollaron a embriones normales en madres adoptivas de tipo salvaje luego de la implantación. El fenotipo de infertilidad de los ratones deficientes de PRLR pudo ser rescatado hasta la preñez a medio término por suplemento de progesterona. Obviamente, la señalización mediada por PRLR tiene un rol importante en el mantenimiento y función del cuerpo lúteo que produce progesterona que es necesaria para permitir y mantener la preñez.

40 Adicionalmente las hembras deficientes de PRLR, pero no los machos, mostraron una reducción en el peso corporal asociado con una reducción en la masa de grasa abdominal y niveles de leptina.

Hasta la fecha, no se conoce ninguna mutación de PRLR humana inactivante, por lo tanto el rol preciso de la señalización mediada por PRLR en la fertilidad humana aún es desconocida. Sin embargo, hay evidencia en aumento que en los humanos también se requiere un nivel de prolactina mínimo para permitir el embarazo exitoso.

50 Los pacientes que padecen de infertilidad primaria debido a insuficiencia del cuerpo lúteo hiperprolactinémica fueron tratados con bromocriptina. En algunos casos, los niveles de prolactina fueron disminuidos y las fases luteales acortadas reaparecieron nuevamente (Bohnet HG y col. in Lisuride and other dopamine agonists editado por D.B. Calne y col, Raven Press, Nueva York, 1983). A partir de estos datos se concluyó que los estados de hiper e hipoprolactinemia interfieren negativamente con la fertilidad femenina. Esto puede ser explicado por la interacción de PRL con su receptor. En el caso de niveles bajos de prolactina, no hay activación suficiente del receptor, mientras que en el caso de la hiperprolactinemia, tampoco hay activación suficiente del receptor, ya que todos los receptores están bloqueados por una molécula de prolactina y no se pueden dimerizar más. En otras palabras, la respuesta a dosis para prolactina tiene forma de campana y la activación óptima del receptor se logra sólo en un cierto rango de concentración. Hay evidencia de un segundo estudio que la carencia de expresión de prolactina endometrial en

55

pacientes lleva a una falla de implantación temprana (Human Reprod. 19:1911-1916, 2004). Sin embargo, se ha mostrado que la prolactina *ex vivo* puede prevenir la apoptosis de células granulosas humanas cultivadas y por lo tanto mantiene la función temprana del cuerpo lúteo como ha sido demostrado en ratones deficientes de PRLR (Human Reprod. 18:2672-2677,2003).

5 En comparación con las estrategias mencionadas anteriormente, la anticoncepción femenina con anticuerpos neutralizadores de PRLR tiene varias ventajas:

- los anticuerpos pueden ser usados en mujeres fumadoras, con sobrepeso, y mayores así como en mujeres que padecen de lupus eritematoso (los anticuerpos contra PRLR pueden incluso ser beneficioso para el tratamiento del lupus y la reducción de grasa abdominal, es decir que los ratones deficientes de PRLR tuvieron menos grasa abdominal).
- los anticuerpos contra PRLR no elevaron el riesgo de VTE (tromboembolismo venoso).
- al contrario de los estrógenos y progestinas usadas en la anticoncepción oral combinada, la neutralización de la señalización mediada por PRLR lleva a la inhibición de la proliferación del epitelio mamario y al contrario de las estrategias hormonales para el control de la fertilidad podría incluso proteger a los usuarios del cáncer de mama.

15 Otro objeto de la presente invención es el uso del anticuerpo Mat3 para la anticoncepción femenina con efectos secundarios reducidos en comparación con los tratamientos estándares.

#### Inhibición de la lactancia

La prolactina es la hormona principal relacionada con la lactancia después del nacimiento del niño. Esto se ve reflejado en el fenotipo de los ratones con deficiencias en el PRLR. Incluso los ratones heterocigotos presentan problemas severos en la lactancia, por lo que son completamente incapaces de amamantar su descendencia (Frontiers in Neuroendocrinology 22:140-145, 2001).

Las mujeres pueden verse obligadas a interrumpir la lactancia debido a muchas razones. Algunas de ellas incluyen los regímenes con drogas que podrían ser potencialmente peligrosas para el lactante, las infecciones serias (la mastitis, la nefritis), las hemorragias posparto profusas y las enfermedades maternas severas, por ejemplo, la diabetes, los carcinomas y la debilidad, o las enfermedades de los neonatos. En la actualidad, se usan agonistas del receptor de dopamina como la bromocriptina y el lisuride para inhibir la lactancia después del nacimiento. Sin embargo, estos compuestos pueden provocar efectos colaterales severos, tales como náuseas, vómitos, edema, hipotensión, mareos, pérdida de cabello, cefaleas y alucinaciones. Además, los agonistas del receptor de dopamina no están indicados para las mujeres que sufren enfermedades cardiovasculares o hipertensión. Otra desventaja de la bromocriptina es su vida media breve, por lo cual es necesario ingerirla 4-6 veces al día durante un período de 14 días.

Por lo tanto, los inventores esperan que los anticuerpos neutralizadores de PRLR sean adecuados para la inhibición de la lactancia. En una publicación anterior un antisuero generado contra PRLR parcialmente purificado se dio a ratas lactantes. Se especuló que el antisuero llevara a la inhibición de la lactancia ya que hubo una disminución pequeña en el peso de las lechigadas (Endocrinology 102:1657-1661,1978). Sin embargo los autores no pudieron excluir que incluso otros mecanismos podrían haber llevado a una reducción leve en el peso de la lechigada. Adicionalmente observaron que el antisuero provocó un aumento en el cuerpo lúteo de las ratas tratadas (Endocrinology 102:1657-1661,1978). Esta observación está en claro con-traste con el fenotipo de ratones deficientes de PRLR (Genes Dev 11:167-178, 1997) en los cuales la ovulación no se alteró y en los cuales no se observó aumento en el cuerpo lúteo. Probablemente el antisuero empleado bloqueó algunas moléculas desconocidas adicionales.

También se desvela el uso del anticuerpo Mat3 para la inhibición de la lactancia.

#### Hiperplasia benigna de próstata

La hiperplasia benigna de próstata (HBP) es la cuarta afección de la salud más prevalente en los hombres de edad. El agrandamiento de la próstata es una afección progresiva que afecta a más de 50% de los hombres con edades superiores a 50 años. La HBP se caracteriza por la hiperplasia del estroma y las células epiteliales de la próstata, lo que resulta en la formación de grandes nódulos discretos en la región periuretral de la próstata, que comprime el canal uretral. Por consiguiente, la interrupción del flujo de orina es una consecuencia importante de la HBP.

A continuación se detallan las terapias convencionales para la HBP.

- a) Los antagonistas del receptor adrenérgico  $\alpha_1$  (por ejemplo la tamsulosina, la alfuzosina, la terazosina, la doxazosina) alivian los síntomas de la HBP en el tracto urinario inferior. Disminuyen las obstrucciones a la salida de la vejiga al bloquear la estimulación del músculo liso de la próstata mediada por los receptores alfa. Los efectos colaterales más importantes incluyen efectos adversos relacionados con la vasodilatación, mareos e insuficiencias en la eyaculación.
- b) Los inhibidores de la 5 $\alpha$ -reductasa (por ejemplo, el finasteride) previenen la formación de dihidrotestosterona, la forma activa de la testosterona en la próstata, que es responsable del agrandamiento de la próstata. Los efectos colaterales más importantes incluyen las disfunciones sexuales, tales como los trastornos eréctiles y la

libido disminuida.

c) La resección transuretral de la próstata (TURP) es un tratamiento quirúrgico que está asociado a una morbilidad elevada. Los efectos colaterales incluyen las hemorragias, la incontinencia, la formación de obstrucciones, la pérdida de eyaculación y las perforaciones en la vejiga.

5 d) La colocación de stents en la próstata. Se inserta un stent en la parte prostática de la uretra para garantizar un flujo apropiado de orina. Los efectos colaterales más importantes incluyen las incrustaciones, las infecciones en el tracto urinario y la migración del stent. Más aún, es necesario retirar los stents antes de realizar cualquier manipulación transuretral.

10 Como se describió para la glándula mamaria, la PRL y el PRLR actúan en una vía autocrina/paracrina (J. Clin. Invest. 99:618 pp. 1997) en la próstata.

15 En estudios clínicos, se ha demostrado que la hiperprolactinemia (y la acromegalia) está asociada al agrandamiento de la próstata y a la acumulación de células inflamadas en el estroma. La hormona de crecimiento humana puede unirse al PRLR humano en presencia de cinc, con lo que podría explicarse por qué la acromegalia puede dar como resultado una hiperplasia benigna de próstata. Los niveles de PRL en el suero frecuentemente son elevados en los

20 Los animales transgénicos donde se sobreexpresa el gen de la PRL de manera ubicua desarrollan una hiperplasia severa en el estroma de la próstata, lo que refleja que la PRL es un factor patofisiológico importante para el desarrollo de la hiperplasia prostática (Endocrinology 138:4410 pp. 1997). Además, la sobreexpresión local de la prolactina en los ratones transgénicos bajo el control del promotor de la probasina específico de la próstata da como resultado una expansión del estroma, una acumulación de células inflamatorias y una displasia epitelial focal, que son las características básicas de la HBP en los seres humanos (Endocrinology 144:2269 pp. 2003).

También se desvela el uso del anticuerpo Mat3 o fragmentos de unión a antígeno como se describe en la presente invención para el tratamiento de hiperplasia benigna de próstata.

#### Terapia hormonal combinada

25 Para el tratamiento de sofocos en mujeres postmenopáusicas que aún tienen útero, se usaron combinaciones de estrógeno (estradiol, o estrógeno equino conjugado = CEE) y progestinas (por ejemplo acetato de medroxiprogesterona (MPA), progesterona, drospirenona, levonorgestrel). Las progestinas tienen que ser agregadas para inhibir la proliferación de células epiteliales uterinas activadas por estradiol. Sin embargo, el agregado de progestinas aumenta la proliferación de células epiteliales mamarias. Debido a que ambas, células normales así

30 como células cancerosas de epitelio mamario responden con proliferación al tratamiento combinado de estrógeno más progestina, se encontró aumentado el riesgo relativo de cáncer de mama luego del tratamiento con CEE más MPA (JAMA 233:321-333;2002).

35 El anticuerpo de la presente invención resuelve el problema para tratar la proliferación potenciada de células epiteliales de mama observada durante la terapia combinada de hormonas. También se desvela el uso del anticuerpo neutralizador Mat3 contra PRLR o fragmentos de unión a antígeno en terapia combinada de hormonas (es decir terapia de estrógeno + progestina) para inhibir la proliferación de células de epitelio mamario.

#### Pérdida de cabello

40 El tratamiento para la pérdida de cabello aún es una necesidad no satisfecha. Crecimiento del cabello en el cuero cabelludo en ciclos: la fase anágena se caracteriza por crecimiento activo del cabello; la fase catágena muestra involución y es seguida por la fase telógena (reposo). La fase exógena (la liberación del cabello muerto) coincide con el fin de la fase telógena. La pérdida de cabello puede ser la consecuencia de un crecimiento alterado del cabello en cualquier fase.

45 La pérdida de cabello telogénica puede tener diversos desencadenantes (el estrés fisiológico y emocional, las afecciones médicas, las deficiencias de hierro y de cinc). Vale destacar que, en sus primeras etapas, la alopecia androgénica se caracteriza por una pérdida de cabello telogénica (Cleveland clinic journal of medicine 2009; 76:361-367). La pérdida de cabello anagénica frecuentemente es la consecuencia de la radiación o de la quimioterapia.

50 Para el tratamiento de la pérdida de cabello androgénica, suele usarse minoxidil y finasteride. Para la alopecia areata, suelen usarse glucocorticoides. En general, todos estos tratamientos tienen efectos colaterales (finasteride: pérdida de libido e impotencia en los hombres, glucocorticoides: diabetes, ganancia de peso, osteoporosis), por lo que todavía no ha sido posible solucionar completamente el problema de la pérdida de cabello.

55 Se han realizado experimentos de afeitado en roedores adultos para analizar el efecto de los compuestos sobre la pérdida de cabello, mediante el uso del crecimiento de nuevo cabello en el área afeitada como paradigma de lectura (British Journal of dermatology 2008; 159:300-305). El afeitado de los animales adultos (cuyo cabello suele hallarse en la fase telogénica) induce la fase anagénica, que se caracteriza por el crecimiento del cabello.

Se ha encontrado que la prolactina y el PRLR se expresan en los folículos pilosos. De los datos de expresión se sugirió que la interferencia con la señalización mediada por PRLR podría ser útil contra la pérdida de cabello, pero no mostraron datos funcionales para probar esta hipótesis (Aktuelle Dermatologie 31:109-116,2005).

60 El anticuerpo de la presente invención resuelve el problema de proporcionar nuevos tratamientos para la pérdida de cabello hiper y normoprolactinémica en mujeres y hombres.

Por lo tanto otro aspecto de la presente invención es emplear el anticuerpo Mat3 o fragmentos de unión a antígeno para el tratamiento o prevención de pérdida de cabello hiper y normoprolactinémica.

Tratamiento y prevención del cáncer de mama resistente a antiestrógenos

5 Se ha sugerido que el PRLR se sobreexpresa en cáncer de mama en humanos (J Clin Endocrinol Metab 83:667-674,1998) y que la interferencia negativa con la interacción PRL-PRLR podría tener un impacto positivo en el tratamiento de cáncer de mama (Int. J. Cancer: 55(5): 712-721, 1993). Existe evidencia, que en general, los niveles de prolactina en plasma se correlacionan con el riesgo de cáncer de mama (Cancer Lett 243:160-169,2006). En pacientes con cáncer de mama resistente a tamoxifeno, el desarrollo de la enfermedad progresiva se correlaciona con los niveles prolactina en plasma (Eur J Surg Oncol 20:118-121,1994). Los ratones transgénicos que sobreexpresan prolactina son más propensos al desarrollo de cáncer de mama (J Clin Invest 100:2744-2751,1997).

También se desvela el uso del anticuerpo Mat3 o fragmentos de unión a antígeno como se describe en la presente invención para el tratamiento o prevención de cáncer de mama resistente a antiestrógenos.

**DEFINICIONES**

15 El antígeno diana, el "PRLR" humano, Tal como se usa en el presente documento, hace referencia a un polipéptido humano que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos en su dominio extracelular que los aminoácidos entre las posiciones 1 y 210 de SEQ ID NO: 12 y las variantes alélicas y/o de separación naturales de ésta. El "ECD del PRLR", Tal como se usa en el presente documento, hace referencia a la porción extracelular del de PRLR que está representada por los aminoácidos mencionados con anterioridad. Además, el PRLR humano blanco también abarca las versiones mutadas del receptor, tales como la mutación de activación I146L, descrita por Paul Kelly (Proc Natl Acad Sci USA, 105(38):14533-14538,2008; y una comunicación oral, Turín, 2007).

20 El antígeno diana, "PRLR" de mono, como se usa en el presente documento hace referencia a un polipéptido de macaco así como de mono cangrejero que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos en su dominio extracelular que las posiciones de aminoácidos entre 1 y 210 de SEQ ID NO. 11 y las variantes alélicas y/o de corte y empalme de origen natural de las mismas. El "ECD de PRLR" como se usa en el presente documento hace referencia a la porción extracelular de PRLR representado por los aminoácidos mencionados anteriormente.

25 El antígeno diana murino o de ratón "PRLR" como se usa en el presente documento hace referencia a un polipéptido murino que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos en su dominio extracelular que las posiciones de aminoácidos entre 1 y 210 de SEQ ID NO. 13 y las variantes alélicas y/o de corte y empalme de origen natural de las mismas. El "ECD de PRLR" como se usa en el presente documento hace referencia a la porción extracelular de PRLR representado por los aminoácidos mencionados anteriormente.

30 Tal como se usa en el presente documento, la frase "cantidad eficaz para el uso terapéutico" hace referencia a una cantidad de un anticuerpo terapéutico o profiláctico que sería apropiada para provocar el efecto o la respuesta terapéutica o profiláctica deseada, lo que incluye el alivio de algunos o la totalidad de los síntomas de la enfermedad o la reducción de la predisposición a la enfermedad, cuando se la administra de acuerdo con el régimen de tratamiento deseado.

35 Tal como se usa en el presente documento, se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un antígeno (en este caso, el PRLR), que "presenta especificidad" por él o que lo "reconoce específicamente" cuando dicho anticuerpo es capaz de discriminar entre dicho antígeno y uno o más antígenos de referencia, ya que la especificidad de la unión no es una propiedad absoluta, sino relativa. En su forma más general (y cuando no se menciona una referencia definida), la "unión específica" hace referencia a la capacidad del anticuerpo de discriminar entre el antígeno de interés y un antígeno no relacionado, lo cual puede determinarse, por ejemplo, de acuerdo con uno de los procedimientos que se describen a continuación. Los procedimientos comprenden, sin limitaciones, las transferencias Western, las pruebas de ELISA, RIA, ECL e IRMA y los análisis de péptidos. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo de ELISA convencional. La calificación puede llevarse a cabo mediante el desarrollo de color (por ejemplo, con un anticuerpo secundario con peroxidasa de rábano con picante y tetrametil benzidina con peróxido de hidrógeno). La reacción en determinadas cavidades se califica en función de la densidad óptica, por ejemplo, a 450 nm. El valor de fondo típico (que equivale a la reacción negativa) puede ser de 0,1 OD. Una reacción positiva típica puede ser de 1 OD. Esto implica que la diferencia entre el positivo y el negativo puede ser de más de 10 veces. Típicamente, la determinación de la especificidad de la unión se efectúa usando no solamente un antígeno de referencia, sino más bien un conjunto de aproximadamente tres a cinco antígenos no relacionados, tales como la leche en polvo, la BSA, la transferrina o semejantes. Además, la "unión específica" también puede hacer referencia a la capacidad de un anticuerpo de discriminar entre el antígeno diana y uno o más antígenos relacionados estrechamente, los cuales se usan como puntos de referencia. Adicionalmente, la "unión específica" puede estar relacionada con la capacidad de un anticuerpo de discriminar entre distintas partes de su antígeno diana, por ejemplo, distintos dominios, subdominios o regiones del PRLR, tales como los epitopos en la región del extremo N o el extremo C del ECD del PRLR, o entre uno o más restos de aminoácidos o extensiones de restos de aminoácidos fundamentales del ECD del PRLR.

La  $K_D$  de la "afinidad" o de la "afinidad de unión" frecuentemente se determina midiendo la constante de asociación en equilibrio ( $k_a$ ) y la constante de disociación en equilibrio ( $k_d$ ) y calculando el cociente entre la  $k_d$  y la  $k_a$  ( $K_D =$

kd/ka). Los términos "inmunespecífico" y "caracterizado por una unión específica" denotan que el anticuerpo se une al PRLR o a su ECD con una  $K_D$  de afinidad menor o igual que  $10^{-6}$  M (una afinidad monovalente). El término "afinidad elevada" denota que la  $K_D$  de afinidad con la que se une el anticuerpo al PRLR o a su ECD con es menor o igual que  $10^{-7}$  M (una afinidad monovalente). El anticuerpo puede presentar una afinidad sustancialmente mayor por el antígeno diana que por otras moléculas no relacionadas. El anticuerpo también puede presentar una afinidad sustancialmente mayor por el antígeno diana que por sus homólogos, por ejemplo, una afinidad relativa al menos 1,5 veces, 2 veces, 5 veces 10 veces, 100 veces,  $10^3$  veces,  $10^4$  veces,  $10^5$  veces,  $10^6$  veces mayor por el antígeno diana, o incluso mayor. Estas afinidades pueden ser determinadas con facilidad usando técnicas convencionales, tales como la diálisis en equilibrio, con el instrumento BIAcore 2000, de acuerdo con los procedimientos generales provistos por el fabricante, con un radioinmunoensayo, usando un antígeno diana radiomarcado, o con otro procedimiento conocido por aquellos versados en la técnica. Los datos de la afinidad pueden analizarse, por ejemplo, con el procedimiento de Scatchard y *col.*, Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949).

Tal como se usa en el presente documento, la frase "los anticuerpos antagonizan la señalización mediada por la prolactina" hace referencia a un bloqueo de la activación del receptor de prolactina por los anticuerpos de la presente invención, lo que da como resultado una inhibición completa de la señalización mediada por el receptor de prolactina.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "los anticuerpos compiten por la unión" hace referencia a una competición de un anticuerpo con un segundo ligando por la unión al receptor de prolactina.

El término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio e incluye los anticuerpos completamente ensamblados, los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos), los fragmentos de anticuerpos que pueden unirse al antígeno (por ejemplo, los fragmentos Fab', F'(ab)2 o Fv, los anticuerpos de cadena simple, los diacuerpos), los cuerpos de camello y los péptidos recombinantes que abarcan los anteriores, con la condición de que presenten la actividad biológica deseada. Los anticuerpos pueden presentar distintos dominios constantes (dominios Fc) en su cadena pesada, que preferentemente derivan de los isotipos IgG1, IgG2 o IgG4 (véase la descripción más adelante). Pueden introducirse mutaciones para modificar las funciones efectoras. Se han identificado restos de aminoácidos en el dominio Fc que cumplen una función dominante en las interacciones entre la proteína complementaria C1q y los receptores Fc, y se han descrito mutaciones que influyen en las funciones efectoras (para hallar una revisión, véase Labrijn y *col.*, Current opinion in Immunology 20:479-485, 2008). En particular, es posible realizar la aglicoilación de IgG1 por medio de una mutación de asparagina en alanina o de asparagina en glutamina en el aminoácido en la posición 297. Se ha informado que esta mutación anula la citotoxicidad mediada por células (ADCC) derivada del anticuerpo (Sazinsky y *col.*, Proc. Nat. Acad. Sci. 105 (51): 20169, 2008; Simmons y *col.*, J. of Immunological Methods 263:133-147, 2002). El reemplazo de lisina por alanina en la posición 322 da como resultado una reducción en la ADCC y la remoción de la citotoxicidad derivada del complemento (CDC), mientras que el reemplazo simultáneo de dos leucinas en las posiciones 234 y 235 por alaninas permite evitar la ADCC y la CDC [Hezareh y *col.*, J. of Virology, 75 (24):12161-12168, 2001]. Con el objeto de aplicar isotipos IgG4 como agentes terapéuticos bivalentes *in vivo* que retengan la avidéz, podrá introducirse una modificación en forma de un intercambio de serina por prolina en la "región de la bisagra principal" (Schuurman, J. y *col.* Immunology 97:693-698, 1999). La tendencia de las moléculas de IgG2 humanas a formar dímeros covalentes heterogéneos puede evitarse cambiando una de las cisteínas en las posiciones 127, 232 y 233 por serina (Allen y *col.*, Biochemistry, 2009, 48 (17), pp. 3755-3766). Un formato alternativo con una función efectora reducida puede ser el formato IgG2m4, que deriva de una IgG2 que contiene cuatro cambios por restos de aminoácidos específicos de la IgG4 (An y *col.*, mAbs 1(6), 2009). Es posible producir fragmentos de anticuerpos con técnicas de ADN recombinante o mediante la escisión enzimática o química de los anticuerpos intactos, lo cual se describirá con mayor detalle más adelante. Los ejemplos no limitativos de anticuerpos monoclonales incluyen los anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados y humanos, así como las inmunoglobulinas humanas modificadas, las proteínas de fusión quiméricas que tienen secuencias derivadas de inmunoglobulinas, las muteínas o los derivados de éstas, cada uno de los cuales se describirá con mayor detalle más adelante. También se contemplan los multímeros o los agregados de moléculas intactas y de fragmentos de éstas, incluyendo los anticuerpos modificados por medios químicos.

El término "anticuerpo monoclonal", Tal como se usa en el presente documento, hace referencia a un anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, una población de anticuerpos individuales que son idénticos, excepto por las posibles mutaciones naturales que pudiera haber presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y están dirigidos contra un solo sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales), que típicamente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra determinantes (epítotos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque son sintetizados en un cultivo homogéneo, es decir, no están contaminados con otras inmunoglobulinas, que podrían tener especificidades y características diferentes.

El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo: se lo ha obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos y no debe entenderse que restrinja la producción del anticuerpo a un procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que pueden usarse pueden elaborarse con el procedimiento de los hibridomas, que fue descrito por primera vez por Kohler y *col.*, Nature, 256:495, 1975, o pueden elaborarse

con procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden ser, por ejemplo, anticuerpos recombinantes, quiméricos, humanizados o humanos modificados, así como fragmentos de anticuerpos.

Una "inmunoglobulina" o un "anticuerpo nativo" hacen referencia a una glicoproteína tetramérica. En una inmunoglobulina natural, cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, donde cada par tiene una cadena "liviana" (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La porción del extremo amino de cada cadena incluye una región "variable" de aproximadamente entre 100 y 110 aminoácidos, o más, que es la responsable primaria del reconocimiento del antígeno. La porción del extremo carboxilo de cada cadena define una región constante que es la responsable primaria de la función efectora. Las inmunoglobulinas pueden separarse en distintas clases en función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas. Las cadenas pesadas se clasifican como mu ( $\mu$ ), delta ( $\Delta$ ), gamma ( $\gamma$ ), alfa ( $\alpha$ ) y épsilon ( $\epsilon$ ) y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Además, varias de éstas pueden ser divididas en subclases o isotipos, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los distintos isotipos pueden tener funciones efectoras diferentes; por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 frecuentemente presentan actividad de ADCC. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ). Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J", de aproximadamente 12 aminoácidos o más, donde la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos o más. Véase en general *Fundamental Immunology*, capítulo 7 (Paul, W., editor, 2ª edición, Raven Press, N.Y. (1989)).

Un "fragmento funcional" o un "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo/una inmunoglobulina se definen en el presente documento como un fragmento de anticuerpo/inmunoglobulina (por ejemplo, una región variable de una IgG) que retiene la región de unión al antígeno. La "región de unión al antígeno" de un anticuerpo típicamente se halla en una o más de las regiones hipervariables del anticuerpo, es decir, las regiones CDR 1, 2 y/o 3. Sin embargo, las regiones variables "del marco" también pueden cumplir una función importante en la unión al antígeno, por ejemplo, al proporcionar un andamiaje para las CDR. Preferentemente, la "región de unión al antígeno" comprende al menos los restos de aminoácidos 4 a 103 de la cadena ligera variable (VL) y los restos de aminoácidos 5 a 109 de la cadena pesada variable (VH), más preferentemente los restos de aminoácidos 3 a 107 de la VL y los restos de aminoácidos 4 a 111 de la VH, y en particular, particularmente las cadenas VL y VH completas [los aminoácidos en las posiciones 1-109 de la VL y en las posiciones 1-113 de la VH; la numeración de las posiciones de los aminoácidos se realiza de acuerdo con la base de datos de Kabat (Johnson y Wu, *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28, 214-218)]. Una clase preferida de inmunoglobulinas que pueden usarse En la presente invención es la de la IgG.

El término "región hipervariable" hace referencia a los restos de aminoácidos de los dominios variables VH y VL de un anticuerpo o de un fragmento funcional de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende los restos de aminoácidos de la "región determinante de la complementariedad" o CDR [es decir, los restos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 88-97 (LCDR3) en el dominio variable de la cadena ligera y los restos 29-36 (HCDR1), 48-66 (HCDR2) y 93-102 (HCDR3) en el dominio variable de la cadena pesada, como se ilustra en la figura 12] y/o los restos de un bucle hipervariable [es decir, los restos 26-32 (dentro de LCDR1), 50-52 (dentro de LCDR2) y 91-96 (dentro de LCDR3) en el dominio variable de la cadena ligera y los restos 26-32 (dentro de HCDR1), 53-55 (dentro de HCDR2) y 96-101 (dentro de HCDR3) en el dominio variable de la cadena pesada, como se describe en Chotia y *col.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)].

Los ejemplos no limitativos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, los dominios de anticuerpos (dAb), los fragmentos de las regiones de determinación de la complementariedad (CDR), los anticuerpos de cadena simple (scFv), los fragmentos de anticuerpos de cadena simple, los diacuerpos, los triacuerpos, los tetracuerpos, los minicuerpos, los anticuerpos lineales (Zapata y *col.*, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995)), los anticuerpos recombinantes quelantes, los tricuerpos, los bicuerpos, los intracuerpos, los nanocuerpos, los inmunofármacos modulares pequeños (SMIP), las proteínas de fusión de dominios de unión al antígeno con inmunoglobulinas, los anticuerpos camelizados, los anticuerpos que contienen VHH, las muteínas o los derivados de éstas y los polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferirle al polipéptido la capacidad de unirse de manera específica al antígeno, tal como una secuencia de la CDR, con la condición de que el anticuerpo retenga la actividad biológica deseada, así como los anticuerpos multiespecíficos que pueden formarse a partir de fragmentos de anticuerpos (C. A. K Borrebaeck, editor (1995), *Antibody Engineering (Breakthroughs in Molecular Biology)*, Oxford University Press; R. Kontermann & S. Diebel, editores (2001), *Antibody Engineering (Springer Laboratory Manual)*, Springer Verlag). Ha de interpretarse que un anticuerpo que no es un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene todos los sitios de unión idénticos. Podrían diseñarse fragmentos F(ab')<sub>2</sub> o Fab para minimizar o eliminar por completo las interacciones intermoleculares mediadas por los enlaces disulfuro que pudieran aparecer entre los dominios C<sub>H1</sub> y C<sub>L</sub>. Mediante la digestión de los anticuerpos con papaína, se producen dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, que se denominan fragmentos "Fab", cada uno de los cuales tiene un solo sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizarse con facilidad. El tratamiento con pepsina da como resultado un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos fragmentos "Fv". Un fragmento "Fv" es el fragmento mínimo de un anticuerpo que contiene un sitio completo para reconocer al antígeno y unirse a él. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera, asociados estrechamente a través de enlaces no covalentes. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la

superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis CDR le confieren especificidad a la unión al antígeno del anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un fragmento Fv que comprenda tan solo tres CDR específicas para un antígeno) tendrá la capacidad de reconocer el antígeno y unirse a él.

5 Los fragmentos de anticuerpos "Fv de cadena simple", "sFv" o "scFv" comprenden los dominios de la VH y la VL del anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica.

Preferentemente, el polipéptido Fv también comprende un conector polipeptídico entre los dominios de la VH y la VL, que permite que el fragmento Fv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para hallar una revisión de los fragmentos sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore, editores, Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

10 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región de la bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación que se le da en el presente documento a aquellos fragmentos Fab' donde uno o más restos de cisteína de los dominios constantes contienen un grupo tiol libre. Los fragmentos de los anticuerpos F(ab')<sub>2</sub> fueron producidos originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas entre ellos.

15 Los restos "del marco" o FR son aquellos restos del dominio variable que no son los restos de la región hipervariable.

La frase "región constante" hace referencia a la porción de la molécula del anticuerpo que confiere las funciones efectoras.

20 Los términos "muteína" y "variante" pueden usarse indistintamente y hacen referencia a la secuencia polipeptídica un anticuerpo que contiene al menos una sustitución, supresión o inserción de aminoácidos en la región variable o en una porción equivalente a la región variable, con la condición de que la muteína o la variante retengan la afinidad de unión o la actividad biológica deseada.

Las muteína pueden ser sustancialmente homólogas o sustancialmente idénticas al anticuerpo progenitor.

25 El término "derivados" hace referencia a aquellos anticuerpos que han sido modificados por medios covalentes, por ejemplo, con procedimientos como la ubiquitinación, la conjugación con agentes terapéuticos o de diagnóstico, el marcado (por ejemplo, con radionucleidos o con diversas enzimas), la unión covalente de polímeros, tal como el tratamiento con PEG (la derivatización con polietilenglicol), y la inserción o la sustitución de aminoácidos nativos por aminoácidos no naturales por medio de una síntesis química.

30 Un anticuerpo "humano" o un fragmento funcional de un anticuerpo humano se definen en el presente documento como un anticuerpo que no es quimérico o "humanizado" y que no proviene (por completo o en parte) de una especie no humana. Un anticuerpo humano o un fragmento funcional de un anticuerpo humano pueden derivar de un anticuerpo humano o pueden ser anticuerpos humanos sintéticos. Un "anticuerpo humano sintético" se define en el presente documento como un anticuerpo que tiene una secuencia que deriva por completo o en parte de secuencias sintéticas a través de procedimientos *in silico*, que se basan en el análisis de secuencias de anticuerpos humanos conocidos. El diseño *in silico* de la secuencia de un anticuerpo humano o de un fragmento de éste puede efectuarse, por ejemplo, analizando una base de datos de secuencias de anticuerpos humanos o de fragmentos de éstos y concibiendo una secuencia polipeptídica mediante el uso de los datos obtenidos. Otro ejemplo de un anticuerpo humano o de un fragmento funcional de un anticuerpo humano es uno que es codificado por un ácido nucleico que ha sido aislado de una biblioteca de secuencias de anticuerpos de origen humano (es decir, una biblioteca basada en anticuerpos tomados de una fuente humana natural). Los ejemplos de anticuerpos humanos incluyen los anticuerpos basados en n-CoDeR, que fueron descritos por Carlsson y Söderlind, *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 1 (1), 102-108 (2001), y por Söderlind y *col. Nat. Biotech.* 18, 852-856 (2000), así como en la Patente de los EE.UU. n.º 6.989.250.

45 Un "anticuerpo humanizado" o un fragmento funcional de un anticuerpo humanizado se definen en el presente documento como un anticuerpo (i) que deriva de una fuente no humana (por ejemplo, un ratón transgénico que tiene un sistema inmune heterólogo), donde el anticuerpo está basado en la línea germinal humana, o (ii) que tiene CDR injertadas, donde las CDR del dominio variable son de origen no humano, mientras que uno o más de los marcos del dominio variable son de origen humano, así como el dominio constante (de haberlo).

50 La frase "anticuerpo quimérico", Tal como se usa en el presente documento, hace referencia a un anticuerpo que contiene una secuencia que deriva de dos anticuerpos diferentes (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 4.816.567), que típicamente se origina en distintas especies. Más típicamente, los anticuerpos quiméricos comprenden fragmentos de anticuerpos humanos y murinos, generalmente regiones constantes humanas y regiones variables de ratón.

55 Los anticuerpos "humanos modificados" se generan alterando la secuencia progenitora de acuerdo con los procedimientos que se detallan en Studnicka y *col.*, Patente de los EE.UU. n.º 5.766.886, por ejemplo, como en los

anticuerpos que se representan en SEQ ID NO: 14 y 15 y los que se describen en la solicitud de patente WO08/022295.

Un anticuerpo de la invención puede derivar de una biblioteca de genes de anticuerpos recombinantes. El desarrollo de tecnologías para preparar repertorios de genes de anticuerpos humanos recombinantes y para presentar los fragmentos de anticuerpos codificados en la superficie de bacteriófagos filamentosos ha permitido elaborar y seleccionar directamente anticuerpos humanos, lo cual también puede aplicarse a los anticuerpos humanizados, quiméricos o murinos o a las muteínas. Los anticuerpos que se elaboran con esta tecnología basada en fagos se producen como fragmentos de unión al antígeno, usualmente fragmentos Fv o Fab, en bacterias, por lo que carecen de funciones efectoras. Las funciones efectoras pueden introducirse con una de dos estrategias. Los fragmentos pueden modificarse para obtener anticuerpos completos, que pueden expresarse en células de mamíferos, o para obtener fragmentos de anticuerpos biespecíficos, que contienen un segundo sitio de unión para desencadenar una función efectora. Típicamente, el fragmento Fd (VH-CH1) y la cadena ligera (VL-CL) de los anticuerpos son clonados por separado por PCR y son recombinados de manera aleatoria en bibliotecas de combinación presentadas en fagos, en las que posteriormente puede realizarse la selección en función de la unión a un antígeno particular. Los fragmentos Fab se expresan en la superficie del fago, es decir, se unen físicamente a los genes que los codifican. Por consiguiente, la selección de los fragmentos Fab a través de la unión a los antígenos también permite seleccionar las secuencias que codifican los fragmentos Fab, que luego pueden amplificarse. Al realizarse diversos procedimientos de unión al antígeno y amplificación recurrente, un procedimiento que se conoce como análisis, se incrementa el nivel de los fragmentos Fab con especificidad por el antígeno, y finalmente se los aísla.

Se ha desarrollado una variedad de procedimientos para obtener anticuerpos humanos de bibliotecas de presentación en fagos. Estas bibliotecas pueden construirse en un solo marco maestro, en el cual pueden recombinarse diversas CDR formadas *in vivo* (es decir, no derivadas del ser humano), como se describe en Carlsson y Söderlind, Exp. Rev. Mol. Diagn. 1 (1), 102-108 (2001), Söderlin y col. Nat. Biotech. 18, 852-856 (2000), y la Patente de los EE.UU. n.º 6.989.250. Como alternativa, esta biblioteca de anticuerpos podrá basarse en secuencias de aminoácidos que hayan sido diseñadas *in silico* y que estén codificadas por ácidos nucleicos creados por medios sintéticos. El diseño *in silico* de la secuencia de un anticuerpo se efectúa, por ejemplo, analizando una base de datos de secuencias humanas y concibiendo una secuencia polipeptídica mediante el uso de los datos obtenidos. Se describen procedimientos para diseñar u obtener secuencias creadas *in silico*, por ejemplo, en Knappik y col., J. Mol. Biol. (2000) 296:57, Krebs y col., J. Immunol. Methods (2001) 254:67, y la Patente de los EE.UU. n.º 6.300.064. Para hallar una revisión de las técnicas de presentación en fagos, véase el documento WO08/022295 (Novartis).

Como alternativa, un anticuerpo de esta invención puede provenir de animales. Este anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano modificado, como se resume en el documento WO08/022295 (Novartis). El anticuerpo puede provenir de animales transgénicos [véase también el documento WO08/022295 (Novartis)].

Como se las usa en el presente documento, las distintas “formas” de un antígeno, por ejemplo, el PRLR, se definen en el presente documento como las distintas moléculas proteicas que son el resultado de distintas modificaciones que ocurren durante la traducción y después de la traducción, tales como, sin limitaciones, las diferencias en la separación del transcrito primario del receptor de prolactina, las diferencias en la glicosilación y las diferencias en la escisión proteolítica posterior a la traducción.

Tal como se usa en el presente documento, el término “epítipo” incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse de manera específica a una inmunoglobulina o a un receptor en una célula T. Los determinantes epitópicos usualmente consisten en agrupamientos que presentan actividad química superficial, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y frecuentemente tienen características específicas en su estructura tridimensional, así como características de carga específicas. Se dice que dos anticuerpos “se unen al mismo epítipo” cuando se demuestra que un anticuerpo compite con el segundo anticuerpo en un ensayo de unión competitiva, que puede llevarse a cabo de acuerdo con cualquiera de los procedimientos que son bien conocidos en la técnica, y cuando los dos anticuerpos se unen a la totalidad de los aminoácidos del epítipo.

Los términos “anticuerpos maduros” y “fragmentos de unión al antígeno maduros”, por ejemplo, las variantes de los fragmentos Fab maduros, incluyen los derivados de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo que presentan una unión más fuerte a un antígeno dado, tal como el dominio extracelular del PRLR, es decir, que se unen a él con una mayor afinidad. La maduración es el procedimiento en el que se identifica una pequeña cantidad de mutaciones dentro de las seis CDR de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo que dan como resultado este incremento en la afinidad. El procedimiento de maduración es la combinación de procedimientos de biología molecular que permiten introducir mutaciones en el anticuerpo y analizar e identificar los miembros de unión mejorados.

## Procedimientos terapéuticos

Los procedimientos terapéuticos comprenden administrarle al sujeto que necesita el tratamiento una cantidad eficaz para el uso terapéutico de un anticuerpo contemplado en la invención. En el presente documento, una “cantidad eficaz para el uso terapéutico” se define como una cantidad de un anticuerpo que es suficiente para bloquear la proliferación de las células positivas para el PRLR en el área tratada del sujeto, que puede administrarse como una

sola dosis o de acuerdo con un régimen de múltiples dosis, por sí sola o en combinación con otros agentes. Esto puede dar como resultado el alivio de una condición adversa, pero la cantidad debe ser tolerable desde el punto de vista toxicológico. El sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano (por ejemplo, un conejo, una rata, un ratón, un mono u otro primate de un orden inferior).

5 Es posible administrar un anticuerpo de la invención de manera concurrente con medicamentos conocidos, y en algunos casos, es posible modificar el propio anticuerpo. Por ejemplo, sería posible conjugar el anticuerpo con una inmunotoxina o un radioisótopo para potencialmente incrementar aún más la eficacia. Los anticuerpos de la invención pueden usarse como herramienta terapéutica o de diagnóstico en una variedad de situaciones donde el PRLR se exprese en un nivel indeseablemente elevado. Los trastornos y las afecciones que son particularmente  
10 susceptibles al tratamiento con los anticuerpos de la invención son la endometriosis, la adenomiosis, la anticoncepción de la fertilidad femenina no hormonal, la enfermedad mamaria benigna y la mastalgia, la inhibición de la lactancia, la hiperplasia benigna de próstata, los fibroides, la pérdida de cabello hiper y normoprolactinémica. También se incluye el tratamiento concurrente en una terapia hormonal combinada, con el fin de inhibir la proliferación de las células del epitelio mamario.

15 Para tratar cualquiera de los trastornos precedentes, las composiciones farmacéuticas que han de usarse de acuerdo con la presente invención pueden formularse de manera convencional, mediante el uso de uno o más vehículos o excipientes aceptables para aplicaciones fisiológicas. Un anticuerpo de la invención puede administrarse por cualquier medio apropiado, que puede variar en función del tipo de trastorno que se desea tratar. Las rutas de administración posibles incluyen las vías parenteral (por ejemplo, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea), intrapulmonar e intranasal, y si resulta deseable para un tratamiento de  
20 inmunosupresión local, la administración intralesional. Además, un anticuerpo de la invención puede administrarse a través de una infusión en pulsos, por ejemplo, con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferentemente, la dosis se administra por inyección, más preferentemente por inyección intravenosa o subcutánea, dependiendo en parte del carácter breve o crónico de la administración. La cantidad que ha de administrarse depende de una variedad de factores, tales como los síntomas clínicos, el peso del individuo y la administración concurrente de otras drogas. Aquellos versados en la técnica han de reconocer que la ruta de administración variará en función del trastorno o la afección que se desee tratar.

La determinación de una cantidad eficaz para el uso terapéutico del polipéptido novedoso de acuerdo con esta invención dependerá en gran medida de las características del paciente particular, de la ruta de administración y de  
30 la naturaleza del trastorno que se desee tratar. Pueden hallarse lineamientos generales, por ejemplo, en las publicaciones de la Conferencia Internacional para la Armonización y en Remington's Pharmaceutical Sciences, capítulos 27 y 28, pp. 484-528 (18ª edición, Alfonso R. Gennaro, editor, Easton, Pa.: Mack Pub. Co., 1990). Más específicamente, la determinación de la cantidad eficaz para el uso terapéutico dependerá de factores como la toxicidad y la eficacia del medicamento. La toxicidad puede determinarse con procedimientos bien conocidos en la técnica, que pueden hallarse en las referencias precedentes. La eficacia puede determinarse empleando los mismos lineamientos, en conexión con los procedimientos que se describirán en los ejemplos más adelante.

### **Composiciones farmacéuticas y administración**

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que pueden comprender anticuerpos contra el PRLR solos o en combinación con al menos un agente adicional, tal como un compuesto estabilizador, que  
40 pueden administrarse en cualquier vehículo farmacéutico estéril biocompatible, incluyendo, sin limitaciones, la solución salina, la solución salina tamponada, la dextrosa y el agua. Cualquiera de estas moléculas podrá administrarse a un paciente por sí sola o en combinación con otros agentes, drogas u hormonas, en composiciones farmacéuticas donde se la mezcla con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. En una forma de realización de la presente invención, el vehículo farmacéuticamente aceptable es inerte desde el punto de vista farmacéutico.

La presente invención también se refiere a la administración de las composiciones farmacéuticas. Esta administración se efectúa por vía parenteral. Los procedimientos para efectuar la administración parenteral incluyen la administración tópica, intraarterial (directamente en el tumor), intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, intrauterina o intranasal. Además de los ingredientes activos, estas  
50 composiciones farmacéuticas podrán contener vehículos farmacéuticamente aceptables que comprendan excipientes y auxiliares que faciliten el procesamiento de los compuestos activos, con el fin de obtener preparaciones que puedan usarse en aplicaciones farmacéuticas. Pueden hallarse detalles adicionales sobre la formulación y la administración en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (editado por Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

55 Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen las soluciones acuosas de los compuestos activos. Para la inyección, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones compatibles con aplicaciones fisiológicas, tales como la solución de Hank, la solución de Ringer o la solución salina amortiguada de uso fisiológico. Las suspensiones acuosas inyectables podrán contener sustancias que incrementen la viscosidad de la suspensión, tales como la carboximetil celulosa de sodio, el sorbitol o el dextrano. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones oleosas inyectables apropiadas. Los solventes o los vehículos lipófilos apropiados incluyen los aceites grasos, tales como el aceite de sésamo, los ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como el oleato de etilo o los triglicéridos, o los liposomas. Opcionalmente, la suspensión también puede contener

estabilizadores o agentes apropiados para incrementar la solubilidad de los compuestos, con el objeto de facilitar la preparación de soluciones altamente concentradas.

Para la administración tópica o nasal, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera particular que se desea atravesar. Estos penetrantes generalmente son conocidos en la técnica.

- 5 La administración parenteral también comprende procedimientos de administración parenteral que también incluyen la administración intraarterial, intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, intrauterina, vaginal o intranasal.

#### **Kits**

- 10 La invención también se refiere a paquetes farmacéuticos y kits que comprenden uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones de la invención que se mencionaron con anterioridad. En estos recipientes podrá haber una indicación donde se señale la aprobación de la fabricación, el uso y la comercialización del producto para la administración a los seres humanos por la agencia gubernamental correspondiente, responsable de la regulación de la fabricación, el uso y la comercialización de fármacos o productos biológicos.

- 15 En otra forma de realización, los kits pueden contener secuencias de ADN que codifican los anticuerpos de la invención. Preferentemente, las secuencias de ADN que codifican estos anticuerpos se proporcionan en un plásmido apropiado para transfectar y expresar en una célula huésped. El plásmido puede contener un promotor (frecuentemente un promotor inducible) para regular la expresión del ADN en la célula huésped. El plásmido también puede contener sitios de restricción para facilitar la inserción de otras secuencias de ADN en el plásmido, con el propósito de producir diversos anticuerpos. Los plásmidos también pueden contener otros elementos para facilitar la clonación y la expresión de las proteínas codificadas. Estos elementos son bien conocidos por aquellos versados en la técnica e incluyen, por ejemplo, marcadores de selección, codones de terminación y semejantes.
- 20

#### **Fabricación y almacenamiento**

- 25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención podrán fabricarse de una manera que sea conocida en la técnica, por ejemplo, con procedimientos convencionales de mezcla, disolución, granulación, elaboración de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, captura o liofilización.

La composición farmacéutica puede proporcionarse como un polvo liofilizado en histidina 1 mM-50 mM, con 0,1%-2% de sacarosa y 2%-7% de manitol, con un pH en el intervalo de entre 4,5 y 5,5, que puede combinarse con un tampón antes de usarlo.

- 30 Una vez completa la elaboración de las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención formulado en un vehículo aceptable, es posible colocarlas en un recipiente apropiado, con instrucciones para el tratamiento de una afección indicada. Para administrar los anticuerpos contra el PRLR, en estas instrucciones puede detallarse la cantidad, la frecuencia y el procedimiento de administración.

#### **Dosis terapéuticamente eficaz**

- 35 Las composiciones farmacéuticas que son apropiadas para usar en la presente invención incluyen aquellas composiciones donde los ingredientes activos están presentes en una cantidad eficaz para el propósito deseado, es decir, el tratamiento de una patología concreta caracterizada por la expresión del PRLR. La determinación de una dosis eficaz está dentro del alcance de aquellos versados en la técnica.

- 40 Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos en cultivos celulares, por ejemplo, en células de linfoma, o en modelos en animales, usualmente ratones, ratas, conejos, perros, cerdos o simios. También puede usarse un modelo en un animal para determinar el rango de concentración y la ruta de administración deseados. Posteriormente, esta información puede usarse para determinar las dosis y las rutas útiles para la administración en seres humanos.

- 45 La dosis terapéuticamente eficaz hace referencia a la cantidad de una proteína, de un anticuerpo contra ella o de un antagonista o un inhibidor de dicha proteína que permite mejorar los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y la toxicidad de estos compuestos pueden determinarse de acuerdo con procedimientos farmacéuticos convencionales, en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, a través de la  $DE_{50}$  (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población) y la  $DL_{50}$  (la dosis letal para 50% de la población). La proporción entre las dosis correspondientes a los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, que puede expresarse como la proporción  $DE_{50}/DL_{50}$ . Se prefieren las composiciones farmacéuticas que presentan índices terapéuticos elevados. Los datos obtenidos en los ensayos en cultivos celulares y en los estudios en animales se usan para formular un rango de dosificación para el uso en los seres humanos. La dosis de estos compuestos preferentemente se halla en un rango de concentraciones en la circulación que incluyen la  $DE_{50}$ , y se caracteriza por una toxicidad escasa o nula. Dentro de este rango, la dosis puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada, de la sensibilidad del paciente y de la ruta de administración.
- 50

La dosis exacta es seleccionada por el médico individual, en función del paciente que desea tratar. La dosis y la administración se ajustan para proporcionar niveles de la unidad activa que son suficientes para mantener el efecto deseado. Otros factores que pueden tenerse en cuenta incluyen la rigurosidad del estado de enfermedad, por ejemplo, el tamaño y la localización de las lesiones en el endometrio, la edad, el peso y el género del paciente, la dieta, la duración y la frecuencia de la administración, las combinaciones de drogas, la sensibilidad a la reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada pueden administrarse con una frecuencia de 3 ó 4 días, una vez por semana, una vez por quincena o una vez por mes, dependiendo de la vida media y la tasa de eliminación de la formulación particular.

Las dosis normales pueden variar entre 0,1 y 100.000 microgramos, hasta la dosis total, de aproximadamente 2 g, dependiendo de la ruta de administración. En la bibliografía pueden hallarse orientaciones relacionadas con las dosis y los procedimientos de administración particulares. Véanse los documentos US. 4.657.760, US 5.206.344 o US 5.225.212. Aquellos versados en la técnica han de poder emplear distintas formulaciones para los polinucleótidos y para las proteínas o sus inhibidores. De manera similar, la administración de los polinucleótidos o los polipéptidos será específica para las células, las afecciones, las localizaciones u otros factores particulares. Las actividades preferidas para un anticuerpo radiomarcado pueden variar entre 0,1 y 10 mCi/mg de proteínas (Riva y *col.*, Clin. Cancer Res. 5:3275s-3280s, 1999; Wong y *col.*, Clin. Cancer Res. 6:3855-3863, 2000; Wagner y *col.*, J. Nuclear Med. 43:267-272, 2002).

La presente invención se describirá con mayor detalle en los ejemplos más adelante. Los ejemplos se proporcionan exclusivamente para ilustrar la invención en referencia a formas de realización específicas. Si bien en estos ejemplos se ilustran determinados aspectos específicos de la invención, los ejemplos no han de constituir limitaciones para el alcance de la presente invención.

Todos los ejemplos fueron puestos en práctica de acuerdo con procedimientos convencionales, que han de ser bien conocidos y de uso convencional para aquellos versados en la técnica, excepto donde se indique lo contrario y se provea una descripción detallada. Los procedimientos convencionales de biología molecular que se describirán en los ejemplos más adelante pueden ponerse en práctica como se describe en los manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook y *col.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

### **Descripción de las figuras**

Figura 1. Expresión del ARNm de la prolactina (PRL-ARNm) (determinada con un análisis de PCR en tiempo real de TaqMan) en endometrio humano y en lesiones (tejido ectópico) de mujeres saludables y de mujeres que sufren endometriosis.

Figura 2. Expresión del ARNm del receptor de prolactina (PRLR-ARNm) (determinada con un análisis de PCR en tiempo real de TaqMan) en endometrio humano y en lesiones (tejido ectópico) de mujeres saludables y de mujeres que sufren endometriosis.

Figura 3A: El anticuerpo Mat3 neutralizador del receptor de prolactina inhibió la ramificación lateral en glándulas mamarias de ratones que han sido empleados en un modelo de reemplazo hiperprolactinémico de enfermedad mamaria benigna. El anticuerpo inespecífico no tuvo efecto. Los ratones normoprolactinémicos sanos (sin pituitaria) mostraron ramificación lateral reducida, mientras que el trasplante de pituitaria (hiperprolactinemia) mejoró la ramificación lateral y el desarrollo lóbuloalveolar. El anticuerpo Mat3 específico actuó como antagonista de los efectos de la hiperprolactinemia.

Figura 3B: El anticuerpo Mat3 neutralizador del receptor de prolactina inhibió la inducción del gen blanco de prolactina *elf5* en glándulas mamarias de ratones en un modelo de reemplazo hiperprolactinémico de enfermedad mamaria benigna. El anticuerpo inespecífico no tuvo efecto. Los ratones normoprolactinémicos sanos (sin pituitaria) mostraron una expresión reducida de *elf5* en la glándula mamaria, mientras que el trasplante de pituitaria (hiperprolactinemia) estimuló fuertemente la expresión del gen *elf5*. El anticuerpo Mat3 específico actuó como antagonista de los efectos de la hiperprolactinemia pero no el anticuerpo control inespecífico.

Figura 4: Numeración de Kabat de las posiciones de aminoácidos del marco de trabajo de acuerdo a Johnson y Wu (Nucleic Acids Res. 2000, 28, 214-218).

Figura 5A: Resultados del análisis por FACS con el anticuerpo anti-PRLR HE06642. La unión del anticuerpo se determinó a una concentración fija en células HEK293 que expresan el PRLR humano y de ratón en comparación con la línea celular parental que no expresa PRLR. Eje Y: #, mediana de la intensidad de la fluorescencia a 0,37 µg/ml HE06642 como molécula IgG1. \*, 1 = HEK293 con PRLR humano; 2 = HEK293 con PRLR murino; 3 = HEK293 sin PRLR.

Figura 5B: Resultados del análisis por FACS con el anticuerpo anti-PRLR Mat3. La unión del anticuerpo se determinó a una serie de concentraciones diferentes en células HEK293 que expresan el PRLR humano y células Ba/F que expresan el PRLR de macaco en comparación con una línea celular (HEK293) que no expresa

PRLR. Las intensidades de señal máximas a las mayores concentraciones de anticuerpo dependen del número de PRLR expresados en las superficies celulares, es decir las células HEK293 y Ba/F no tienen el mismo número de PRLR en sus superficies. Eje Y: #, mediana de la intensidad de la fluorescencia; eje X: °, diferentes concentraciones en µg/ml del anticuerpo Mat3 como molécula IgG2; \*, 1 (círculos) = HEK293 con PRLR humano; 2 (triángulos) = Ba/F con PRLR de macaco; 3 (cuadrados) = HEK293 sin PRLR.

Figura 6A: Alineamiento de la región de secuencia del dominio Mat3-VL con el segmento V humano más similar identificado en VBASE2 (Mat3-VL es 90% idéntico a la secuencia de la línea germinal humIGLV056).

Figura 6B: Alineamiento de la región de secuencia del dominio Mat3-VH con el segmento V humano más similar identificado en VBASE2 (Mat3-VH es 90% idéntico a la secuencia de la línea germinal humIGHV313).

Figura 6C: Alineamiento de la región de secuencia del dominio HE06642-VL con el segmento V humano más similar identificado en VBASE2 (HE06642-VL es 80% idéntico a la secuencia de la línea germinal humIGKV083).

Figura 6D: Alineamiento de la región de secuencia del dominio HE06642-VH con el segmento V humano más similar identificado en VBASE2 (HE06642-VH es 89% idéntico a la secuencia de la línea germinal humIGHV313).

Figura 7: Ensayos de unión basados en ELISA de una variante de Fab madurado:

Se ensayaron los sobrenadantes de *E. coli* conteniendo Fab para la unión del dominio extracelular inmovilizado del PRLR humano. La figura ilustra la unión de las variantes de Fab como un diagrama de barras. Las intensidades de la señal (extinción) se dan en los ejes y (#), los nombres de las variantes de Fab (\*) en los ejes x. La intensidad de señal elevada de las variantes de Fab madurado 005-C04-20-2 en comparación con el Fab no madurado del anticuerpo parental 005-C04 demuestra una mejor unión a PRLR de 005-C04-20-2 en comparación con 005-C04. La "variante" pET28 representa un sobrenadante de una cepa de *E. coli* que porta el plásmido de expresión de Fab pET28a (Novagen, EMD Chemicals Group, Merck, Darmstadt, Alemania) que no expresa ningún Fab.

Figura 8: Representación de gráfico de barras de resultados de ELISA Pepscan. Cada valor graficado representa el valor promedio obtenido para 54 péptidos con S.E.M (error estándar de la media). Las barras negras representan la potencia de unión relativa del anticuerpo HE06642. Las barras blancas representan la potencia de unión relativa del anticuerpo Mat3. Los datos se normalizaron al promedio para todo el conjunto de datos de 2916 péptidos y se corrigió para la señal de fondo.

La figura 8A muestra los resultados de ELISA para un subconjunto de péptidos que varían entre los aminoácidos 103-PDPPLELAVEVKQPE-117 indicado como '117' en el eje X y 127-WSPPTLIDLKTGWFT-141 (indicado como '141'). Es decir que estos péptidos, que fueron desplazados por tres aminoácidos a lo largo de la secuencia de aminoácidos de ECD, cubren la región entre la posición del aminoácido 103 y 141 del ECD del PRLR humano. Las diferencias más fuertes observadas en este conjunto de datos son para el péptido 109-LAVEVKQPEDRKPYL-123 (indicado como '123') con un valor p de significancia de  $4 \times 10^{-12}$ , y para el péptido 121-PYLWIKWSPPTLIDL-135 (indicado como '135') con un valor p de significancia de  $7 \times 10^{-40}$ .

La figura 8B muestra los resultados de ELISA para un subconjunto de péptidos que varían en un rango entre 139-WFTLLYEIRLKEPEKA-153 (indicado como '153' en el eje X) y 163-QQTEFKILSLHPGQK-177 (indicado como '177'). Es decir que estos péptidos, que fueron desplazados por tres aminoácidos a lo largo de la secuencia de aminoácidos de ECD, cubren la región entre la posición del aminoácido 139 y 177 del ECD del PRLR humano. Las diferencias más fuertes observadas en este conjunto de datos son para el péptido 148-LKPEKAAEWEIHFAG-162 (indicado como '162') con un valor p de significancia de  $6 \times 10^{-26}$ , y para el péptido 160-FAGQQTEFKILSLHP-174 (indicado como '174') con un valor p de significancia de  $8 \times 10^{-8}$ .

Estos datos demuestran que ambos anticuerpos se unen al subdominio S2 del ECD del PRLR humano (aminoácidos entre 101 y 210) y por lo tanto no son competitivos con el ligando natural PRL que principalmente se une al dominio S1. Sin embargo, este barrido de péptidos mostró que hay diferencias en la unión a los dominios S2 entre Mat3 y HE06642. Este hallazgo indica por qué el anticuerpo Mat3 muestra una especificidad de especie y potencia diferentes en comparación con HE06642.

Figura 9: inhibición de la proliferación inducida por prolactina de células BaF3 (células monoclonales transfectadas establemente con el receptor humano de prolactina) por anticuerpos neutralizadores del receptor de prolactina y anticuerpos inespecíficos control. Los valores de IC<sub>50</sub> se determinaron para los siguientes anticuerpos en formato IgG1: Mat3 (círculos cerrados), IC<sub>50</sub> = 0,7 nM [100% de inhibición a 1 µg/ml (= 6,7 nM)]; HE06.642 (cuadrados abiertos), IC<sub>50</sub> = 4,2 nM [81% de inhibición a 1 µg/ml (= 6,7 nM)]; anticuerpo inespecífico control (triángulos abiertos): sin efecto inhibitorio.

Figura 10: inhibición de la proliferación inducida por prolactina de células BaF3 (células monoclonales transfectadas establemente con el receptor murino de prolactina) por anticuerpos neutralizadores del receptor de prolactina y anticuerpos inespecíficos control. Los valores de IC<sub>50</sub> se determinaron para los siguientes anticuerpos en formato IgG1: Mat3 (círculos cerrados), IC<sub>50</sub> = 3,0 nM [97,4% de inhibición a 1 µg/ml (= 6,7 nM)]; HE06.642 (cuadrados abiertos), sin efecto inhibitorio; anticuerpo inespecífico control (triángulos abiertos): sin

efecto inhibitorio.

Figura 11A y B: inhibición de la proliferación inducida por prolactina de células BaF3 (células monoclonales transfectadas establemente con el receptor de macaco de prolactina) por anticuerpos neutralizadores del receptor de prolactina y anticuerpos inespecíficos control. Los valores de  $IC_{50}$  se determinaron para los siguientes anticuerpos en formato IgG1: Mat3 (círculos cerrados),  $IC_{50} = 4,6$  nM [99,1% de inhibición a  $1 \mu\text{g/ml}$  ( $= 6,7$  nM)] (véase la figura 11A); HE06.642 (cuadrados abiertos),  $IC_{50} = 206$  nM [92,4% de inhibición a  $240 \mu\text{g/ml}$  ( $= 1600$  nM)] (véase la figura 11A y B); anticuerpo inespecífico control (triángulos abiertos): sin efecto inhibitorio (véase la figura 11A y B).

Figura 12: Tratamiento de útero con adenomiosis (= endometriosis interna) en ratones SHN con anticuerpo Mat3 neutralizador de PRLR. Los resultados se describen en el eje Y como puntuación de la enfermedad (puntuación de la adenomiosis) como se describe en el ejemplo 5. La mediana de la puntuación de la enfermedad para cada grupo experimental se indica como una barra horizontal. Los grupos experimentales son los siguientes: grupo 1, sin injerto de pituitaria (ratón normoprolactinémico que desarrolla endometriosis interna en algún grado, mediana de la puntuación de la enfermedad = 1); grupo 2, con isoinjerto de pituitaria (la hiperprolactinemia debido al isoinjerto de pituitaria potencia la puntuación de la enfermedad, mediana de la puntuación de la enfermedad = 3); grupo 3, con isoinjerto de pituitaria tratado con anticuerpo inespecífico murino control de isotipo IgG2a una vez por semana a una dosis de 30 mg/kg (mediana de la puntuación de la enfermedad = 3); grupo 4, con isoinjerto de pituitaria tratado con anticuerpo Mat3 en el formato IgG2a murina (Mat3-mIgG2a) una vez por semana a una dosis de 30 mg/kg (Mat3 curó completamente los animales. La puntuación de la enfermedad luego de 30 mg/kg Mat3 dado una vez por semana fue incluso menor (mediana de la puntuación de la enfermedad = 0) que la puntuación de enfermedad de los ratones normoprolactinémicos (mediana de la puntuación de la enfermedad = 1); grupo 5, con isoinjerto de pituitaria tratado con anticuerpo Mat3-mIgG2a una vez por semana a una dosis de 10 mg/kg (mediana de la puntuación de la enfermedad = 2); grupo 6, con isoinjerto de pituitaria tratado con anticuerpo Mat3-mIgG2a una vez por semana a una dosis de 3 mg/kg (mediana de la puntuación de la enfermedad = 2,5); grupo 7, con isoinjerto de pituitaria tratado con el anticuerpo Mat3-mIgG2a una vez por semana a una dosis de 1 mg/kg (mediana de la puntuación de la enfermedad = 2,5). El tratamiento con el anticuerpo Mat3 muestra una disminución dependiente de la dosis en la mediana de la puntuación de la enfermedad. Por lo tanto Mat3 es adecuado para tratar endometriosis interna (= útero con adenomiosis) y endometriosis externa en mujeres.

Figura 13A y B: inhibición de la actividad del gen reportero de luciferasa en células HEK293 transfectadas establemente con el PRLR humano y murino. En la figura 13A la actividad dependiente del PRLR humano se grafica contra las concentraciones de anticuerpo, mientras que en la figura 13B se muestra la actividad dependiente del PRLR murino. La actividad de luciferasa se da como porcentaje de la actividad luciferasa máxima obtenida sin el agregado de ningún anticuerpo. Los valores de  $IC_{50}$  se determinaron para los siguientes anticuerpos en formato IgG1: Mat3 (círculos cerrados),  $IC_{50} = 0,5$  nM (fig. 13A, hPRLR) y  $1,3$  nM (fig. 13B, mPRLR); HE06.642 (cuadrados abiertos),  $IC_{50} = 4,6$  nM (fig. 13A, hPRLR) y  $>>1333$  nM ( $= 20 \mu\text{g/ml}$ ) (fig. 13B, mPRLR); anticuerpo inespecífico control de isotipo (triángulos abiertos): sin efecto inhibitorio (véase figura 13A y B). Estos datos muestran la actividad mejorada de Mat3 sobre hPRLR en comparación con HE06.642 y demuestran la actividad de Mat3 sobre mPRLR mientras que HE06.642 no inhibe la actividad luciferasa dependiente de mPRLR.

Figura 14: Unión a células de los anticuerpos neutralizadores de PRLR en células que expresan PRLR de humano, ratón y mono usando citometría de flujo. La mediana de la intensidad de señal fluorescente se grafica contra la concentración de anticuerpo. Se aplicaron los siguientes anticuerpos IgG1: Mat3 (círculos cerrados), HE06.642 (cuadrados abiertos), anticuerpo inespecífico control de isotipo (triángulos abiertos). Se ensayaron diferentes líneas celulares: A) línea celular HEK293 transfectada establemente con PRLR humano, B) línea celular HEK293 transfectada establemente con PRLR murino, C) línea celular HEK293 no transfectada con ningún gen de PRLR (línea celular control negativo), D) línea de células d cáncer de mama humano T47D, E) línea celular BaF3 transfectada establemente con PRLR de macaco, F) línea celular BaF3 transfectada establemente con PRLR humano, G) línea celular BaF3 transfectada establemente con PRLR murino. La potencia de unión a la línea celular de los anticuerpos en las diferentes líneas celulares ha sido deducida a partir de las curvas dosis-respuesta como valores  $CE_{50}$  (véase la tabla 8). Los gráficos de dosis-respuesta indican las superiores propiedades de unión a células de Mat3 en comparación con HE06.642.

SEQ ID NO: 1 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de Mat3.

SEQ ID NO: 2 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de Mat3.

SEQ ID NO: 3 representa la secuencia del ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena pesada de Mat3.

SEQ ID NO: 4 representa la secuencia del ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena ligera de Mat3.

SEQ ID NO: 5 representa la secuencia de aminoácidos de la región HCDR1 de Mat3.

SEQ ID NO: 6, representa la secuencia del ácido nucleico que codifica la región HCDR2 de Mat3.

SEQ ID NO: 7 representa la secuencia del ácido nucleico que codifica la HCDR3 de Mat3.

SEQ ID NO: 8 representa la secuencia del ácido nucleico que codifica la región LCDR1 de Mat3.

SEQ ID NO: 9 representa la secuencia del ácido nucleico que codifica la región LCDR2 de Mat3.  
 SEQ ID NO: 10 representa la secuencia del ácido nucleico que codifica la región LCDR3 de Mat3.  
 SEQ ID NO: 11 representa la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del PRLR de macaco y de mono cangrejero fusionado a una región Fc-His.  
 5 SEQ ID NO: 12 representa las posiciones 1 a 210, las posiciones 1 a 100 del dominio S1 (la construcción que comprende las posiciones 1 a 102 del dominio S1) y las posiciones 101 a 210 de la secuencia de aminoácidos del dominio S2 del ECD\_PRLR humano.  
 SEQ ID NO: 13 representa las posiciones 1 a 210 de la secuencia de aminoácidos del ECD\_PRLR murino.  
 10 SEQ ID NO: 14 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de HE06642, de Novartis (WO2008/22295).  
 SEQ ID NO: 15 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de HE06642, de Novartis (WO2008/22295).  
 SEQ ID NO: 16 representa la secuencia del ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena pesada de HE06642, de Novartis (WO2008/22295).  
 15 SEQ ID NO: 17 representa la secuencia del ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena ligera de HE06642, de Novartis (WO2008/22295).

## Ejemplos

### Ejemplo 1

20 Inhibición de la proliferación inducida por la prolactina de las células BaF3 (que habían sido transfectadas de manera estable con un receptor de prolactina humano) con anticuerpos neutralizadores del receptor de prolactina y con anticuerpos no específicos de control

Para analizar la eficacia *in vitro* de los anticuerpos neutralizadores del PRLR, se determinó la inhibición de la proliferación de las células BaF3 inducida por la prolactina. Las células fueron transfectadas de manera estable con un PRLR humano y fueron sometidas a un cultivo de rutina en un medio RPMI que contenía glutamina 2 mM, en presencia de 10% de FCS y 10 ng/ml de prolactina humana. Después de mantenerlas sin nutrientes en un medio libre de prolactina que contenía 1% de FCS, las células se sembraron en placas de 96 pocillos en una densidad de 25000 células por cavidad. Las células fueron estimuladas con 35 ng/ml de prolactina y fueron incubadas con dosis crecientes de los anticuerpos neutralizadores del PRLR durante dos días. La proliferación de las células se analizó usando un ensayo para determinar la viabilidad de las células según la luminiscencia CellTiter-Glo (de Promega).  
 25 Para determinar la inhibición de la proliferación de las células, se representaron curvas de la respuesta a la dosis y se calculó el valor de la IC<sub>50</sub>. Como control negativo, se aplicó una estimulación con un anticuerpo no específico. En este estudio, se comparó la actividad del anticuerpo Mat3 con la actividad del anticuerpo HE 06.642 (ambos en forma de moléculas de IgG1; véase la figura 9).  
 30

### Ejemplo 2

35 Inhibición de la proliferación inducida por la prolactina de las células BaF3 (que habían sido transfectadas de manera estable con un receptor de prolactina murino) con anticuerpos neutralizadores del receptor de prolactina y con anticuerpos no específicos de control

Para analizar la eficacia *in vitro* de los anticuerpos neutralizadores del PRLR, se determinó la inhibición de la proliferación de las células BaF3 inducida por la prolactina. Las células fueron transfectadas de manera estable con un PRLR murino y fueron sometidas a un cultivo de rutina en un medio RPMI que contenía glutamina 2 mM, en presencia de 10% de FCS y 10 ng/ml de prolactina humana. Después de mantenerlas sin nutrientes en un medio libre de prolactina que contenía 1% de FCS, las células se sembraron en placas de 96 pocillos en una densidad de 20000 células por cavidad. Las células fueron estimuladas con 50 ng/ml de prolactina y fueron incubadas con dosis crecientes de los anticuerpos neutralizadores del PRLR durante dos días. La proliferación de las células se analizó usando un ensayo para determinar la viabilidad de las células según la luminiscencia CellTiter-Glo (de Promega).  
 40 Para determinar la inhibición de la proliferación de las células, se representaron curvas de la respuesta a la dosis y se calculó el valor de la IC<sub>50</sub>. Como control negativo, se aplicó una estimulación con un anticuerpo no específico. En este estudio, se comparó la actividad del anticuerpo Mat3 con la actividad del anticuerpo HE 06.642 (ambos en forma de moléculas de IgG1; véase la figura 10).  
 45

### Ejemplo 3

50 Inhibición de la proliferación inducida por la prolactina de las células BaF3 (que habían sido transfectadas de manera estable con un receptor de prolactina de macaco) con anticuerpos neutralizadores del receptor de prolactina y con anticuerpos no específicos de control

Para analizar la eficacia *in vitro* de los anticuerpos neutralizadores del PRLR, se determinó la inhibición de la proliferación de las células BaF3 inducida por la prolactina. Las células fueron transfectadas de manera estable con un PRLR de macaco y fueron sometidas a un cultivo de rutina en un medio RPMI que contenía glutamina 2 mM, en presencia de 10% de FCS y 10 ng/ml de prolactina humana. Después de mantenerlas sin nutrientes en un medio libre de prolactina que contenía 1% de FCS, las células se sembraron en placas de 96 pocillos en una densidad de  
 55

25000 células por cavidad. Las células fueron estimuladas con 100 ng/ml de prolactina y fueron incubadas con dosis crecientes de los anticuerpos neutralizadores del PRLR durante dos días. La proliferación de las células se analizó usando un ensayo para determinar la viabilidad de las células según la luminiscencia CellTiter-Glo (de Promega). Para determinar la inhibición de la proliferación de las células, se representaron curvas de la respuesta a la dosis y se calculó el valor de la IC<sub>50</sub>. Como control negativo, se aplicó una estimulación con un anticuerpo no específico. En este estudio, se comparó la actividad del anticuerpo Mat3 con la actividad del anticuerpo HE 06.642 (ambos en forma de moléculas de IgG1; véase la figura 11).

#### Ejemplo 4

Análisis cuantitativo de la prolactina y de expresión del gen del receptor de prolactina basado en una PCR TaqMan en tiempo real en muestras de endometrio eutópico y ectópico y en muestras de lesiones provocadas por la endometriosis

Se llevó a cabo un análisis basado en una PCR TaQman en tiempo real usando el sistema detector de secuencias ABI Prism 7700, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (PE Applied Biosystems) y con la descripción que se proporciona en Endocrinology 2008, 149 (8): 3952-3959, condiciones que han de resultar conocidas para aquellos versados en la técnica. La concentración de la PRL y el nivel de expresión del PRLR fueron normalizados según la expresión de la ciclofilina. En particular, con el análisis basado en la PCR TaQman en tiempo real se analizó la concentración de la PRL y el nivel de expresión del PRLR en muestras de endometrio que habían sido obtenidas de mujeres saludables y en muestras de lesiones de diversa índole que habían sido provocadas por la endometriosis. La concentración de la prolactina y la expresión de su receptor fueron claramente superiores en las muestras de lesiones provocadas por la endometriosis, en comparación con las muestras de endometrios saludables. Los resultados se ilustran en las figuras 1 y 2.

Según los resultados obtenidos, puede inferirse que la señalización autocrina de la prolactina cumple una función importante en el desarrollo y el mantenimiento de la endometriosis y de la adenomiosis en el útero (es decir, la endometriosis interna, que es una forma de la endometriosis que está restringida al útero).

#### Ejemplo 5

Tratamiento de la adenomiosis en el útero (es decir, de la endometriosis interna) en ratones SHN con el anticuerpo neutralizador del PRLR Mat3

Para analizar la eficacia de los anticuerpos neutralizadores del PRLR sobre la endometriosis, se usó un modelo de la adenomiosis en el útero basado en ratones SHN que padecían una hiperprolactinemia sistémica (véase Acta anat. 116:46-54,1983). La hiperprolactinemia se indujo llevando a cabo un isoinjeto de pituitaria debajo la cápsula renal de ratones SHN hembra de 7 semanas de edad (Acta anat. 116:46-54,1983). Se administró el anticuerpo neutralizador del PRLR Mat3 (en una concentración de 30 mg/kg, 10 mg/kg, 3 mg/kg o 1 mg/kg) o un anticuerpo no específico (en una concentración de 30 mg/kg) por vía subcutánea. La administración comenzó dos semanas después del injerto de pituitaria. Los animales fueron sometidos a un tratamiento semanal con los anticuerpos, durante un período total de siete semanas. Se analizó la infiltración del tejido glandular en la capa muscular del útero como se describe en Laboratory Animal Science 1998,48:64-68. 66 días después del trasplante de pituitaria, se sacrificaron los animales, se los sometió a una autopsia, se fijaron los úteros en formalina amortiguada al 4% durante la noche y se los embebió en parafina. La rigurosidad de la adenomiosis (es decir, de la endometriosis interna) se calificó como se indica a continuación.

Grado 0 = ausencia de adenomiosis

Grado 1 = pérdida de la orientación concéntrica en la capa interna del miometrio

Grado 2 = invasión de la capa interna del miometrio por las glándulas del endometrio

Grado 3 = presencia de glándulas endometriales entre la capa interna y la capa externa del miometrio del útero

Grado 4 = invasión de la capa externa del miometrio por las glándulas del endometrio

Grado 5 = presencia de glándulas endometriales en el exterior de la capa externa del miometrio del útero

A continuación se detallan los grupos que fueron analizados en este experimento.

1. Animales que no fueron sometidos a un trasplante de pituitaria, es decir, ratones normoprolactinémicos.
2. Animales que fueron sometidos a un trasplante de pituitaria, es decir, ratones hiperprolactinémicos.
3. Animales que fueron sometidos a un trasplante de pituitaria y que fueron sometidos a un tratamiento semanal con un anticuerpo no específico de control en una concentración de 30 mg/kg.
4. Animales que fueron sometidos a un trasplante de pituitaria y que fueron sometidos a un tratamiento semanal con el anticuerpo neutralizador del receptor de prolactina Mat3, en forma de una molécula de IgG2a murina, en una concentración de 30 mg/kg.
5. Animales que fueron sometidos a un trasplante de pituitaria y que fueron sometidos a un tratamiento semanal con el anticuerpo neutralizador del receptor de prolactina Mat3, en forma de una molécula de IgG2a murina, en una concentración de 10 mg/kg.
6. Animales que fueron sometidos a un trasplante de pituitaria y que fueron sometidos a un tratamiento semanal con el anticuerpo neutralizador del receptor de prolactina Mat3, en forma de una molécula de IgG2a murina, en

una concentración de 3 mg/kg.

7. Animales que fueron sometidos a un trasplante de pituitaria y que fueron sometidos a un tratamiento semanal con el anticuerpo neutralizador del receptor de prolactina Mat3, en forma de una molécula de IgG2a murina, en una concentración de 1 mg/kg.

- 5 El anticuerpo neutralizador del PRLR Mat3 inhibió la endometriosis interna (es decir, la adenomiosis; véase la figura 12). Según esto, puede concluirse que el anticuerpo neutralizador del PRLR Mat3 es apropiado para tratar la endometriosis interna (es decir, la adenomiosis en el útero) y la endometriosis externa en las mujeres.

### Ejemplo 6

El anticuerpo neutralizador del PRLR Mat3 es apropiado para tratar las enfermedades benignas de las mamas

10 Una mutación local que da como resultado la activación del PRLR o una hiperprolactinemia local o sistémica pueden provocar enfermedades benignas en las mamas. Por lo tanto, se recurrió a un modelo basado en ratones hiperprolactinémicos que presentaban una proliferación incrementada en las glándulas mamarias (que es una característica de las enfermedades benignas más severas en las mamas). En el contexto de este experimento, se usaron ratones Balb/c hembra de 12 semanas de edad en los que se había llevado a cabo un isoinjerto de pituitaria debajo de la cápsula renal, así como ratones no operados. Algunos de los ratones en los que se había llevado a cabo el isoinjerto de pituitaria no fueron tratados, mientras que otros fueron sometidos a un tratamiento subcutáneo semanal con el anticuerpo neutralizador del PRLR Mat3, en forma de una molécula de IgG2, o con un anticuerpo no específico de control, también en forma de una molécula de IgG2, los días 15, 22, 29 y 36 después del trasplante de pituitaria. La concentración del anticuerpo fue de 30 mg/kg. Cada grupo experimental comprendió 8 animales.

20 A continuación se detallan los grupos que fueron analizados en este experimento.

1. Animales que no fueron sometidos a un trasplante de pituitaria, es decir, ratones normoprolactinémicos.
2. Animales que fueron sometidos a un trasplante de pituitaria, es decir, ratones hiperprolactinémicos.
3. Animales que fueron sometidos a un trasplante de pituitaria y que fueron sometidos a un tratamiento semanal con un anticuerpo no específico de control en una concentración de 30 mg/kg.
- 25 4. Animales que fueron sometidos a un trasplante de pituitaria y que fueron sometidos a un tratamiento semanal con el anticuerpo neutralizador del receptor de prolactina Mat3 en una concentración de 30 mg/kg.

Los ratones fueron sacrificados el día 38 después del trasplante de pituitaria. Dos horas antes de la muerte, a los animales se les aplicó una inyección intraperitoneal de BrdU para monitorear la proliferación de las células epiteliales. La glándula mamaria inguinal izquierda fue fijada en una solución de Carnoy. Se prepararon montajes de las glándulas mamarias completas y se los coloreó con un colorante carmín. En estos montajes, se analizó la ramificación lateral de las glándulas. Los resultados se ilustran en la figura 3A. El anticuerpo Mat3 inhibió la ramificación lateral de las glándulas mamarias, mientras que el anticuerpo no específico de control careció de efecto (figura 3A).

30 Posteriormente, se embebieron los montajes de las glándulas mamarias completas en parafina y se aplicaron inmunocoloraciones basadas en BrdU como se ha descrito con anterioridad (Endocrinology 149 (8): 3952-3959; 2009). La proliferación de las células epiteliales se analizó en 4 cortes histológicos de las glándulas mamarias de cada animal.

Se congeló en nitrógeno líquido el tercio lateral de la glándula mamaria inguinal derecha, sin el nodo linfático, y se lo procesó para obtener el ARN. Después de llevar a cabo una transcripción inversa, se puso en práctica un análisis basado en una PCR en tiempo real con el sistema detector de secuencias ABI Prism 7700, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (PE Applied Biosystems). Se determinó la expresión del gen que codifica la prolactina, elf5, y se la normalizó según la expresión de la citoqueratina 18. El nivel relativo del ARNm se calculó con un procedimiento comparativo basado en  $\Delta\text{CT}$ . El isoinjerto de pituitaria dio como resultado una hiperprolactinemia, es decir, una concentración más elevada de la prolactina, a causa de una expresión mayor del gen elg5 (figura 3B). En contraste con el anticuerpo no específico de control, el anticuerpo específico Mat3 inhibió la expresión del gen elf5, por lo que sirvió para bloquear con éxito el receptor de prolactina (figura 3B).

Según lo anterior, puede concluirse que el anticuerpo Mat3 es apropiado para tratar las enfermedades benignas de las mamas.

### Ejemplo 7

50 Aislamiento de anticuerpos que presentan especificidad por los blancos a partir de bibliotecas de expresión de anticuerpos humanos en fagos

Para aislar un panel de anticuerpos que pudieran neutralizar la actividad del PRLR humano, se analizaron simultáneamente tres bibliotecas de expresión de anticuerpos humanos en fagos, que en particular comprendían fragmentos Fab y scFv. El blanco que se usó en el análisis de las bibliotecas fue el dominio extracelular (ECD) soluble de diversos receptores de prolactina humanos y de ratón, que comprendían los aminoácidos 1-210 de SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente. Otros blancos abarcaron un ECD del PRLR humano unido en el extremo C a una marca que comprendía seis restos de histidina, así como un ECD del PRLR humano unido a un dominio IgG1-Fc humano a través de un conector que comprendía la secuencia de aminoácidos "isoleucina-glutamato-glicina-

arginina-metionina-aspartato".

La selección de los anticuerpos con especificidad por los blancos sobre basada en la expresión en los fagos se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos que se describen en Marks y col. (Methods Mol. Biol. 248:161-76, 2004). La biblioteca de expresión en los fagos se incubó con 50 pmol del ECD biotinilado, a temperatura ambiente durante 1 hora. El complejo formado se capturó usando 100 µl de una suspensión de esferas (Dynabeads® M-280, de Invitrogen) con estreptavidina. Los fagos no específicos se eliminaron lavando las esferas con un tampón apropiado (que comprendió PBS y 5% de leche). Los fagos unidos se eluyeron con 0,5 ml de trietilamina (TEA) 100 nM, inmediatamente después de lo cual se los neutralizó agregando un volumen idéntico de TRIS-HCl 1 M con un pH de 7,4. El conjunto de fagos eluidos se usó para infectar células de *E. coli* TG1 que se estaban desarrollando en una fase logarítmica. Los fagémidos se rescataron como se describió con anterioridad (Methods Mol. Biol. 248:161-76, 2004). La selección se repitió durante un total de tres ciclos. Se estudió la actividad de unión a través de un ensayo de ELISA en el que se emplearon colonias únicas provenientes de células TG1 que habían sido infectadas con los fagos que habían sido eluidos durante el tercer ciclo del análisis. En resumen, se emplearon colonias únicas que se habían formado a partir de las células TG1 que habían sido infectadas con los fagos eluidos para inocular placas de 96 pocillos.

Los microcultivos se desarrollaron hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,6, momento en el cual se indujo la expresión del fragmento del anticuerpo soluble agregando de IPTG 1 mM y realizando un cultivo durante la noche en una incubadora a 30°C, con agitación. Se centrifugaron las bacterias, se preparó un extracto periplásmico y se lo usó para detectar la actividad de unión del anticuerpo al ECD inmovilizado en las microplacas de 96 pocillos (que eran placas Immunosorb de 96 pocillos de fondo plano, de Nunc). Posteriormente, se puso en práctica un protocolo de ELISA convencional, según las instrucciones del fabricante de las microplacas.

Las afinidades de unión por el dominio extracelular (ECD) recombinante que presentaron los anticuerpos contra el receptor de prolactina (PRLR) se estimaron usando Biacore® 2000 y se usaron para clasificar los anticuerpos según su afinidad.

## 25 Ejemplo 8

### Maduración de las variantes de los anticuerpos

La maduración de los anticuerpos basada en la afinidad es un procedimiento que comprende dos pasos, en el que se combina una mutagénesis hasta la saturación y un análisis de alto desempeño en múltiples cavidades para identificar una pequeña cantidad de mutaciones que dan como resultado sendos incrementos en la afinidad. En la primera etapa del procedimiento de maduración basado en la afinidad, se introduce una variación en los anticuerpos salvajes basada en la posición por medio de una mutagénesis dirigida a sitios específicos, mediante el uso de casetes con tres nucleótidos NNK (donde N representa una mezcla que comprende 25% de adenina, 25% de timina, 25% de guanina y 25% de citosina y K representa una mezcla que comprende 50% de timina y 50% de guanina), de acuerdo con BMC Biotechnology 7: 65, 2007. De esta manera, pueden introducirse los 20 aminoácidos en sendas posiciones. Esta introducción al azar está restringida a las seis regiones de determinación de la complementariedad (CDR). En la segunda etapa del procedimiento de maduración basado en la afinidad, se combinan las variaciones beneficiosas y se analizan los resultados para determinar si se han obtenido beneficios adicionales.

### Análisis de las variantes de fragmentos Fab "005-C04" maduras mediante pruebas ELISA:

Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con 1 µg por mililitro del PRLR humano. Las placas fueron incubadas a 4°C durante la noche. Después de aplicar un bloqueo con un tampón que comprendía PBS y 3% de albúmina de suero bovino, se agregaron sobrenadantes de *E. coli* normalizados que contenían las variantes de los fragmentos Fab. Los complejos formados se detectaron agregando un anticuerpo específico contra la marca (A8592, de Sigma) que había sido marcado con peroxidasa de rábano picante.

Se usó un colorante rojo de Amplex como sustrato fluorogénico para la peroxidasa de rábano picante, que se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se midió la absorción a 570 nm y la extinción a 585 nm usando un lector Tecan Infinite F500. Los resultados que se obtuvieron con el anticuerpo "005-C04-20-2" se ilustran en la figura 7. Las modificaciones en el anticuerpo "005-C04-20-2" (figura 7) que resultaron beneficiosas para la afinidad se analizaron según la estabilidad térmica y la idoneidad para el plegamiento del fragmento Fab del anticuerpo. El anticuerpo Mat3 fue un derivado del anticuerpo "005-C04-20-2" que comprendió características del anticuerpo progenitor "005-C04", que estaban ausentes en el anticuerpo "005-C04-20-2", que fueron más apropiadas en el contexto de la estabilidad térmica.

## 55 Ejemplo 9

### Reactividad transversal de los anticuerpos sobre el PRLR de ratón y el PRLR humano expresados en la superficie de las células

a) Con el objeto de comprender la pérdida de la actividad antiproliferativa del anticuerpo HE06642 que se observó en las células en las que se expresaba el PRLR murino, se analizaron las características de la unión del anticuerpo HE06642 sobre el PRLR de ratón y el PRLR humano expresados en células HEK293 que habían sido

transfectadas de manera estable con los PRLR mencionados, por medio de una citometría de flujo. Se cosecharon las células que se describieron con anterioridad, así como una línea de células HEK293 en las que no se expresaba PRLR alguno, y se las suspendió nuevamente hasta alcanzar una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml, en PBS 1x que contenía 2% de FBS y 0,1% de azida de sodio (que fue el tampón que se usó en la FACS). El anticuerpo HE06642 se sometió a una dilución al medio en el tampón para la FACS hasta alcanzar la concentración final deseada (50  $\mu$ l en cada cavidad de la placa). Al anticuerpo secundario y a los controles autofluorescentes se les agregaron 50  $\mu$ l del tampón para la FACS. En cada cavidad, se colocaron 50  $\mu$ l de la suspensión de células. Las muestras se incubaron a 4°C durante una hora. Se realizaron dos lavados con el tampón para la FACS y se suspendieron nuevamente las muestras en una mezcla que comprendía el tampón para la FACS y una IgG de cabra anti-humano conjugada con PE en una dilución de 1:100. Después de incubar durante 30 minutos 4°C, las células fueron sometidas a dos lavados con el tampón para la FACS frío, fueron suspendidas nuevamente en una mezcla que contenía el tampón para la FACS con 1 mg/ml de yoduro de propidio (de Invitrogen, San Diego, CA) y fueron sometidas a un análisis de citometría de flujo. En la figura 5A puede observarse que el anticuerpo HE06.642 solamente se unió al PRLR humano, y no al PRLR murino. Esta observación es consistente con el descubrimiento que se describe en los ejemplos 2 y 12, que está relacionado con la pérdida de la actividad del anticuerpo HE06.642 que se determinó en un análisis de la proliferación dependiente del PRLR y en un análisis con un gen de luciferasa como indicador.

b) Con el propósito de demostrar la unión del anticuerpo Mat3 a las células en las que se expresaba un PRLR humano o un PRLR de macaco, cuyos dominios extracelulares comprenden secuencias de aminoácidos idénticas a las del dominio extracelular del PRLR de mono cangrejero, se determinaron las características de unión del anticuerpo Mat3 sobre el PRLR humano y el PRLR de macaco expresados en células HEK293 que habían sido transfectadas de manera estable con los PRLR mencionados, por medio de una citometría de flujo. Se cosecharon las células que se describieron con anterioridad, se las centrifugó y se las suspendió nuevamente hasta alcanzar una concentración de aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/ml en PBS 1x que contenía 3% de FBS y 0,05% de azida de sodio (que fue el tampón que se usó en la FACS). El anticuerpo Mat3 se sometió a una dilución al medio en el tampón para la FACS hasta alcanzar la concentración final deseada (50  $\mu$ l en cada cavidad de la placa). Al anticuerpo secundario y a los controles autofluorescentes se les agregaron 50  $\mu$ l del tampón para la FACS. En cada cavidad, se colocaron 50  $\mu$ l de la suspensión de células. Las muestras se incubaron a 4°C durante una hora. Se realizaron dos lavados con el tampón para la FACS y se suspendieron nuevamente las muestras en una mezcla que comprendía el tampón para la FACS y una IgG de cabra anti-humano conjugada con PE en una dilución de 1:100. Después de incubar durante 30 minutos 4°C, las células fueron sometidas a dos lavados con el tampón para la FACS frío, fueron suspendidas nuevamente en una mezcla que contenía el tampón para la FACS con 1 mg/ml de yoduro de propidio (de Invitrogen, San Diego, CA) y fueron sometidas a un análisis de citometría de flujo. En la figura 5B puede observarse que el anticuerpo Mat3 se unió al PRLR humano y al PRLR de macaco. Se determinó que la intensidad máxima de la señal que se obtuvo con la concentración más alta del anticuerpo dependió de la cantidad de moléculas del PRLR que se expresaron en la superficie de las células (ya que las células HEK293 y Ba/F no presentan la misma cantidad de moléculas del PRLR en su superficie). El valor de la CE50 se calculó según las curvas de la respuesta a la dosis que se ilustran en la figura 5B, y sirvió para representar la fuerza de la unión entre el anticuerpo Mat3 y las células (tabla 2). La potencia de la unión entre el anticuerpo Mat3 y el PRLR humano en las células HEK293 fue de 0,53 nM. La potencia de la unión entre el anticuerpo Mat3 y el PRLR de macaco en las células Ba/F fue de 2,94 nM. Según estos datos, puede concluirse que el Mat3 no solamente es un agente muy potente que presenta especificidad por el ser humano, sino que también presenta actividad sobre los PRLR de diversos monos en dosis razonables, que en particular se encuentran en el rango nanomolar inferior.

#### Ejemplo 10

##### Estudios de la unión basados en análisis de resonancia de plasmón superficial con dominios extracelulares de PRLR purificados

La afinidad de unión del anticuerpo Mat3 se determinó por medio de un análisis de resonancia de plasmón superficial, en un instrumento Biacore T100 (de GE Healthcare Biacore, Inc.). Los anticuerpos se inmovilizaron en un chip sensor CM5 por medio de un reactivo de captura indirecta, que fue una región Fc de una IgG anti-humano. Se usaron los reactivos del conjunto de elementos para capturar anticuerpos humanos BR-1008-39, de GE Healthcare Biacore, Inc., de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En cada cavidad, se inmovilizaron aproximadamente 5000 RU de un anticuerpo monoclonal anti-humano de ratón, en forma de una región Fc de una IgG. El anticuerpo Mat3 se inyectó en una concentración de 5  $\mu$ g/ml, a una velocidad de 10  $\mu$ l/minuto durante 10 segundos, de manera tal de alcanzar un nivel de captura de aproximadamente 200-600 RU. Sobre el anticuerpo Mat3 inmovilizado, se inyectaron diversas concentraciones del ECD del PRLR humano, de mono o de ratón (400 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM o 3,12 nM) en un tampón que estaba basado en HEPES-EP (de GE Healthcare Biacore, Inc.), a una velocidad de flujo de 60  $\mu$ l/minuto durante 3 minutos. El período de disociación fue de 10 minutos. Los ECD del PRLR humano (SEQ ID NO: 12), del PRLR de mono (SEQ ID NO: 11, al cual se le suprimió la marca de histidina que estaba unida a una región Fc por medio de una digestión con el factor Xa) y del PRLR de ratón (SEQ ID NO: 13) representaron analitos monovalentes. Se generaron diversos sensogramas después de aplicar una corrección en línea basada en las cavidades de referencia y de sustraer el resultado que se obtuvo con el tampón solo. La constante de disociación en el equilibrio ( $K_D$ ) se calculó según la proporción entre la constante de

asociación ( $k_{on}$ ) y la constante de disociación ( $k_{off} = k_d$ ), que a su vez habían sido calculadas aplicando un modelo basado en una unión de 1:1 de primer orden a los sensogramas con el Software BiaEvaluation. Los valores de la constante de disociación monovalente ( $K_D$ , que representa la afinidad) y de la constante de disociación ( $k_d = k_{off}$ ) se representan en la tabla 1.

## 5 Ejemplo 11

### Análisis de los péptidos

#### a) Síntesis de los péptidos

Para reconstruir los epítomos discontinuos de la molécula deseada, SEQ ID NO: 12, que abarcaba los aminoácidos entre las posiciones 1 y 210 del ECD del PRLR humano, se sintetizó una biblioteca de péptidos estructurados. Esto se llevó a cabo usando una tecnología basada en andamiajes de péptidos unidos a través de enlaces químicos (CLIPS), de Pepscan (Timmerman y col., 2007, J. Mol. Recognit. 20:283-99; Pepscan Therapeutics, Lelystad, Países Bajos). Con la tecnología CLIPS, es posible estructurar los péptidos en rizos individuales, en rizos dobles, en rizos triples, en rizos en forma de láminas, en rizos en forma de hélices o en combinaciones de éstos. Los moldes que se emplearían en el procedimiento CLIPS fueron unidos a restos de cisteína. Las cadenas laterales de varias cisteínas en los péptidos fueron unidas a uno o dos de los moldes que se usarían en el procedimiento CLIPS. Por ejemplo, se mezcló una solución 0,5 mM del molde para CLIPS T2 en 1,3-bis (bromometil) benceno con una mezcla 1:1 (v/v) de bicarbonato de amonio 20 mM y acetonitrilo que tenía un pH de 7,9. Esta fue la solución que se usó con el conjunto de péptidos. De esta manera, los moldes para el procedimiento CLIPS que estaban unidos a los dos restos de cisteína en una fase sólida se unieron a los péptidos en los conjuntos (se analizó un total de 455 cavidades de 3 µl por placa). Los conjuntos de péptidos fueron agitados suavemente mientras estaban completamente sumergidos en la solución, durante un período de entre 30 y 60 minutos. Finalmente, los conjuntos de péptidos fueron lavados exhaustivamente con un exceso de H<sub>2</sub>O y fueron sometidos a una sonicación en un tampón que contenía 1 por ciento de SDS y 0,1 por ciento de beta-mercaptoetanol en PBS y que tenía un pH de 7,2, a una temperatura de 70°C durante un período de 30 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo una sonicación en H<sub>2</sub>O durante 45 minutos adicionales. Los péptidos para el procedimiento CLIPS que comprendían el mold T3 se prepararon de manera similar, excepto que se emplearon tres restos de cisteína.

#### b) ELISA basado en la tecnología Pepscan

La unión del anticuerpo Mat3 y del anticuerpo HE06642 a cada péptido se analizó con un ELISA que estaba basado en la tecnología Pepscan (Slootstra y col., 1996, Molecular Diversity 1: 87-96). Los conjuntos de péptidos fueron preincubados con entre 5% y 100% del tampón de unión (a 20°C durante 1 hora), que estaba compuesto por 1% de Tween-80, 4% de suero de caballo, 5% de ovoalbúmina (todas las proporciones son p/v) en PBS. Después de lavar los conjuntos de péptidos, se los incubó con la solución del anticuerpo primario (en una concentración de entre 1 y 5 µg/ml), en PBS que contenía 1% de Tween-80, a una temperatura de 4°C durante la noche. Posteriormente, se realizó un lavado y se incubaron los conjuntos de péptidos con una dilución de 1/1000 del anticuerpo antihumano deseado conjugado con peroxidasa en el tampón de unión al 100%, a 35°C durante una hora. Se realizó un lavado adicional y se agregaron 2 microlitros/mililitro del sustrato para la peroxidasa, que era sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etil-benzo-tiazolina (ABTS) al 3 por ciento en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Después de una hora, se cuantificó el desarrollo de color con un dispositivo para analizar la carga, una cámara y un sistema para procesar imágenes.

#### c) Procesamiento de los datos

Los datos en bruto eran los valores ópticos que se habían obtenido con la cámara. Los valores variaban entre 0 y 3000 mAU y eran similares entre las 96 pocillos de la placa que se usó en el ELISA. Los resultados se almacenaron en la base de datos Peplab. Según el análisis realizado, fue posible obtener los valores indicativos de la unión. Hubo algunas cavidades que contenían burbujas de aire, por lo que presentaron valores falsamente positivos. Después de realizar una inspección manual de las muestras, a estos resultados falsamente positivos se les asignó un valor de 0.

#### d) Análisis y representación de los datos

Un mapa de calor es una representación gráfica de los datos en la que los valores que se han obtenido en los experimentos se organizan en un mapa bidimensional y se representan en colores (Brinton, 1914, Graphic Methods for Presenting Facts, Nueva York: The Engineering Magazine Company; Gower y Digby, 1981; "Expressing complex relationships in two dimensions", en Interpreting Multivariate Data, editado por Barnett, V., Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons, pp. 83-118). De esta manera, se construyó un mapa bidimensional con la secuencia de cada rizo de los péptidos en forma de rizos dobles que se usaron en el procedimiento CLIPS.

La proteína que se usó como blanco (el ECD del PRLR humano) comprendía secuencias que eran permutaciones de 54 secuencias secundarias propias de los diversos rizos. Como consecuencia, los datos que se obtuvieron a través del ELISA basado en la tecnología Pepscan se representaron en una matriz de 54 x 54, donde cada coordenada en el eje x fue la secuencia de aminoácidos del primer rizo y cada coordenada en el Y fue la secuencia de aminoácidos del segundo rizo. En cada coordenada xy de la matriz se colocó un valor proveniente de un péptido x+y que había sido obtenido a través del ELISA basado en la tecnología Pepscan. Para facilitar la visualización, los valores fueron representados con colores en un gradiente continuo. En este caso, los valores más bajos se

representaron en verde, los valores más altos se representaron en rojo y los valores intermedios se representaron en negro. Cuando se aplicó este mapa de color a la matriz que comprendía los datos que se describieron con anterioridad, se obtuvo el mapa de calor deseado. Con este mapa de calor, se seleccionaron los péptidos que habían presentado las diferencias más notables en el ELISA, en el contexto de su reactividad con el anticuerpo Mat3 y con el anticuerpo HE06642. La señal de cada uno de estos péptidos en el ELISA se representó en un gráfico de barras (figuras 8A y 8B), donde cada valor representó el promedio de los 54 péptidos se usados, en combinación con el error estándar de la media. Los datos fueron normalizados según el promedio del conjunto de 2916 péptidos que se usaron en el experimento. Adicionalmente, se aplicó una corrección basada en el valor de fondo.

En la figura 8A se ilustran los resultados que se obtuvieron en el ELISA con un subconjunto de péptidos que comprendían los aminoácidos 103 a 117, es decir, PDPPELAVEVKQPE, que se representan como "117" en el eje x, y con un subconjunto de péptidos que comprendían los aminoácidos 127 a 141, es decir, WSPPTLIDLKTGWFT, que se representan como "141", que formaban parte de la secuencia de aminoácidos del ECD del PRLR humano, aunque presentaban un desplazamiento de tres aminoácidos en el marco de lectura. En este conjunto de datos, las diferencias más notables se observaron con relación al péptido 109-LAVEVKQPEDRKPYL-123 (que se representa como "123"), con un valor de p de  $4 \times 10^{-12}$ , y con relación al péptido 121-PYLWIKWSPPTLIDL-135 (que se representa como "135"), con un valor de p de  $7 \times 10^{-40}$ .

En la figura 8A se ilustran los resultados que se obtuvieron en el ELISA con un subconjunto de péptidos que comprendían los aminoácidos 139 a 153, es decir, WFTLLYEIRLKPEKA, que se representan como "153" en el eje x, y con un subconjunto de péptidos que comprendían los aminoácidos 163 a 177, es decir, QQTEFKILSLHPGQK, que se representan como "177", que formaban parte de la secuencia de aminoácidos del ECD del PRLR humano, aunque presentaban un desplazamiento de tres aminoácidos en el marco de lectura. En este conjunto de datos, las diferencias más notables se observaron con relación al péptido 148-LKPEKAAEWEIHFAG-162 (que se representa como "162"), con un valor de p de  $6 \times 10^{-26}$ , y con relación al péptido 160-FAGQQTEFKILSLHP-174 (indicado como "174"), con un valor de p de  $8 \times 10^{-8}$ .

Con estos datos, puede demostrarse que los dos anticuerpos se unieron al subdominio S2 del ECD del PRLR humano (que abarca los aminoácidos 101 a 210), por lo que no compitieron con el ligando natural del PRLR, es decir, la PRL, que se une al dominio S1. Sin embargo, con este análisis de los péptidos también se demostró que hay diferencias en la unión a los dominios S2 entre el anticuerpo Mat3 y el anticuerpo HE06642.

Este hallazgo indica por qué el anticuerpo Mat3 muestra una especificidad de especie y potencia diferente en comparación con HE06642.

### Ejemplo 12

#### Inhibición de la actividad del gen indicador de la luciferasa en células HEK293 que fueron transfectadas de manera estable con un PRLR humano o murino

Para analizar con mayor detalle la actividad *in vitro* del anticuerpo neutralizador del PRLR Mat3 sobre el PRLR humano y sobre el PRLR murino, se recurrió a un análisis basado en un gen indicador. En él, se emplearon células HEK293 que habían sido transfectadas de manera estable con un PRLR humano o murino y que habían sido transfectadas de manera transitoria con un gen indicador que codificaba la luciferasa, bajo el control de los LHRE (los elementos que participan en la respuesta a las hormonas lactogénicas). Estas células se sembraron en una densidad de 20000 células por cavidad (80  $\mu$ l), en una placa de 96 pocillos que comprendía un medio DMEM que comprendía 4,5 g/l de glucosa, Glutamax 2 mM, 0,5% de FCS y 1% de penicilina/estreptomina. Al día siguiente, se agregaron 200 ng/ml de prolactina humana (10  $\mu$ l) en combinación con dosis crecientes de los anticuerpos que se deseaba analizar (10  $\mu$ l). Como control, se agregó prolactina humana sin anticuerpos. Veinticuatro horas después, se determinó la actividad de la luciferasa. Con fines comparativos, también se analizó el anticuerpo HE06642 y un anticuerpo no específico denominado CTX, que estaba dirigido a la toxina del cólera. Los anticuerpos analizados tomaron la forma de moléculas de IgG1 (figuras 13A y 13B).

### Ejemplo 13

#### Estudios de la unión basados en análisis de resonancia de plasmón superficial con dominios extracelulares de PRLR purificados

La afinidad de unión de los anticuerpos Mat3 y HE06642 se determinó por medio de un análisis de resonancia de plasmón superficial, en un instrumento Biacore T100 (de GE Healthcare Biacore, Inc.). Los anticuerpos se inmovilizaron en un chip sensor CM5 por medio de un reactivo de captura indirecta, que fue una región Fc de una IgG anti-humano. Se usaron los reactivos del conjunto de elementos para capturar anticuerpos humanos BR-1008-39, de GE Healthcare Biacore, Inc., de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En cada cavidad, se inmovilizaron aproximadamente 5000 RU de un anticuerpo monoclonal anti-humano de ratón, en forma de una región Fc de una IgG. Cada uno de los anticuerpos analizados se inyectó en una concentración de 5  $\mu$ g/ml, a una velocidad de 10  $\mu$ l/minuto durante 10 segundos, de manera tal de alcanzar un nivel de captura de aproximadamente 200-600 RU. Sobre el anticuerpo Mat3 inmovilizado, se inyectaron diversas concentraciones del ECD del PRLR humano, de mono o de ratón (400 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM o 3,12 nM) en un tampón que estaba basado en HEPES-EP (de GE Healthcare Biacore, Inc.), a una velocidad de flujo de 60  $\mu$ l/minuto durante

3 minutos. El período de disociación fue de 10 minutos. Los ECD del PRLR humano (SEQ ID NO: 12), del PRLR de mono (SEQ ID NO: 11, al cual se le suprimió la marca de histidina que estaba unida a una región Fc por medio de una digestión con el factor Xa) y del PRLR de ratón (SEQ ID NO: 13) representaron analitos monovalentes. Se generaron diversos sensogramas después de aplicar una corrección en línea basada en las cavidades de referencia y de sustraer el resultado que se obtuvo con el tampón solo. La constante de disociación en el equilibrio ( $K_D$ ) se calculó según la proporción entre la constante de asociación ( $k_{on}$ ) y la constante de disociación ( $k_{off} = k_d$ ), que a su vez habían sido calculadas aplicando un modelo basado en una unión de 1:1 de primer orden a los sensogramas con el Software BiaEvaluation (véase la tabla 7).

**Tabla 7. Constantes de disociación monovalentes y velocidades de disociación determinadas con dominios extracelulares purificados del PRLR humano, de mono o de ratón (expresados en células HEK293), según una resonancia de plasmón superficial, con los anticuerpos Mat3 y HE06.642**

	PRLR humano		PRLR de mono		PRLR de ratón	
	$K_D$ [M]	$K_d$ [1/s]	$K_D$ [M]	$K_d$ [1/s]	$K_D$ [M]	$K_d$ [1/s]
<b>Mat3</b>	$1,3 \times 10^{-9}$	$4,14 \times 10^{-4}$	$9,6 \times 10^{-9}$	$1,02 \times 10^{-3}$	$0,4 \times 10^{-9}$	$1,64 \times 10^{-4}$
<b>HE06.642#</b>	$0,8 \times 10^{-9}$	$5,33 \times 10^{-4}$	$17 \times 10^{-9}$	$5,79 \times 10^{-3}$	$15,0 \times 10^{-9}$	$9,10 \times 10^{-3}$
#En el documento WO2008/022295, se indica que la afinidad de HE06642 sobre el dominio extracelular del PRLR humano es de $2,6 \times 10^{-9}$ M, que es de $38,9 \times 10^{-9}$ M sobre el dominio extracelular del PRLR de mono cangrejero, y que es de $2,7 \times 10^{-9}$ M sobre el dominio extracelular del PRLR murino.						

En la tabla 7 puede observarse que el anticuerpo Mat3 presenta una afinidad superior a la del anticuerpo HE06.642 sobre el PRLR de mono y de ratón, aunque no sobre el PRLR humano. A pesar de poder unirse al ECD purificado del PRLR de ratón, el anticuerpo HE06.642 no se puede unirse a las células en las que se expresa el PRLR de ratón ni puede inhibir su proliferación (figuras 10 y 14, tabla 8). En contraste, el anticuerpo Mat3 puede bloquear la proliferación de las células de las tres especies en una concentración en el rango nanomolar/subnanomolar.

Adicionalmente, se capturó y se bloqueó una forma soluble del ECD del PRLR (SEQ ID NO: 12) en una superficie de prueba que comprendía los anticuerpos Mat3 y HE06642 inmovilizados. Se hizo pasar PRL sobre esta superficie, y se determinó que ésta podía unirse a los ECD del PRLR inmovilizados, incluso en presencia de los anticuerpos. Según la determinación de que la PRL puede unirse al ECD del PRLR independientemente de la presencia de los anticuerpos Mat3 y HE06.642, puede concluirse que ninguno de los anticuerpos compite con el ligando natural del ECD del PRLR, es decir, la PRL.

**Ejemplo 14**

Estudios de la unión de los anticuerpos en diversas líneas de células en las que se expresaban PRLR humano, de ratón o de mono

Se llevó a cabo un estudio de la unión en células con los anticuerpos Mat3 y HE06642 y con un anticuerpo de control del mismo isotipo que presentaba especificidad por la toxina del cólera, todos en forma de moléculas de IgG1. Las células analizadas fueron células de la línea HEK293 que habían sido transfectadas de manera estable con un PRLR humano o con un PRLR de ratón, así como células de la línea de cáncer de mama humano T47D y células de la línea Ba/F en las que se expresaban PLRL humanos, de ratón o de macaco. La unión en las células se determinó por medio de un análisis de citometría de flujo. Las células se cosecharon, se centrifugaron y se suspendieron nuevamente hasta alcanzar una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml en PBS 1x que contenía 3% de FBS y 0,05% de azida de sodio (que fue el tampón que se usó en la FACS). Cada uno de los anticuerpos analizados se sometió a una dilución al medio en el tampón para la FACS hasta alcanzar la concentración final deseada (50  $\mu$ l en cada cavidad de la placa). Al anticuerpo secundario y a los controles autofluorescentes se les agregaron 50  $\mu$ l del tampón para la FACS. En cada cavidad, se colocaron 50  $\mu$ l de la suspensión de células. Las muestras se incubaron a 4°C durante una hora. Se realizaron dos lavados con el tampón para la FACS y se suspendieron nuevamente las muestras en una mezcla que comprendía el tampón para la FACS y una IgG de cabra anti-humano conjugada con PE en una dilución de 1:100. Después de incubar durante 30 minutos 4°C, las células fueron sometidas a dos lavados con el tampón para la FACS frío, fueron suspendidas nuevamente en una mezcla que contenía el tampón para la FACS con 1 mg/ml de yoduro de propidio (de Invitrogen, San Diego, CA) y fueron sometidas a un análisis de citometría de flujo.

En la figura 14 se representan los datos obtenidos en forma de curvas de respuesta a la dosis, según las cuales fue posible calcular el valor de la CE50, que sería representativo de la potencia de la unión a las células (tabla 8). A partir de los resultados obtenidos, puede concluirse que el anticuerpo Mat3 presentó propiedades de unión superiores a las del anticuerpo HE06.642 en las distintas líneas de células en las que se expresaron los PRLR que se analizaron.

**Tabla 8. Potencia de la unión de los anticuerpos neutralizadores del PRLR Mat3 y He06.642, en forma de moléculas de IgG1, en las células en las que se expresaba un PRLR humano, de mono o de ratón, determinada según un análisis de citometría de flujo**

n.º	Línea de células	Unión a las células (CE <sub>50</sub> [M])	
		Mat3	HE06.642
<b>A</b>	<b>HEK293-PRLR humano</b>	0,8 x 10 <sup>-9</sup>	1,6 x 10 <sup>-9</sup>
<b>B</b>	<b>HEK293-PRLR de ratón</b>	0,1 x 10 <sup>-9</sup>	-*
<b>C</b>	<b>HEK293 sin PRLR</b>	-*	-*
<b>D</b>	<b>T47D humano</b>	0,4 x 10 <sup>-9</sup>	0,8 x 10 <sup>-9</sup>
<b>E</b>	<b>BaF3-PRLR de macaco</b>	1,2 x 10 <sup>-9</sup>	3,2 x 10 <sup>-9</sup>
<b>F</b>	<b>BaF3-PRLR humano</b>	0,1 x 10 <sup>-9</sup>	0,2 x 10 <sup>-9</sup>
<b>G</b>	<b>BaF3-PRLR de ratón</b>	0,2 x 10 <sup>-9</sup>	-*
*no hubo una unión significativa; #los diagramas de la respuesta a la dosis se ilustran en la figura 14			

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft

10 <120> Anticuerpo neutralizante del receptor de prolactina Mat3 y su uso terapéutico

<130> BHC113039

<160> 17

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 005-C04-mat3-VH

25 <400> 1

ES 2 572 215 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Asp Ile Ala Arg Leu Ser Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Leu Asp Ala Arg Arg Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 2  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> 005-C04-mat3-VL

10

<400>2

ES 2 572 215 T3

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly  
 20 25 30

Tyr Val Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu  
 35 40 45

Leu Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu  
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser  
 85 90 95

Leu Asn Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

Gln

5 <210> 3  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> 005-C04-mat3-VH  
 <400> 3

gaggtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60  
 tctgagccg cctcaggctt caccttctcc agctactgga tgcactgggt ccgacaggcc 120  
 cctggcaagg gcctggaatg ggtgtccgat atcgcccggc tgtcctccta caccaactac 180  
 gccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca actccaagaa caccctgtac 240  
 ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcctg 300  
 gacgccagac ggatggacta ttggggccag ggcaccctgg tcaccgtcag ctca 354

15 <210> 4  
 <211> 339  
 <212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> 005-C04-mat3-VL

25 <400>4

ES 2 572 215 T3

```

cagtccgtgc tgaccagcc tcctccgcc tctggcacc ctggccagag agtgaccatc      60

tctgcaaccg gctcctccag caacatcggc gctggctacg tggcgcaactg gtatcagcag    120
ctgcccgga cgcgcccaaa gctgctgac taccggaaca accagcggcc ctccggcgtg     180
cccagacagat tctccggctc caagtccggc acctccgcct cctggccat ctccggcctg    240
agatctgagg acgaggccga ctactactgc gccgcctggg acgactccct gaacggctgg     300
ctgttcggcg gaggcaccaa gttaaccgtg ctgggccag                               339

```

5 <210> 5  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> 005-C04-mat3-HCDR1  
 <400> 5

Phe Ser Ser Tyr Trp Met His Trp  
 1 5

15 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> 005-C04-mat3-HCDR2  
 <400> 6

Ser Asp Ile Ala Arg Leu Ser Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 1 5 10 15

25 Lys Gly Arg

30 <210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> 005-C04-mat3-HCDR3  
 <400> 7

Ala Arg Gly Leu Asp Ala Arg Arg Met Asp Tyr  
 1 5 10

40 <210> 8  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 572 215 T3

<220>  
<223> 005-C04-mat3-LCDR1

<400> 8

5

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His  
1 5 10

<210> 9  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10

<220>  
<223> 005-C04-mat3-LCDR2

15

<400> 9

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser  
1 5

20

<210> 10  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25

<220>  
<223> 005-C04-mat3-LCDR3

<400> 10

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp  
1 5 10

30

<210> 11  
<211> 453  
<212> PRT  
<213> *Macaca fascicularis*

35

<400> 11

ES 2 572 215 T3

Gln Leu Pro Pro Gly Lys Pro Glu Ile Phe Lys Cys Arg Ser Pro Asn  
 1 5 10 15

Lys Glu Thr Phe Thr Cys Trp Trp Arg Pro Gly Thr Asp Gly Gly Leu  
 20 25 30

Pro Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Tyr His Arg Glu Gly Glu Thr Leu Met  
 35 40 45

His Glu Cys Pro Asp Tyr Ile Thr Gly Gly Pro Asn Ser Cys His Phe  
 50 55 60

Gly Lys Gln Tyr Thr Ser Met Trp Arg Thr Tyr Val Met Met Val Asn  
 65 70 75 80

Ala Thr Asn Gln Met Gly Ser Ser Phe Ser Asp Glu Leu Tyr Val Asp  
 85 90 95

ES 2 572 215 T3

Val Thr Tyr Ile Val Gln Pro Asp Pro Pro Leu Glu Leu Thr Val Glu  
 100 105 110

Val Lys Gln Pro Glu Asp Arg Lys Pro Tyr Leu Trp Met Lys Trp Ser  
 115 120 125

Pro Pro Thr Leu Ile Asp Leu Lys Thr Gly Trp Phe Thr Leu Leu Tyr  
 130 135 140

Glu Ile Arg Leu Lys Pro Glu Lys Ala Ala Glu Trp Glu Thr His Phe  
 145 150 155 160

Ala Gly Gln Gln Thr Glu Phe Lys Ile Leu Ser Leu His Pro Gly Gln  
 165 170 175

Lys Tyr Leu Val Gln Val Arg Cys Lys Pro Asp His Gly Tyr Trp Ser  
 180 185 190

Ala Trp Ser Pro Ala Thr Phe Ile Gln Ile Pro Ser Asp Phe Ile Met  
 195 200 205

Asn Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
 210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

ES 2 572 215 T3

	355		360		365														
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn				
	370					375					380								
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser				
385					390					395					400				
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg				
			405						410					415					
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu				
			420					425					430						
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	His				
	435						440					445							
His	His	His	His	His															
	450																		

- 5
- <210> 12
  - <211> 222
  - <212> PRT
  - <213> *Homo sapiens*
  - <400> 12

ES 2 572 215 T3

Gln Leu Pro Pro Gly Lys Pro Glu Ile Phe Lys Cys Arg Ser Pro Asn  
 1 5 10 15

Lys Glu Thr Phe Thr Cys Trp Trp Arg Pro Gly Thr Asp Gly Gly Leu  
 20 25 30

Pro Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Tyr His Arg Glu Gly Glu Thr Leu Met  
 35 40 45

His Glu Cys Pro Asp Tyr Ile Thr Gly Gly Pro Asn Ser Cys His Phe  
 50 55 60

Gly Lys Gln Tyr Thr Ser Met Trp Arg Thr Tyr Ile Met Met Val Asn  
 65 70 75 80

Ala Thr Asn Gln Met Gly Ser Ser Phe Ser Asp Glu Leu Tyr Val Asp  
 85 90 95

Val Thr Tyr Ile Val Gln Pro Asp Pro Pro Leu Glu Leu Ala Val Glu  
 100 105 110

Val Lys Gln Pro Glu Asp Arg Lys Pro Tyr Leu Trp Ile Lys Trp Ser  
 115 120 125

Pro Pro Thr Leu Ile Asp Leu Lys Thr Gly Trp Phe Thr Leu Leu Tyr  
 130 135 140

Glu Ile Arg Leu Lys Pro Glu Lys Ala Ala Glu Trp Glu Ile His Phe  
 145 150 155 160

Ala Gly Gln Gln Thr Glu Phe Lys Ile Leu Ser Leu His Pro Gly Gln  
 165 170 175

Lys Tyr Leu Val Gln Val Arg Cys Lys Pro Asp His Gly Tyr Trp Ser  
 180 185 190

Ala Trp Ser Pro Ala Thr Phe Ile Gln Ile Pro Ser Asp Phe Thr Met  
 195 200 205

Asn Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp His His His His His His  
 210 215 220

<210> 13  
 <211> 222  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 13

Gln Ser Pro Pro Gly Lys Pro Glu Ile His Lys Cys Arg Ser Pro Asp  
 1 5 10 15

Lys Glu Thr Phe Thr Cys Trp Trp Asn Pro Gly Ser Asp Gly Gly Leu  
 20 25 30

Pro Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Tyr Ser Lys Glu Gly Glu Lys Asn Thr  
 35 40 45

Tyr Glu Cys Pro Asp Tyr Lys Thr Ser Gly Pro Asn Ser Cys Phe Phe  
 50 55 60

Ser Lys Gln Tyr Thr Ser Ile Trp Lys Ile Tyr Ile Ile Thr Val Asn  
 65 70 75 80

Ala Thr Asn Glu Met Gly Ser Ser Thr Ser Asp Pro Leu Tyr Val Asp  
 85 90 95

Val Thr Tyr Ile Val Glu Pro Glu Pro Pro Arg Asn Leu Thr Leu Glu  
 100 105 110

Val Lys Gln Leu Lys Asp Lys Lys Thr Tyr Leu Trp Val Lys Trp Leu  
 115 120 125

Pro Pro Thr Ile Thr Asp Val Lys Thr Gly Trp Phe Thr Met Glu Tyr

130

135

140

Glu Ile Arg Leu Lys Ser Glu Glu Ala Asp Glu Trp Glu Ile His Phe  
 145 150 155 160

Thr Gly His Gln Thr Gln Phe Lys Val Phe Asp Leu Tyr Pro Gly Gln  
 165 170 175

Lys Tyr Leu Val Gln Thr Arg Cys Lys Pro Asp His Gly Tyr Trp Ser  
 180 185 190

Arg Trp Gly Gln Glu Lys Ser Ile Glu Ile Pro Asn Asp Phe Thr Leu  
 195 200 205

Lys Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp His His His His His His  
 210 215 220

5 <210> 14  
 <211> 124

ES 2 572 215 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> proteína VH

<400> 14

```

    Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
    1                               5                               10                               15

    Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
                                20                               25                               30

    Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                                35                               40                               45

    Ala Thr Val Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
    50                               55                               60

    Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
    65                               70                               75                               80

    Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                                85                               90                               95

    Ala Arg His Arg Gly Asn Tyr Tyr Ala Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
                                100                              105                              110

    Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                                115                               120
    
```

10 <210> 15  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> proteína VL

20 <400> 15

ES 2 572 215 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 Gly Tyr Thr Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Pro Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Gly  
 85 90 95  
 Glu Leu Pro Pro Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110

Ala

- 5 <210> 16
- <211> 372
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <223> ADN de VH
- <400> 16

gagggtgcagc tcgtggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60  
 agctgcgccg tgagcggctt caccttcagc agctacggca tgagctgggt gcgccaggct 120  
 cctggcaagg gactggaatg ggtggccacc gtgtccagcg gcggcaccta cacctactac 180  
 cccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240  
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagacaccgg 300  
 ggcaactact acgccaccta ctactatgcc atggactact ggggccaggg caccctggtg 360  
 accgtgagct ca 372

- 15 <210> 17
- <211> 339
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> ADN de VL

ES 2 572 215 T3

<400> 17

```
gatatcgtgc tgacctagag ccccgacagc ctggccgtga gcctgggcca gcgggccacc      60
atcaactgca aggccagcaa gtccgtgagc accagcggct acacctacat gcaactggtat      120
cagcagaagc ccggccagcc ccccaagctg ctgatctacc tggccagcaa ccgggagagc      180
ggcgtgcccg accggtttag cggcagcggc tccggcaccg acttcaccct gaccatcagc      240
cccgtgcagg ccgaggacgt ggccacctac tactgccagc acagcggcga gctgcccccc      300
agcttcggcc agggcaccaa gctggaaatc aagcgggcc      339
```

**REIVINDICACIONES**

1. El anticuerpo Mat3 o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que antagonizan la señalización mediada por el receptor de prolactina, en el que el anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno comprenden
  - a. una región variable pesada con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, y
  - b. una región variable ligera con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.
2. El anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno del mismo consisten en una región de unión a antígeno que se une específicamente a una o más regiones del dominio extracelular del receptor de prolactina (PRLR) humano, de mono y de ratón, y en el que las secuencias de aminoácidos del PLRL humano son representadas por las secuencias de aminoácidos desde la posición 1 a la 210 de la SEQ ID NO: 12 y las variantes polimórficas humanas de la SEQ ID NO: 12, por las secuencias de aminoácidos desde la posición 1 a la 210 de PRLR de mono de acuerdo con la SEQ ID NO: 11 y de PRLR de ratón de acuerdo con la SEQ ID NO: 13.
3. El anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la realización 2, en el que la afinidad por el dominio extracelular de PRLR humano, de mono y de ratón es de 100 nM, menor de 20 nM o con una afinidad de 10 nM, y en el que la afinidad se ha medido mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, Biacore.
4. El anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo consiste en una región de unión a antígeno que se une específicamente a una o más regiones del dominio extracelular de PRLR humano y en el que la afinidad es de 10 nM o 1 nM, y en el que la afinidad se ha medido mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, Biacore.
5. El anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que los dominios constantes de cadena pesada son de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 modificados o sin modificar.
6. Una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una secuencia de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 6, en la que las secuencias de ácido nucleico son de acuerdo con las SEQ ID NO: 3 y 4.
8. Un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 6 o 7.
9. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 8 o una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6 o 7, en la que la célula huésped es una célula huésped eucariota superior, una célula huésped eucariota inferior, o una célula procarionota.
10. La célula huésped de la reivindicación 9, en la que la célula huésped eucariota superior es una célula de mamífero.
11. La célula huésped de la reivindicación 9, en la que la célula huésped eucariota inferior es una célula de levadura.
12. La célula huésped de la reivindicación 9, en la que la célula procarionota es una célula bacteriana.
13. Un procedimiento para usar la célula huésped de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 para producir un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 9 en condiciones adecuadas y recuperar dicho anticuerpo.
14. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno producido mediante el procedimiento de la reivindicación 13.
15. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que está purificado hasta al menos un 95% de homogeneidad en peso.
16. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como un medicamento.
17. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende excipientes y agentes auxiliares.
18. Un kit que comprende un anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo Mat3, envasado en un recipiente, conteniendo dicho kit opcionalmente un segundo agente terapéutico, y comprendiendo además una etiqueta unida o empaquetada con el envase que describe los contenidos del envase y que proporciona indicaciones y/o instrucciones relativas al uso de los contenidos del envase para tratar

- la endometriosis, la adenomiosis, la enfermedad benigna de mama y la mastalgia, la inhibición de la lactancia, la pérdida de cabello hiper- y normoprolactinémica, la hiperplasia benigna de próstata, los fibroides o para su uso como anticonceptivo femenino no hormonal o para tratar a mujeres en terapia hormonal combinada, la terapia de estrógeno más progestina, para inhibir la proliferación de células epiteliales mamarias o para el tratamiento y prevención del cáncer de mama resistente a antiestrógenos.
- 5
19. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la endometriosis, la adenomiosis y la endometriosis interna.
20. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un medicamento para el tratamiento de la enfermedad benigna de mama y la mastalgia.
- 10
21. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer de mama resistente a antiestrógenos.
22. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17 que comprende anticuerpos contra PRLR o fragmentos de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en combinación con al menos otro agente adicional.
- 15

Figura 1: Expresión de prolactina en endometrio eutópico de pacientes y controles sanos y en lesiones endometriósicas

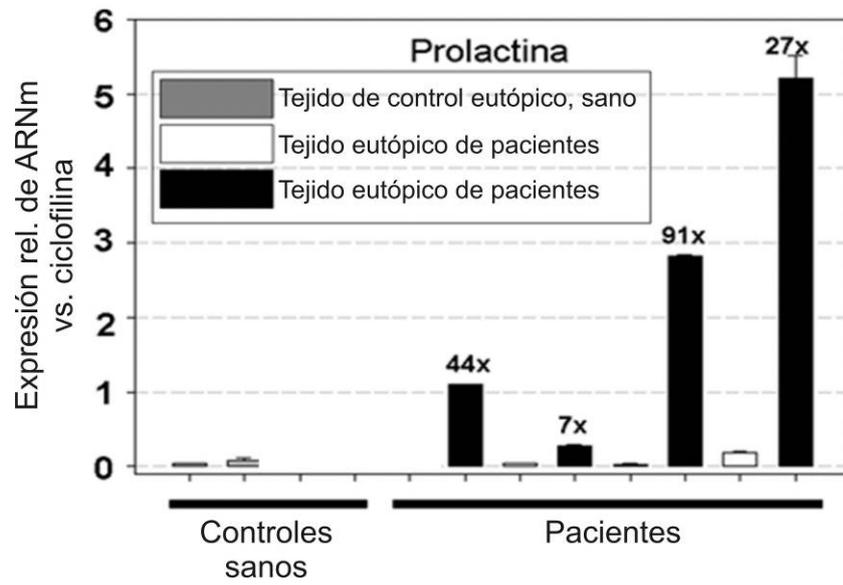


Figura 2: Expresión del receptor de prolactina en endometrios eutópicos de pacientes y controles sanos y en lesiones endometriósicas

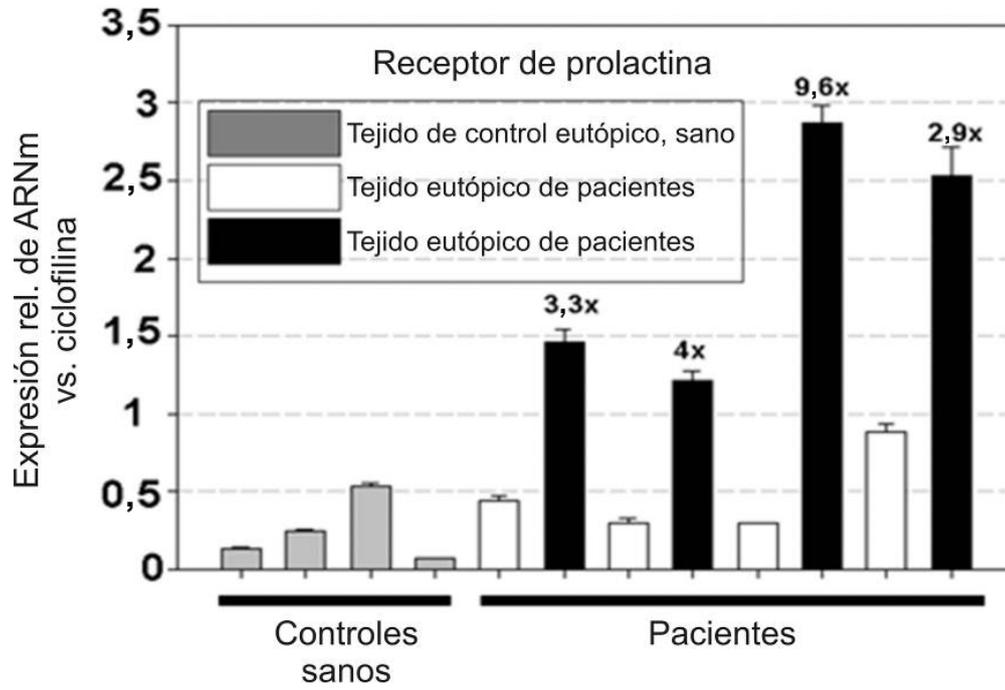


Figura 3: Efecto del anticuerpo neutralizador Mat3 contra PRLR en un modelo de ratón hiperprolactinémico de enfermedad mamaria benigna

A Inhibición de ramificación lateral en la glándula mamaria por el anticuerpo neutralizador Mat3 contra PRLR

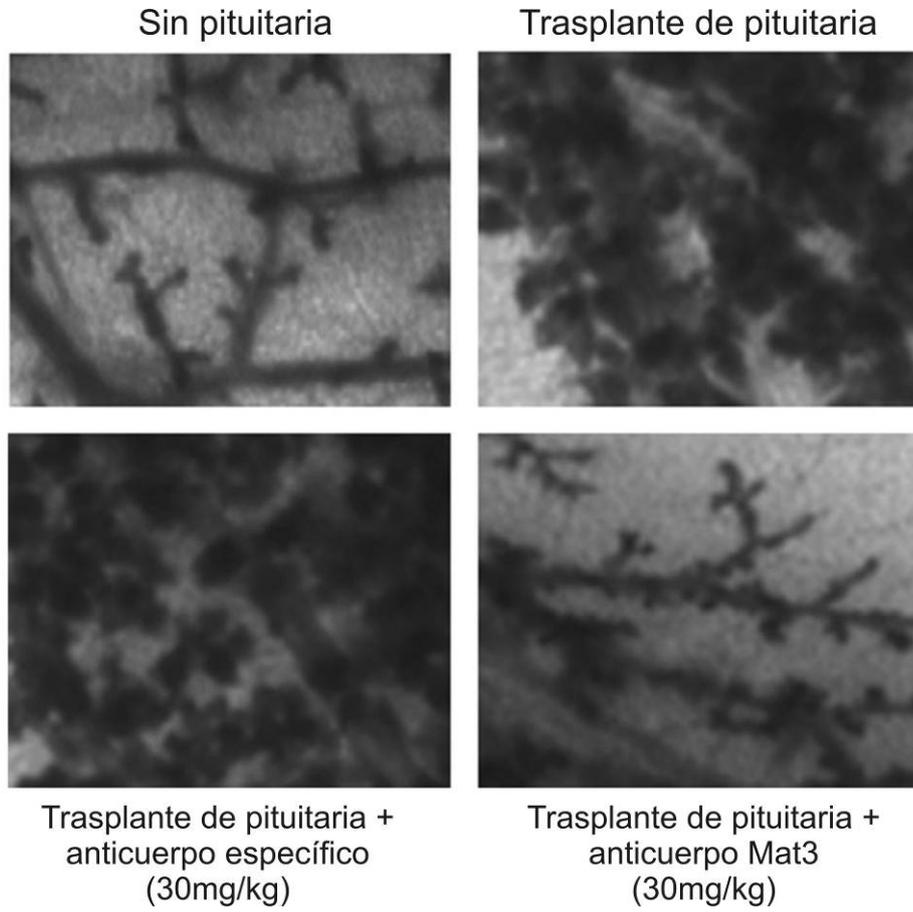
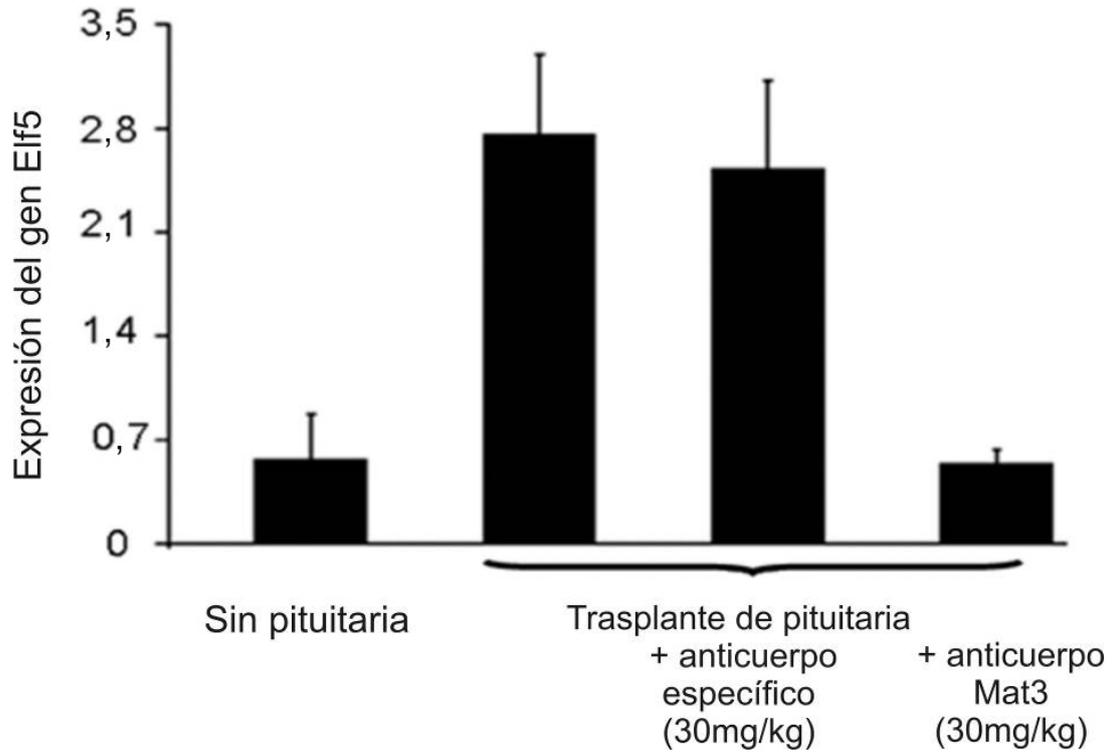


Figura 3: Efecto del anticuerpo neutralizador de PRLR Mat3 en un modelo de ratón hiperprolactinémico de enfermedad mamaria benigna

B Inhibición de la expresión del gen blanco de prolactina elf5



# ES 2 572 215 T3

Figura 4: Numeración de Kabat de las posiciones de aminoácidos del marco de trabajo de acuerdo a Johnson y Wu (Nucleic Acids Res. 2000, 28, 214-218)

Cadena VL	
Kabat No. LFR1	L1 L2 L3 L4 L5 L6 L7 L8 L9 L11 L12 L13 L14 L15 L16 L17 L18 L19 L20 L21 L22 L23 Q/D S/I V L T Q P P S A S G T P G Q R V T I S C
Kabat No. LCDR1	L24 - L34 (X)n
Kabat No. LFR2	L35 L36 L37 L38 L39 L40 L41 L42 L43 L44 L45 L46 L47 L48 L49 W Y Q Q L P G T A P K L L I Y
Kabat No. LCDR2	L50 - L56 (X)n
Kabat No. LFR3	L57 L58 L59 L60 L61 L62 L63 L64 L65 L66 L67 L68 L69 L70 L71 L72 L73 L74 L75 L76 L77 L78 G V P D R F S G S K S G T S A S L A I S G L
Kabat No. LFR3	L79 L80 L81 L82 L83 L84 L85 L86 L87 R S E D E A D Y Y
Kabat No. LCDR3	L88 - L97 (X)n
Kabat No. LFR4	L98 L99 L100 L101 L102 L103 L104 L105 L106 L107 L108 L109 F G G G T K L T V L G Q
Cadena VH	
Kabat No. HFR1	H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16 H17 H18 H19 H20 H21 H22 E/Q V Q/E L L E S G G L V Q P G G S L R L S C
Kabat No. HFR1	H23 H24 H25 H26 H27 H28 A A S G F T
Kabat No. HCDR1	H29 - H36 (X)n
Kabat No. HFR2	H37 H38 H39 H40 H41 H42 H43 H44 H45 H46 H47 V R Q A P G K G L E W
Kabat No. HCDR2	H48 - H66 (X)n
Kabat No. HFR3	H67 H68 H69 H70 H71 H72 H73 H74 H75 H76 H77 H78 H79 H80 H81 H82 H82A H82B H82C H83 H84 H85 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E
Kabat No. HFR3	H86 H87 H88 H89 H90 H91 H92 D T A V Y Y C
Kabat No. HCDR3	H93 - H102 (X)n
Kabat No. HFR4	H103 H104 H105 H106 H107 H108 H109 H110 H111 H112 H113 W G Q G T L V T V S S

Figura 5A

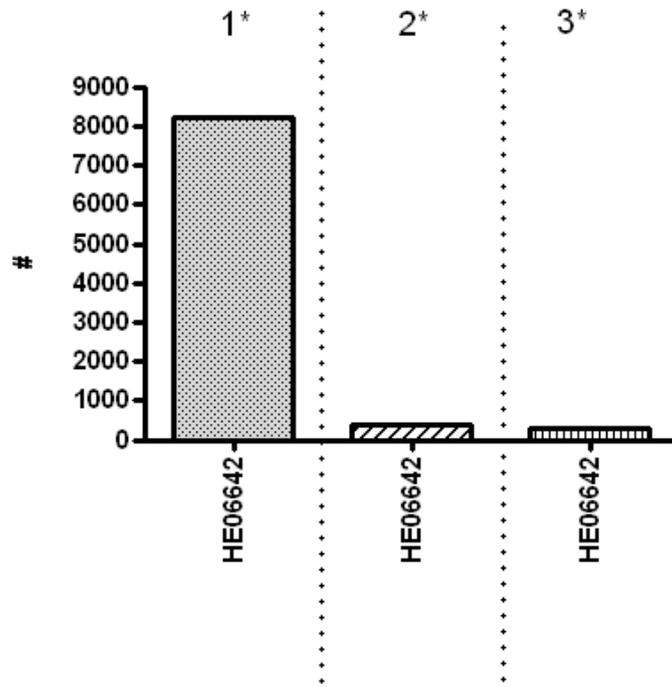


Figura 5B

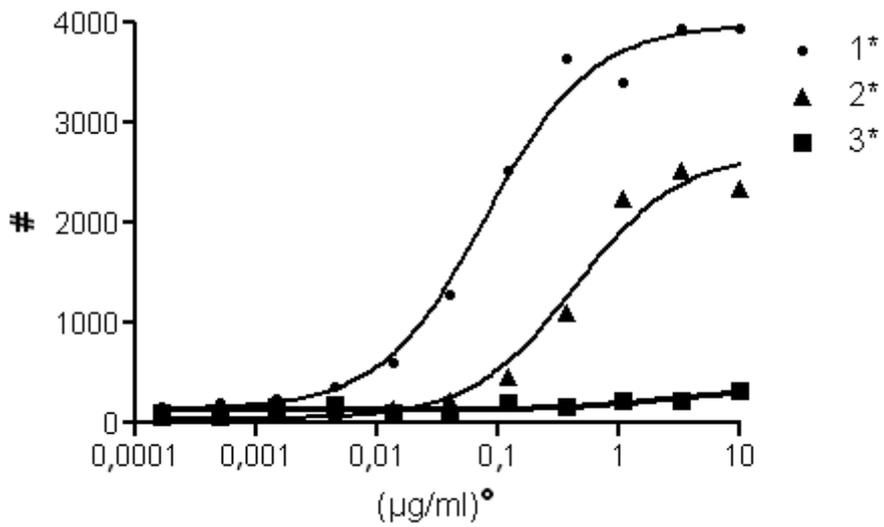


Figura 6A

		Sección 1
	(1) 1                    10                    20                    30                    46	
Mat3-VL	(1) QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVVHWYQQLPGTAP	
VBASE2:humlGL V056	(1) QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVVHWYQQLPGTAP	
Consenso	(1) QSVLTQPPS SG PGQRVTISCTGSSSNIGAGYVVHWYQQLPGTAP	
		Sección 2
	(47) 47                    60                    70                    80                    92	
Mat3-VL	(47) KLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAA	
VBASE2:humlGL V056	(47) KLLIYGNSNRPSGVPDQFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCKA	
Consenso	(47) KLLIY N RPSGVPD FSGSKSGTSASLAI GL SEDEADYYC A	
		Sección 3
	(93) 93    97	
Mat3-VL	(93) WDDSL	
VBASE2:humlGL V056	(93) WDNSL	
Consenso	(93) WD SL	

Figura 6B

		Sección 1
	(1) 1                    10                    20                    30                    46	
Mat3-VH	(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLE	
VBASE2:humIGHV313	(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE	
Consenso	(1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY M WVRQAPGKGLE	
		Sección 2
	(47) 47                    60                    70                    80                    92	
Mat3-VH	(47) WVS DIARLSSYTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA	
VBASE2:humIGHV313	(47) WVS VIYSGGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA	
Consenso	(47) WVS I S T YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA	
		Sección 3
	(93) 93    98	
Mat3-VH	(93) VYYCAR	
VBASE2:humIGHV313	(93) VYYCAK	
Consenso	(93) VYYCA	

Figura 6C

		Sección 1
	(1) 1                    10                    20                    30                    45	
HE06442-VL	(1) DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASKSVSTSG--YTYMHWYQQK	
VBASE2:humIGKV083	(1) DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQK	
Consenso	(1) DIV TQSPDSLAVSLGERATINCK S SV S Y WYQQK	
		Sección 2
	(46) 46                    60                    70                    80                    90	
HE06442-VL	(44) PGQPPKLLIYLASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISPVAEDVA	
VBASE2:humIGKV083	(46) PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVA	
Consenso	(46) PGQPPKLLIY AS RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS QAEDVA	
		Sección 3
	(91) 91                    100	
HE06442-VL	(89) TYYCQHSGEL	
VBASE2:humIGKV083	(91) VYYCQQYYST	
Consenso	(91) YYCQ	

Figura 6D

					Sección 1	
	(1)	1	10	20	30	46
HE06442-VH	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLE				
VBASE2:humIGHV313	(1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE				
Consenso	(1)	EVQL ESGGGLVQPGGSLRLSCA SGFTFSSY MSWVRQAPGKGLE				
						Sección 2
	(47)	47	60	70	80	92
HE06442-VH	(47)	WVATVSSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA				
VBASE2:humIGHV313	(47)	WVSVIYSGGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA				
Consenso	(47)	WV	SGG	TYY	DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA	
						Sección 3
	(93)	93	98			
HE06442-VH	(93)	VYYCAR				
VBASE2:humIGHV313	(93)	VYYCAK				
Consenso	(93)	VYYCA				

Figura 7

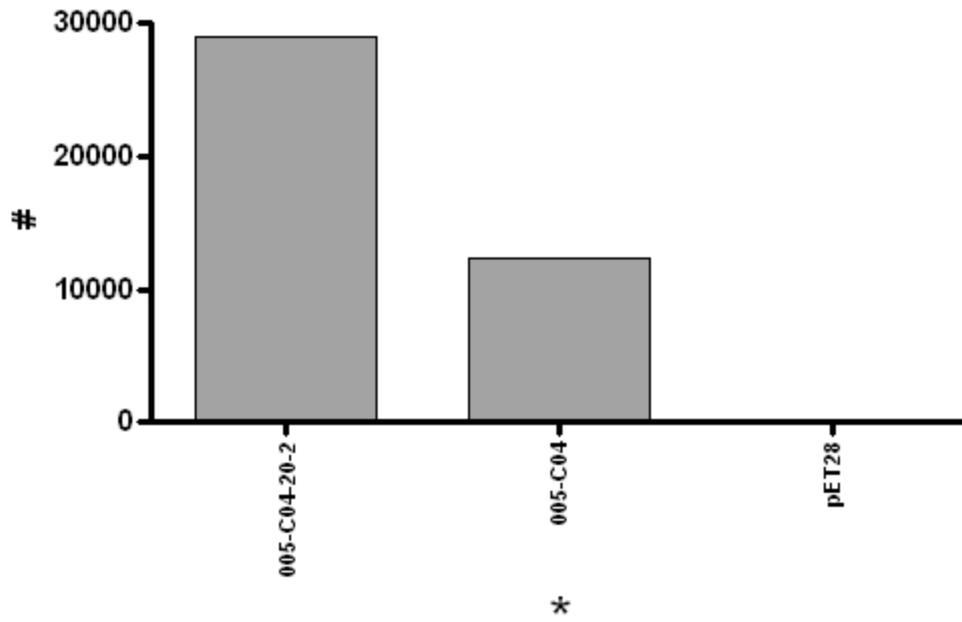


Figura 8A

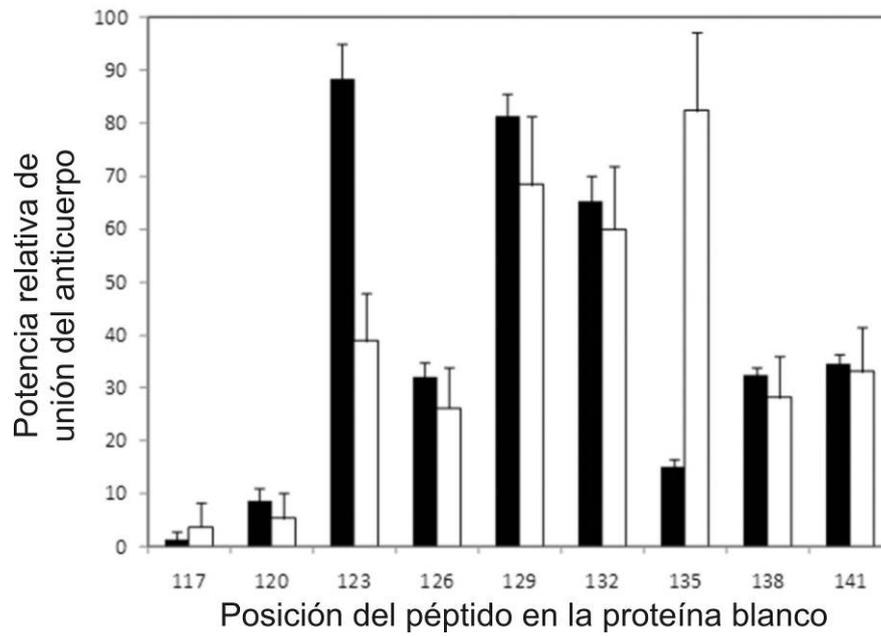


Figura 8B

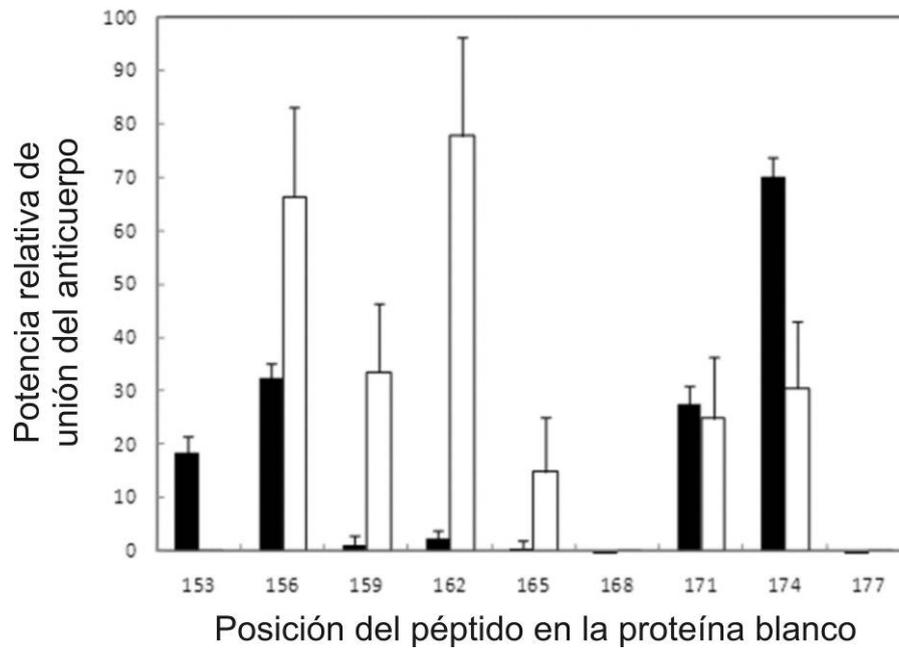


Figura 9

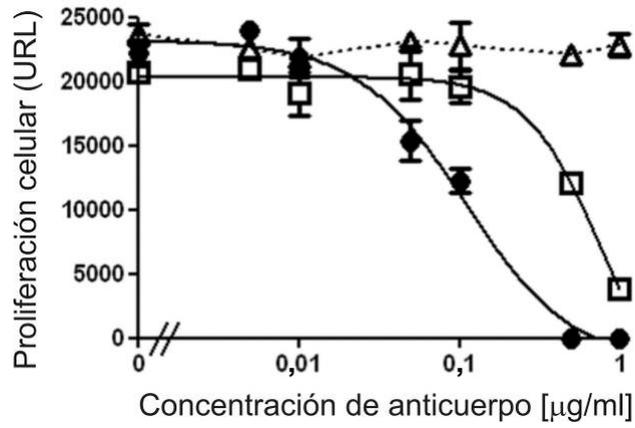


Figura 10

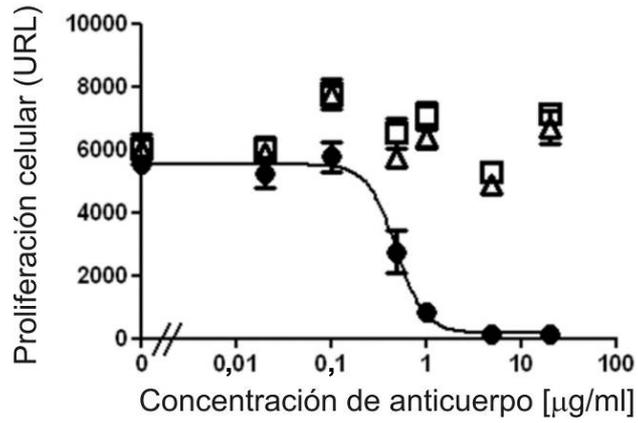


Figura 11A

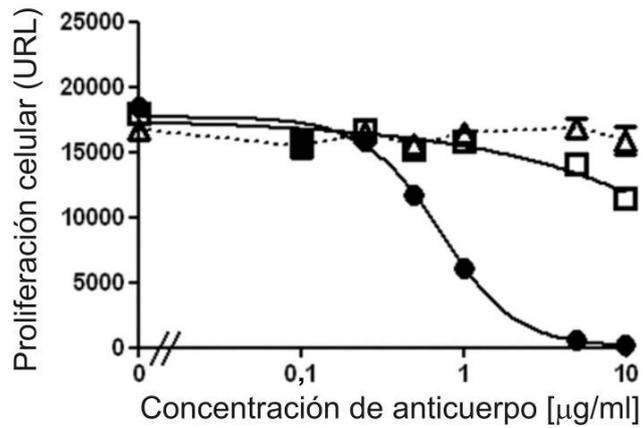


Figura 11B

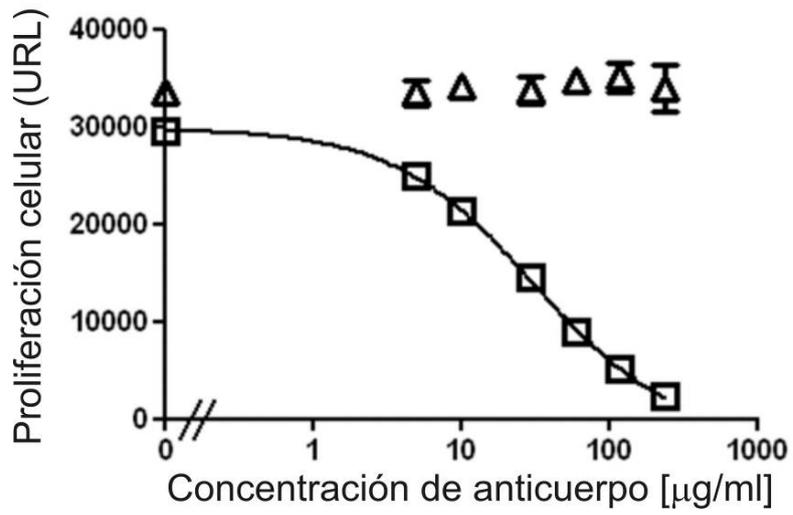


Figura 12

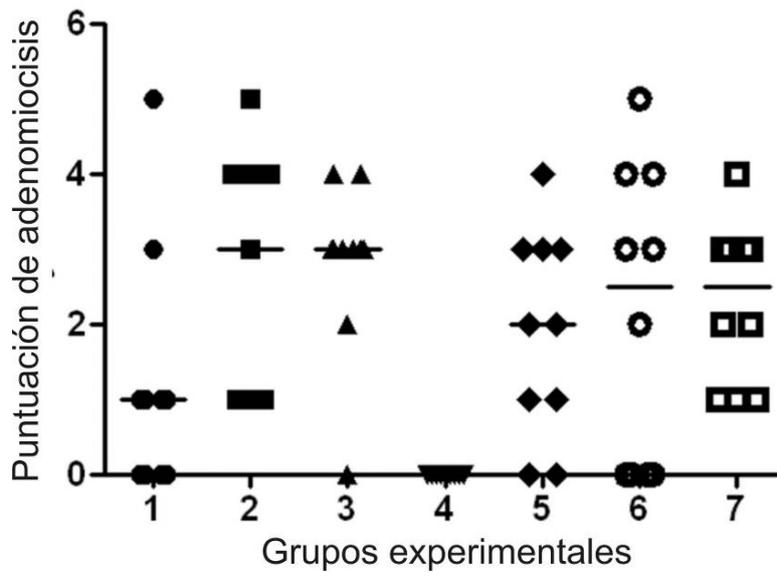


Figura 13A

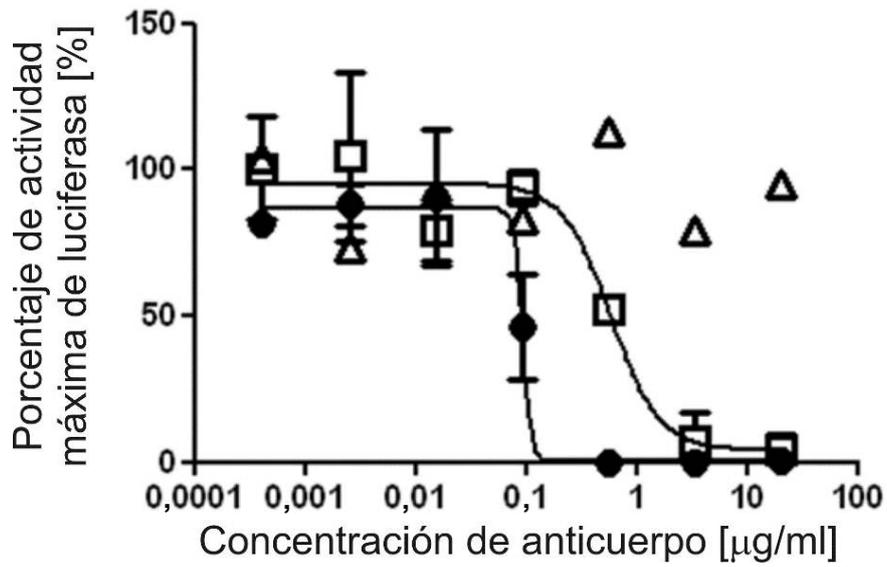


Figura 13B

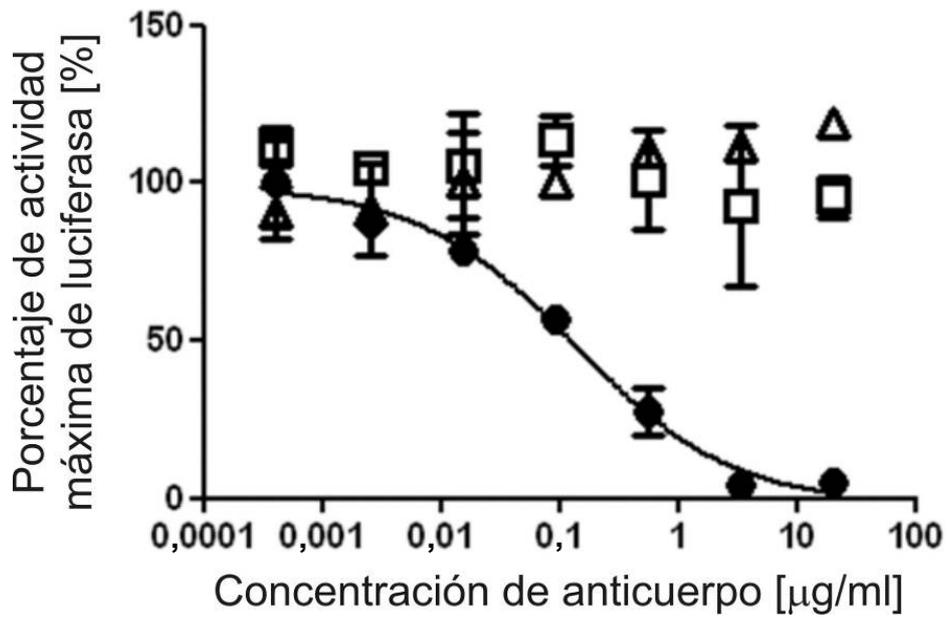


Figura 14

