

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 568**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2013 PCT/GB2013/050580**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13132267**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2013 E 13709521 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2822573**

54 Título: **Tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:  
**09.03.2012 US 201261608872 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.12.2017**

73 Titular/es:  
**UCL BUSINESS PLC. (100.0%)  
The Network Building 97 Tottenham Court Road  
London W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:  
**GREENWOOD, JOHN;  
MOSS, STEPHEN y  
WANG, XIAOMENG**

74 Agente/Representante:  
**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 647 568 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

Tratamiento de cáncer

5 **Campo de la invención**

La invención está en el campo de la fisiología molecular y se refiere al uso de antagonistas de la alfa-2-glicoproteína 1 rica en leucina (Lrg1) para uso en el tratamiento o la prevención de cáncer.

10 **Antecedentes de la invención**

El término cáncer se refiere a una amplia serie de crecimientos neoplásicos malignos, que pueden surgir de la transformación de muchos tipos celulares normales. El cáncer puede estar asociado con muchos cambios diferentes en los fenotipos celulares. Sin embargo, todos los cánceres implican crecimiento celular desregulado. Existen muchos tipos diferentes de fármacos antineoplásicos. Sin embargo, muchos de estos están asociados con efectos secundarios indeseables, con frecuencia como resultado de la dirección no específica de células no cancerosas. Además, los fármacos convencionales que son más específicos de cáncer tienden a serlo para un número limitado de cánceres particulares.

20 Fármacos quimioterapéuticos convencionales tales como cisplatino actúan inhibiendo la mitosis. Estos agentes no son, sin embargo, específicos de células cancerosas, sino que en su lugar afectarán a todas las células de división rápida. Por lo tanto, pueden verse con frecuencia afectadas inintencionadamente células no cancerosas pero de división rápida, tales como células que reemplazan el epitelio intestinal.

25 De forma similar, el efecto de agentes que bloquean la actividad del factor de crecimiento, tales como inhibidores de tirosina quinasa tales como imatinib o anticuerpos para factores de crecimiento o sus receptores, no estará restringido a células neoplásicas. Agentes tales como interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL2), que pueden usarse para tratar cánceres de riñón, también pueden afectar a células no cancerosas.

30 La terapia hormonal es otro tratamiento de cáncer común. Este tipo de terapia solamente es adecuado para ciertos cánceres, concretamente los que son sensibles a hormonas o dependientes de hormonas. Por ejemplo, el tamoxifeno bloquea el receptor de estrógenos y puede usarse en el tratamiento de cáncer de mama. Sin embargo, células no cancerosas que son sensibles a o dependientes de la dirección a hormonas también pueden verse afectadas por terapia hormonal, lo que conduce a efectos secundarios indeseables.

35 Otros agentes antineoplásicos, tales como anticuerpos monoclonales son más específicos, pero actúan solamente en un tipo de cáncer particular, por ejemplo, cáncer de mama, o incluso subgrupos particulares de un cáncer. Por ejemplo, trastuzumab (Herceptina) puede usarse solamente para tratar cáncer HER2 positivo, típicamente cánceres de mama o adenocarcinomas de estómago HER2 positivos. Un enfoque terapéutico alternativo ha sido dirigir al ambiente inmunosupresor localizado dentro del tumor mediante enfoques que incluyen terapia génica.

45 Adicionalmente, para ciertos cánceres, particularmente tumores sólidos, una vez que el cáncer crece más allá de un cierto tamaño, la difusión ya no es suficiente para proporcionar oxígeno y nutrientes para mantener el crecimiento. Estos tumores deben después desarrollar vasos sanguíneos, típicamente mediante angiogénesis, para satisfacer sus necesidades metabólicas. Por lo tanto, otros fármacos antineoplásicos convencionales incluyen agentes antiangiogénicos que influyen en el desarrollo de la vasculatura tumoral, y de este modo limitan el crecimiento tumoral. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti VEGF bevacizumab (Avastin) es una terapia de cáncer antiangiogénica conocida.

50 Sin embargo, no todos los cánceres requieren el desarrollo de vasculatura tumoral para crecimiento continuado. Por ejemplo los mielomas y las leucemias, aunque incluso aquí hay indicios de que la proliferación de células tumorales en la médula ósea puede ser sensible a antiangiogénicos. Además, incluso para cánceres que requieran el crecimiento de vasos sanguíneos, algunos tumores pueden no ser sensibles a la terapia antiangiogénica. Como alternativa, puede ser deseable dirigirse a múltiples procesos tales como angiogénesis tumoral, neoplasia y el sistema inmunitario simultáneamente para inducir un efecto antineoplásico mayor.

55 Existe por lo tanto la necesidad de identificar dianas terapéuticas alternativas y fármacos nuevos que, aislados o en combinación con terapias existentes, puedan ser más eficaces, adecuados para tratar una amplia serie de cánceres y poseer menos efectos fuera de la diana para el tratamiento del cáncer.

60 **Sumario de la invención**

Se identificó la alfa-2-glicoproteína 1 rica en leucina (identificadores génicos de Lrg1: HGNC: 29480; Entrez Gene: 116844; Ensembl: ENSG00000171236; UniProtKB: P02750) en 1977 (Haupt y Baudner, 1977) y su estructura primaria se determinó en 1985 (Takahashi *et al*, 1985). Lrg1 está altamente conservada evolutivamente entre ratones y seres humanos, están disponibles en el mercado anticuerpos policlonales para Lrg1 humana y existen

informes de aumentos simultáneos en el nivel de factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1), receptor de TGFβ II (TGFβRII) y Lrg1 en ciertas enfermedades (Sun *et al*, 1995; Li *et al*, 1997). Otros grupos han identificado Lrg1 como un biomarcador de ciertas enfermedades (documentos US 2005/0064516, WO 2008/092214) y como un ligando para el citocromo c (documento US 2007/0184503). Lynch *et al*. (2012) demuestran que el microARN-335 (miR-335) se dirige a Lrg1 lo que conduce a migración e invasión reducida de células de neuroblastoma reduciendo el estado de fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC).

Los presentes inventores han mostrado previamente que la alfa-2-glicoproteína 1 rica en leucina es una diana a la que puede dirigirse un fármaco para la modulación de remodelación vascular patógena. Por lo tanto, los inventores han predicho que el antagonismo de Lrg1 puede ser útil en el tratamiento de afecciones en las que se produce remodelación vascular patógena o angiogénesis patógena, particularmente en el ojo en afecciones tales como AMD neovascular, retinopatía diabética y retinopatía del prematuro (documento WO 2011/027129). Sin embargo, los inventores han descubierto ahora que Lrg1 tiene un efecto directo en células neoplásicas así como función de células inmunitarias, y por lo tanto puede usarse como una diana en el tratamiento y/o la prevención de cáncer afectando directamente a estas células.

Los presentes inventores han identificado ahora Lrg1 como una diana a la que puede dirigirse un fármaco para el tratamiento y/o prevención de cáncer. En particular, los inventores han demostrado que la dirección a Lrg1 tiene un efecto directo en células neoplásicas, y por lo tanto la dirección Lrg1 también puede usarse para tratar y/o prevenir cáncer por este efecto directo en células cancerosas, específicamente regulando negativamente la proliferación de células neoplásicas, en lugar de mediante un efecto en la vascularización tumoral. También han descubierto que Lrg1 modifica propiedades de células inmunitarias que contribuyen al ambiente prooncogénico.

Los inventores han investigado previamente la relación entre Lrg1 y la ruta de señalización de TGFβ.

En células endoteliales puede producirse señalización de TGFβ mediante asociación del receptor de TGFβ II con el receptor de TGFβ de tipo I ubicuo quinasa de tipo receptor de activina 5 (ALK5) o con ALK1, o con ALK5 y ALK1 juntos, dependiendo de la respuesta celular de qué ruta predomine. En el caso de ALK5 hay, en ciertas condiciones, deposición de ECM aumentada y quiescencia celular mientras que con ALK1 hay activación de células endoteliales manifestada como migración y proliferación aumentadas. Esta señalización diferencial está controlada parcialmente por la concentración/biodisponibilidad de TGFβ, moléculas accesorias tales como endoglina y betaglicano y por miembros de una familia de proteínas efectoras corriente abajo denominadas Smad, en las que Smad 2 y 3 están activadas por ALK5 y Smad 1, 5 y 8 por ALK1. Como alternativa, la activación del receptor de TGFβ puede activar una ruta no canónica que implica rutas de señalización tales como GTPasa Rho y las MAP quinastas.

Un grupo adicional de proteínas que se sabe que es importante en cáncer son las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) y sus receptores, los receptores de proteína morfogenética del hueso (BMPR). Pueden reclutarse quinastas de tipo receptor de activina (ALK) a complejos BMP/BMPR para mediar en la señalización dentro de células neoplásicas. Los inventores han demostrado que Lrg1 efectúa señalización de BMP.

Los inventores han demostrado previamente que Lrg1 forma un complejo con TGFβRII, ALK5 y ALK1 lo que sugiere que Lrg1 tiene un papel en la mediación de la formación de este complejo receptor y conducción de señalización por la ruta de ALK1/Smad 1, 5 y 8 (documento WO 2011/027129). Uno de los mecanismos mediante los cuales se consigue esto es mediante unión de Lrg1 directamente con la molécula accesorias endoglina que promueve la formación del complejo receptor posterior. Por lo tanto, los inventores han planteado previamente la hipótesis de que Lrg1 actúa como un modulador de la señalización de TGFβ, provocando ajuste entre las cascadas de señalización activadas por ALK1 y ALK5.

Se sabe que TGFβ desempeña un papel en el desarrollo de cáncer. Durante los estadios tempranos de la progresión tumoral la ruta de TGFβ es predominantemente supresora. Sin embargo, las células tumorales son capaces de cambiar su respuesta a TGFβ de modo que promueva la transición epitelial-mesenquimatosa (EMT), invasión tumoral, diseminación metastásica y evasión del sistema inmunitario (Meulmeester y ten Dijke., 2011). Esto se conoce como el cambio de TGFβ. Aunque sin quedar ligado a esta teoría, los inventores plantean la hipótesis de que la regulación positiva de Lrg1 en células neoplásicas provoca una alteración en su respuesta a señalización de TGFβ que da como resultado un cambio de un estímulo supresor a uno oncogénico.

De hecho, en células endoteliales los inventores han descubierto que Lrg1 potencia la acción mitógena de TGFβ. Por lo tanto, las células endoteliales cerebrales de ratones *Lrg1*<sup>-/-</sup> proliferaron más lentamente que las de animales WT. La adición de TGFβ1 potenció significativamente la proliferación de células endoteliales de animales WT pero inhibió el crecimiento de células de ratones *Lrg1*<sup>-/-</sup>, supuestamente mediante señalización de ALK5-Smad2/3 potenciada en ausencia de activación de la ruta de ALK1-Smad1/5/8. La adición de Lrg1 por sí sola no tuvo ningún efecto, pero cuando se añadieron tanto TGFβ1 como Lrg1 la proliferación celular aumentó significativamente en células tanto WT como nulas para Lrg1. Estas observaciones se basaron adicionalmente en estudios que mostraban que la sobreexpresión de Lrg1 en la línea celular endotelial cerebral GPNT condujo a aumento de la fosforilación de Smad1/5 y potenciación de la proliferación celular mediada por TGFβ1, mientras que la atenuación de Lrg1 con ARNip dio como resultado reducción de la fosforilación de Smad1/5 y reducción de la división celular. Esto implica

que Lrg1 potencia las propiedades mitógenas de TGFβ. En apoyo de Lrg1 que desempeña un papel en neoplasia, la exploración de publicaciones de cáncer y bases de datos (Tabla 1) muestra que la expresión de genes y proteínas de Lrg1 aumenta frecuentemente en tumores tales como ovárico, de mama, de pulmón y de próstata.

5 Además de ser prooncogénico, también se sabe que TGFβ es inmunosupresor en el ambiente tumoral lo que evita la inmunidad antitumoral que apoya el crecimiento y la supervivencia de tumores (Flavell *et al.*, 2010). Aunque sin quedar ligado a esta teoría, los inventores también plantean la hipótesis de que la regulación positiva de Lrg1 en el ambiente tumoral da como resultado un cambio en la señalización de TGFβ en células inmunitarias lo que provoca un desplazamiento de las respuestas inmunitarias antitumorales a supresión inmunitaria (mediante mecanismos  
10 tales como bloqueo de células T proinflamatorias, regulación positiva de células inmunitarias reguladoras incluyendo Treg y macrófagos reguladores, lo que induce anergia o regulación positiva de mecanismos tolerogénicos y promoción de la muerte celular inducida por activación).

Los inventores han mostrado que en varios tumores (por ejemplo de mama y glioma) la expresión de Lrg1 está regulada positivamente en gran medida (Figura 1b) y se expresa en la línea celular tumoral de pulmón de Lewis de  
15 ratón LL/2 y línea celular de melanoma de ratón B16/F10 (Figura 1a, panel inferior). Cuando estas líneas celulares se injertan por vía subcutánea en ratones C57BL/6 de tipo silvestre y ratones con inactivación de *Lrg1* en el mismo fondo la tasa de crecimiento de los tumores se inhibe significativamente en estos últimos (Figura 1a, gráficas). Estas observaciones sugieren que Lrg1 media en un cambio en la respuesta celular tumoral a TGFβ de ser supresora a ser prooncogénica. En apoyo de esto, los inventores han demostrado que un anticuerpo de bloqueo de Lrg1 da como resultado una reducción significativa del tamaño de colonias de células de carcinoma de pulmón de Lewis murino (LL/2) cultivadas en suspensión en un gel de agarosa (Figura 2).

Esta idea está apoyada además por la visión emergente de que la señalización por TGFβ puede producirse a través del eje TGFβRII/ALK5/ALK2/3-Smad1/Smad5. Por lo tanto, informes recientes muestran que en diversas células  
25 epiteliales TGFβ puede activar Smad1 y Smad5 a través de una ruta independiente de BMP que implica ALK2 y/o ALK3 con ALK5 (Daly *et al.*, 2008).

Los inventores han mostrado que, además de células LL/2, otras líneas celulares secretan Lrg1 incluyendo la línea celular mamaria humana MCF10A, la línea celular de carcinoma de pulmón epitelial humano A549 y la línea celular de adenocarcinoma mamario humano MDA MB 468 (Tabla 2). Además, las células MCF10A y A549 también expresan el receptor accesorio endoglina con el que se ha mostrado que se une Lrg1 directamente.

Además, los inventores han presentado pruebas que muestran que Lrg1 puede inducir señalización de TGFβ tanto canónica como no canónica en estas células. Por lo tanto, han mostrado que Lrg1, en ausencia de ALK1, induce fosforilación de Smad 1/5 en células MDA MB 468 (Figura 4a) y fosforilación de cadena ligera de miosina (en Thr18/Ser19), indicativa de activación de Rho/Rho quinasa, en células MCF10A (Figura 4b) y A549 (Figura 4c). Lrg1 también tiene un efecto en la migración celular. Por lo tanto, en células epiteliales MCF10A la adición de Lrg1 exógena provoca un aumento significativo de la migración celular como se determina por el ensayo de arañazo de  
40 heridas (Figura 5a) y una pérdida de direccionalidad de migración celular (Figura 5b) medida durante un ensayo de lapso de tiempo de 5 h.

Habiendo generado anticuerpos monoclonales de ratón contra Lrg1 humana los inventores muestran que uno de estos anticuerpos inhibió significativamente la tasa de proliferación de la línea celular de carcinoma de pulmón epitelial humano A549 (Figura 3). Sin embargo un anticuerpo monoclonal de ratón anti Lrg-1 secundario, aunque reconoce Lrg1, no provocó ninguna reducción significativa en la proliferación de células A549. Esto establece el potencial de bloqueo de la actividad de Lrg1 en el tratamiento del cáncer.

En el sistema inmunitario los inventores han mostrado también que la expresión del factor de transcripción asociado a Th17 ROR<sub>γt</sub> en células T CD4 después de la activación de células T durante 5 días con estimulación anti CD3/CD28 se inhibe significativamente en presencia de Lrg1 (Figura 6). Esto demuestra que entre otros efectos moduladores inmunitarios Lrg1 tiene la capacidad de inducir la supresión de células T proinflamatorias. De hecho, se ha propuesto que en ciertas condiciones las células Th17 pueden ser antitumorigénicas y su regulación negativa en tumores puede apoyar la supervivencia y expansión de células tumorales (Zou y Restifo., 2010).

Además, en células mononucleares de sangre periférica humana Lrg1 induce una población de células CD14/CD11b que expresan el receptor accesorio de TGFβ endoglina que es un receptor importante de Lrg1 (Figura 7) y que altera la señalización de TGFβ y la función celular.

Los inventores han mostrado que los monocitos tratados con Lrg1 expresan mucho menos HLA-DR que los controles (Figura 8). Esto es importante para el cáncer porque los macrófagos asociados a tumor (TAM) que expresan MHC de clase II bajo son inmunosupresores y promueven la angiogénesis tumoral. También es notable que en un estudio de perfiles génicos que investigaba genes expresados diferencialmente en TAM, se descubrió que Lrg1 estaba regulado positivamente (Schmieder *et al.*, 2011). Una proporción pequeña de TAM también expresa Tie2 y bajos niveles de MHC de clase II, los denominados macrófagos que expresan Tie2 (TEM) y se ha descubierto que la supresión de TEM mejora en gran medida la eficacia de la terapia tumoral (Welford *et al.*, 2011). Los  
65

inventores proporcionan datos que demuestran que el fenotipo de macrófago ENG<sup>hi</sup>, HLA-DR<sup>lo</sup> promovido por Lrg1 también es Tie2 positivo (Figura 8).

5 Lrg1 es una diana potencialmente superior a las de agentes antineoplásicos convencionales. No solamente se expresa en muchas células cancerosas, aumentando su especificidad, sino que también se expresa por numerosos tipos diferentes de células neoplásicas, lo que sugiere que puede ser una diana eficaz en el tratamiento de una amplia serie de cánceres. Un atractivo adicional de Lrg1 como diana es que es extracelular y por lo tanto se accede a él más fácilmente mediante vías terapéuticas sistémicas.

10 En consecuencia, la invención se define en las reivindicaciones y proporciona:

15 un antagonista de alfa-2-glucoproteína 1 rica en leucina (Lrg1) para uso en el tratamiento de un cáncer que no depende de la vasculoproliferación para su crecimiento o que no es sensible al tratamiento con un agente antiangiogénico o antivascularproliferativo, comprendiendo el antagonista un anticuerpo que se une con Lrg1, un ARN bicatenario que se dirige a ARN de Lrg1, un ARN antisentido que se dirige a ARN de Lrg1, un aptámero que se une con Lrg1, o un péptido o peptidomimético que compite con Lrg1 de longitud completa y por lo tanto bloquea la función de Lrg1.

20 El antagonista actúa preferentemente en células no vasculares. En una realización preferida, el efecto del antagonista de la invención en células neoplásicas es la regulación negativa de la proliferación de células neoplásicas, y puede tener al menos un efecto adicional en células neoplásicas seleccionado de regulación negativa de la migración de células neoplásicas, regulación negativa de interacciones célula-célula entre células neoplásicas, regulación negativa de la expresión de genes neoplásicos por células neoplásicas y bloqueo del cambio de TGFβ de un factor anti a uno prooncogénico para células neoplásicas.

25 El efecto del antagonista de Lrg1 de la invención en las células neoplásicas también puede seleccionarse de regulación negativa de migración de células neoplásicas, regulación negativa de interacciones célula-célula entre células neoplásicas, regulación negativa de la expresión de genes neoplásicos por células neoplásicas y bloqueo del cambio de TGFβ de un factor anti a uno prooncogénico para células neoplásicas.

30 La invención proporciona además un antagonista de alfa-2-glucoproteína 1 rica en leucina (Lrg1) para su uso de acuerdo con la invención, en el que el método de tratamiento del cáncer es mediante un efecto en la función de células inmunitarias en el ambiente tumoral. El antagonista de Lrg1 puede reducir el porcentaje de células CD14 positivas CD11b positivas dentro de una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en comparación con un control en el que no se administra el antagonista y/o puede aumentar el porcentaje de linfocitos T CD4 RORγt positivos en comparación con un control en el que no se administra el antagonista.

35 El antagonista de Lrg1 de acuerdo con la invención puede bloquear la interacción entre Lrg1 y el Receptor de TGFβ II (TGFβRII) y/o Lrg1 y TGFβ y/o Lrg1 y una quinasa de tipo receptor de activina (ALK) y/o Lrg1 y endoglina, y/o Lrg1 y betaglucano, y/o Lrg1 y una proteína morfogenética del hueso (BMP), y/o Lrg1 y un receptor de proteína morfogenética del hueso (BMPR), y/o una ALK y BMPR en señalización de TGFβ o BMP, y/o Lrg1 y receptor de tipo activina II (ACVRII), y/o endoglina y ALK, y/o ALK y BMPR, y/o ALK y TGFβRII. El bloqueo por un antagonista de Lrg1 de la invención puede reducir la interacción entre endoglucano y Lrg1 y modula de este modo la interacción entre la ALK y el receptor de TGFβ II (TGFβRII) y/o reduce la interacción entre betaglucano y la Lrg1, y de este modo modula la interacción entre la ALK y TGFβRII y/o altera la formación de complejo de BMP, BMPR y ALK, o la señalización por dicho complejo, y/o altera la señalización de TGFβ no canónica, y/o altera la formación de un complejo de BMP, ACVRII y ALK, o la señalización por dicho complejo.

40 El antagonista de Lrg1 es para uso en el tratamiento de un cáncer que no depende de la vasculoproliferación para su crecimiento o que no es sensible a tratamiento con un agente antiangiogénico o antivascularproliferativo.

45 Los antagonistas de Lrg1 para uso de acuerdo con la invención pueden ser para uso en combinación con otro producto terapéutico antineoplásico, que se selecciona opcionalmente de un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento y un anticuerpo monoclonal antineoplásico.

50 El antagonista de Lrg1 para uso de acuerdo con la invención puede ser para uso en combinación con un compuesto antiangiogénico, que se selecciona opcionalmente de un antagonista de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un antagonista de angiopoyetina, un antagonista de factor de crecimiento placentario (PLGF), un antagonista de endoglina, un antagonista de CD160 o un antagonista de quinasa de tipo receptor de activina 1 (ALK1), y preferentemente dicho antagonista de VEGF es un anticuerpo anti VEGF.

55 Se desvela un método para identificar un antagonista de Lrg1 de la invención que comprende:

60 (a) proporcionar un antagonista candidato y

(b) determinar si dicho antagonista candidato bloquea o no el efecto directo de Lrg1 en células neoplásicas;

en el que dicho antagonista candidato se identifica como un antagonista de Lrg1 si se observa bloqueo del efecto de Lrg1 en células neoplásicas.

5 El antagonista de la Lrg1 puede bloquear opcionalmente la interacción entre endoglina y Lrg1, y/o Lrg1 y Receptor de TGFβ II (TGFβRII), y/o Lrg1 y una quinasa de tipo receptor de activina (ALK), y/o Lrg1 y TGFβ, y/o Lrg1 y betaglicano, y/o Lrg1 y una proteína morfogenética del hueso (BMP) y/o Lrg1 y un receptor de proteína morfogenética del hueso (BMPR), y/o ALK y BMPR, y/o Lrg1 y receptor de tipo activina II (ACVRII), y/o endoglina y ALK, y/o ALK y BMPR, y/o ALK y TGFβRII.

10 Se desvela el uso de un antagonista de Lrg1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de cáncer por un efecto en células neoplásicas.

Se desvela un método de tratamiento de cáncer por un efecto en células neoplásicas que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un antagonista de Lrg1.

15 Se desvela el uso de un antagonista de Lrg1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer por un efecto en la función de células inmunitarias en el ambiente tumoral.

20 Se desvela un método de tratamiento de cáncer por un efecto en la función de células inmunitarias en el ambiente tumoral que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un antagonista de Lrg1.

### Breve descripción de los dibujos

25 **Figura 1.** Crecimiento de tumores de ratón LL/2 (gráfica superior) y B16/F10 (gráfica inferior) injertados por vía subcutánea en ratones de tipo silvestre y Lrg1<sup>-/-</sup>. Panel inferior: transferencia de western de Lrg1 de medio acondicionado de líneas celulares LL/2 y B16/F10. b) Secciones histológicas de tejido de mama humano normal (superior) y canceroso (inferior) teñido con respecto a Lrg1.

30 **Figura 2.** El bloqueo de Lrg1 con un anticuerpo policlonal anti Lrg1 redujo el tamaño de las colonias de LL/2 en un gel de agarosa. Se suspendieron células LL/2 a  $6,7 \times 10^4$  células/ml en agarosa 0,5 % compuesta en DMEM complementado con FCS 10 % en presencia de IgG 500 nM, anti Lrg1 500 nM o ninguno. La suspensión se sembró en pocillos que se recubrieron con agarosa 1 % compuesta en DMEM. Se añadió medio y tratamiento correspondiente sobre la suspensión semisólida y se cambió semanalmente. El tamaño de las colonias se analizó después de 20 días usando software ImageJ.

35 **Figura 3.** La adición de un anticuerpo anti Lrg1 monoclonal, pero no un segundo anticuerpo monoclonal, dio como resultado una reducción significativa en la proliferación de la línea celular de carcinoma epitelial de pulmón humano A549 como se evalúa por el ensayo de MTT ( $n \geq 3$ ). Las células se cultivaron en DMEM que contenía FCS 10 % durante 5 días, con un cambio de medio el día 3.

40 **Figura 4.** Lrg1 induce rutas de señalización de TGFβ canónicas y no canónicas en líneas celulares epiteliales derivadas de tumor y normales. Las células se privaron de suero durante una noche y se trataron después con TGFβ 5 ng/ml o Lrg1 200 ng/ml, ambos en combinación o ninguno para a, b) 60 minutos o c) 10 minutos al día siguiente, antes de lisar las células para análisis por transferencia western. a) Lrg1 induce fosforilación de Smad 1/5 en la línea celular de adenocarcinoma mamario humano MDA MB 468. b) Lrg1 induce fosforilación de Thr18/Ser19 de cadena ligera de miosina (MLC) en la línea celular epitelial mamaria humana MCF10A. c) Lrg1 induce fosforilación de Thr18/Ser19 de cadena ligera de miosina (MLC) en la línea celular de carcinoma epitelial de pulmón humano A549. El histograma muestra semicuantificación de transferencia de western ( $n = 3$ ) usando software ImageJ.

50 **Figura 5.** Invasión y direccionalidad de células epiteliales mamarias humanas MCF10A en presencia de TGFβ 5 ng/ml o Lrg1 200 ng/ml, ambos en combinación o ninguno. a) Se dejaron células MCF10A confluyentes durante una noche en medio de tratamiento apropiado. Se generaron heridas de "arañazo" usando una punta de pipeta estéril para raspar la monocapa celular. Se añadió sobre ellas medio nuevo con condiciones de tratamiento correspondientes. Se midió el análisis de tamaño normalizado de arañazo durante 25 h usando ImageJ. La adición de Lrg1 induce un aumento significativo en la tasa de cierre de una herida de arañazo a través de una monocapa de células MCF10A. La adición simultánea de TGFβ invierte el efecto ( $n = 3$ ). b) Se sembraron células MCF10A a  $1 \times 10^4$  células/ml. Al día siguiente se trataron con los factores apropiados. Se capturaron imágenes de pistas celulares por lapso temporal cada 15 minutos y se analizaron usando software ImageJ, siendo la direccionalidad una medida de la distancia desde el origen/distancia acumulada. Lrg1 provoca una reducción significativa en la direccionalidad de migración de células MCF10A ( $n = 3$ ).

60 **Figura 6.** Expresión del factor de transcripción asociado a Th17 ROR<sub>γt</sub> en la población de células T CD4 después de la activación de linfocitos T durante 5 días con estimulación anti CD3/CD28 en ausencia y presencia de Lrg1 200 ng/ml.

65

**Figura 7.** Inducción de Lrg1/TGF $\beta$  de una población de células monocíticas CD14/CD11b positivas, endoglina positivas (región encuadrada) en células mononucleares periféricas humanas. a) células no tratadas. b) Después del tratamiento de 4 días con TGF $\beta$  5 ng/ml. c) Después de 4 días de tratamiento con Lrg1 200 ng/ml y d) después de 4 días de tratamiento con TGF $\beta$  5 ng/ml + Lrg1 200 ng/ml.

**Figura 8.** a) Expresión de HLA-DR en monocitos humanos tratados durante 48 h con medio solamente, TGF $\beta$ 1, Lrg1 o TGF $\beta$ 1 + Lrg1. b) Comparación de poblaciones de HLADR<sup>hi</sup> y HLADR<sup>lo</sup> en macrófagos CD14<sup>+</sup> después de 48 h. NT: sin tratamiento; L; Lrg-1; T: TGF $\beta$ 1; L+T: Lrg-1+ TGF $\beta$ 1. c) La población de CD14<sup>+</sup> HLADR<sup>lo</sup> en presencia de la Lrg1 a las 48 h es endoglina (CD105) positiva (línea continua). Control de isotipo (línea discontinua). d) La población de CD14<sup>+</sup> HLADR<sup>lo</sup> en presencia de Lrg1 a las 48 h es TIE2 positiva (línea continua). Control de isotipo (línea discontinua).

## Descripción detallada de la invención

### Bloqueo de Lrg1

Los antagonistas de la invención bloquean la función de Lrg1. El bloqueo de Lrg1 abarca cualquier reducción en su actividad o función que dé como resultado un efecto entre las neoplásicas o en un efecto en la función celular inmunitaria en el ambiente tumoral. Los efectos en células neoplásicas incluyen regulación negativa de la proliferación de células neoplásicas, regulación negativa de la migración de células neoplásicas y/o direccionalidad de la migración, modulación de interacciones célula-célula entre células neoplásicas, regulación negativa de la expresión de genes neoplásicos y bloqueo del cambio de TGF $\beta$  de un factor anti a uno prooncogénico para células neoplásicas. El bloqueo de Lrg1 puede inhibir la señalización de TGF $\beta$  canónica y/o no canónica inducida por Lrg1. Por ejemplo, los antagonistas de la invención pueden bloquear la fosforilación de Smad 1/5 independiente de ALK1 mediada por Lrg1, fosforilación de cadena ligera de miosina mediada por Lrg1 y/o activación de Rho/Rho quinasa mediada por Lrg1. En una realización preferida, el efecto en células neoplásicas es la regulación negativa de la proliferación de células neoplásicas. Los efectos en la función de células inmunitarias en el ambiente tumoral incluyen reducción del porcentaje de células CD14 positivas CD11b positivas dentro de una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y aumento del porcentaje de células T CD4 ROR<sub>yt</sub> positivas. Los antagonistas de la invención también pueden bloquear una reducción mediada por Lrg1 en expresión del MCH de clase II en monocitos y macrófagos, particularmente macrófagos asociados a tumor (TAM). En particular, los antagonistas de la invención pueden bloquear una reducción mediada por Lrg1 en la expresión de HLA-DR. Los antagonistas de la invención también pueden bloquear un aumento mediado por Lrg1 en la expresión de Tie2 en TAM, particularmente macrófagos que expresan Tie2 (TEM).

Por ejemplo, el bloqueo de Lrg1 puede ser mediante bloqueo de su interacción con endoglucano, betaglucono, una quinasa de tipo receptor de activina (ALK), receptor de tipo activina II (ACVRII), TGF $\beta$ RII y/o TGF $\beta$ . El bloqueo de Lrg1 también puede dar como resultado biodisponibilidad reducida de TGF $\beta$ . El bloqueo de Lrg1 puede implicar el bloqueo de la interacción entre ALK-BMP, ALK-BMPR, endoglina-ALK y/o ALK-TGF $\beta$ RII. El BMPR es preferentemente BMPRII.

El bloqueo abarca reducción tanto total como parcial de la actividad o función de Lrg1, por ejemplo prevención total o parcial de las interacciones endoglina-Lrg1, betaglucono-Lrg1, ALK-Lrg1, TGF $\beta$ RII-Lrg1, ACVRII-Lrg1 y/o TGF $\beta$ -Lrg1. El bloqueo abarca la reducción tanto total como parcial de la actividad o función de la Lrg1, por ejemplo prevención total o parcial de la interacción entre ALK-BMP, ALK-BMPR, endoglina-ALK y/o ALK-TGF $\beta$ RII. Por ejemplo, un antagonista de bloqueo de la invención puede reducir la actividad de Lrg1 en del 10 al 50 %, al menos 50 % o al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %.

El bloqueo de la actividad o función de Lrg1 puede medirse por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, el bloqueo de la interacción de endoglina-Lrg1, betaglucono-Lrg1, ALK-Lrg1, ACVRII-Lrg1, TGF $\beta$ RII-Lrg1, TGF $\beta$ -Lrg1, ALK-BMP, ALK-BMPR, endoglina-ALK y/o ALK-TGF $\beta$ RII puede determinarse midiendo la inhibición de la fosforilación de intermedios de señalización corriente abajo. Estos intermedios de señalización corriente abajo pueden seleccionarse de moléculas de señalización canónicas tales como los factores de transcripción de Smad o moléculas de señalización no canónicas tales como MAP quinasas, PI3K, Rho GTPasa y PKC. El BMPR es preferentemente BMPRII.

El bloqueo de Lrg1 también puede medirse mediante ensayos que miden uno de los efectos del bloqueo de Lrg1. Por ejemplo, pueden usarse estudios de proliferación y/o migración. Puede usarse crecimiento independiente de anclaje como una medida de la tumorigenicidad. El bloqueo de Lrg1 también puede evaluarse usando ensayos *in vivo* tales como los que miden la tasa de crecimiento tumoral en modelos animales en los que puede conseguirse inducción tumoral mediante administración de agentes promotores de tumores tales como forbol éster, mediante injerto de líneas celulares tumorales o en modelos animales de tumorigénesis tales como el ratón RIP-Tag.

El bloqueo puede tener lugar mediante cualquier mecanismo adecuado, dependiendo por ejemplo de la naturaleza (véase posteriormente) del antagonista usado, por ejemplo interferencia estérica en cualquier interacción directa o indirecta de endoglina-Lrg1, betaglucono-Lrg1, ALK-Lrg1, ACVRII-Lrg1, TGF $\beta$ RII-Lrg1 TGF $\beta$ -Lrg1, ALK-BMP, ALK-

BMPR, endoglina-ALK y/o ALK-TGF $\beta$ RII o atenuación de la expresión de Lrg1.

### **Antagonistas de Lrg1**

- 5 Puede usarse cualquier antagonista adecuado de acuerdo con la invención, por ejemplo péptidos y peptidomiméticos, anticuerpos, inhibidores de moléculas pequeñas, ARN bicatenario y antisentido, aptámeros y ribozimas. Los antagonistas preferidos incluyen fragmentos peptídicos de Lrg1, ARN bicatenario, aptámeros y anticuerpos.

#### 10 *Péptidos*

- Los antagonistas peptídicos serán típicamente fragmentos de Lrg1 que compiten con Lrg1 de longitud completa por la unión con TGF $\beta$ RII, TGF $\beta$ , endoglina, betaglucono, BMP, BMPR y/o una quinasa de tipo receptor de activina (ALK) y por lo tanto antagonizan Lrg1. Dichos péptidos pueden ser lineales o cíclicos. Los antagonistas peptídicos serán típicamente de 5 a 50, preferentemente 10-40, 10-30 o 15-25 aminoácidos de longitud y serán generalmente idénticos a las secuencias contiguas de dentro de Lrg1 pero pueden tener menos de 100 % de identidad, por ejemplo 95 % o más, 90 % o más u 80 % o más, siempre que conserven propiedades de bloqueo de Lrg1. Pueden identificarse péptidos de bloqueo de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante exploración sistémica de péptidos contiguos o solapantes que abarcan parte de o toda la secuencia de Lrg1. También pueden diseñarse peptidomiméticos que imiten dichos péptidos de bloqueo.

- Un antagonista peptídico de acuerdo con la invención puede ser un fragmento de Lrg1 que tiene la secuencia de L1-24 del Apéndice 1 o L94-117 del Apéndice 2 (SEQ ID NO: 3), L169-192 del Apéndice 1 o L262-285 del Apéndice 2 (SEQ ID NO: 4) o L227-252 del Apéndice 1 o L320-345 del Apéndice 2 (SEQ ID NO: 5) de Lrg1 o una parte de una cualquiera de estas secuencias. Como alternativa, el anticuerpo de péptido de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos de otra región de Lrg1, o una parte de la misma.

#### *ARN bicatenario*

- 30 Usando técnicas conocidas y basadas en un conocimiento de la secuencia de Lrg1, pueden diseñarse moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) para antagonizar Lrg1 por dirección basada en homología de secuencia de ARN de Lrg1. Dichos ARNbc serán típicamente ARN de interferencia pequeños (ARNip), habitualmente en una configuración de tallo-bucle ("en horquilla") o micro ARN (miARN). La secuencia de dichos ARNbc comprenderá una parte que corresponde a la de una parte del ARNm que codifica Lrg1. Esta parte será habitualmente 100 % complementaria de la parte diana dentro del ARNm de Lrg1 pero también pueden usarse niveles menores de complementariedad (por ejemplo, 90 % o más o 95 % o más).

#### *ARN antisentido*

- 40 Usando técnicas conocidas y basadas en un conocimiento de la secuencia de Lrg1, pueden diseñarse moléculas de ARN antisentido monocatenario para antagonizar Lrg1 por dirección basada en homología de secuencia de ARN de Lrg1. La secuencia de dicho antisentido comprenderá una parte que corresponde a la de una parte del ARNm que codifica Lrg1. Esta parte será habitualmente 100 % complementaria de la parte diana dentro del ARNm de Lrg1 pero también pueden usarse niveles menores de complementariedad (por ejemplo 90 % o más o 95 % o más).

#### 45 *Aptámeros*

- Los aptámeros son en general moléculas de ácido nucleico que se unen con una molécula diana específica. Los aptámeros pueden modificarse técnicamente completamente *in vitro*, se producen fácilmente por síntesis química, poseen propiedades de almacenamiento deseables e inducen poca o ninguna inmunogenicidad en aplicaciones terapéuticas. Estas características los hacen particularmente útiles en utilidades farmacéuticas y terapéuticas.

- Como se usa en el presente documento, "aptámero" se refiere en general a un oligonucleótido mono o bicatenario o una mezcla de dichos oligonucleótidos, en los que el oligonucleótido o mezcla es capaz de unirse específicamente con una diana. Se analizarán en el presente documento aptámeros de oligonucleótidos, pero el experto en la materia apreciará que pueden usarse otros aptámeros que tengan características de unión equivalentes, tales como aptámeros peptídicos.

- 60 En general, los aptámeros pueden comprender oligonucleótidos que son de al menos 5, al menos 10 o al menos 15 nucleótidos de longitud. Los aptámeros pueden comprender secuencias que son de hasta 40, hasta 60 o hasta 100 o más nucleótidos de longitud. Por ejemplo, los aptámeros pueden ser de 5 a 100 nucleótidos, de 10 a 40 nucleótidos o de 15 a 40 nucleótidos de longitud. Cuando sea posible, se prefieren aptámeros de longitud más corta ya que estos conducirán con frecuencia a menos interferencia por otras moléculas o materiales.

- 65 Se eliminan rápidamente aptámeros no modificados del torrente sanguíneo, con una semivida de minutos a horas, principalmente debido a la degradación por nucleasa y eliminación del cuerpo por los riñones. Dichos aptámeros no

modificados tienen utilidad, por ejemplo, en el tratamiento de afecciones transitorias tal como en la estimulación de la coagulación sanguínea. Como alternativa, pueden modificarse aptámeros para mejorar su semivida. Están disponibles varias de dichas modificaciones, tales como la adición de pirimidinas 2'-flúor sustituidas o enlaces de polietilenglicol (PEG).

5 Pueden generarse aptámeros usando métodos rutinarios tales como el procedimiento de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX). SELEX es un método para la evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con unión altamente específica con moléculas diana. Se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.654.151, US 5.503.978, US 5.567.588 y WO 96/38579.

10 El método de SELEX implica la selección de aptámeros de ácido nucleico y en particular ácidos nucleicos monocatenarios capaces de unirse con una diana deseada, a partir de una colección de oligonucleótidos. Una colección de ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, ADN, ARN o variantes de los mismos) se pone en contacto con una diana, en condiciones favorables para la unión, los ácidos nucleicos que se unen con dianas en la mezcla se separan de los que no se unen, los complejos de ácido nucleico-diana se disocian, los ácidos nucleicos que se han unido a la diana se amplifican para producir una colección o biblioteca que está enriquecida en ácidos nucleicos que tienen la actividad de unión deseada y después la serie de etapas se repite según sea necesario para producir una biblioteca de ácidos nucleicos (aptámeros) que tengan afinidad de unión específica por la diana relevante.

20 *Anticuerpos*

El término "anticuerpo" como se indica en el presente documento incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "parte de unión a antígeno") o cadenas sencillas de los mismos. Un anticuerpo se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está comprendida por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como  $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera está comprendida por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como  $V_L$ ) y una región constante de cadena ligera. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR).

35 Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina con tejidos hospedadores o factores, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

40 Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal, y será preferentemente un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con injertos de CDR, un nanocuerpo, un anticuerpo humano o humanizado o una parte de unión a antígeno de cualquiera de los mismos. Para la producción de anticuerpos tanto monoclonales como policlonales, el animal experimental es típicamente un mamífero no humano tal como una cabra, un conejo, una rata o un ratón pero también inducirse en otras especies tales como camélidos.

45 Pueden producirse anticuerpos policlonales por métodos rutinarios tales como inmunización de un animal adecuado, con el antígeno de interés. Posteriormente puede extraerse sangre del animal y purificarse la fracción de IgG.

50 Los anticuerpos monoclonales (mAb) de la invención pueden producirse por diversas técnicas, incluyendo metodología de anticuerpos monoclonales convencional, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas convencional de Kohler y Milstein. El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido y puede conseguirse usando técnicas bien conocidas en este campo.

55 Puede producirse un anticuerpo de acuerdo con la invención por un método que comprende: inmunizar un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende Lrg1 de longitud completa, un fragmento peptídico de Lrg1, un epítipo dentro de la secuencia de L1-24 del Apéndice 1 o L94-117 del Apéndice 2 (SEQ ID NO: 3), L169-192 del Apéndice 1 o L262-285 del Apéndice 2 (SEQ ID NO: 4) o L227-252 del Apéndice 1 o L320-345 del Apéndice 2 (SEQ ID NO: 5) o un epítipo dentro de otras regiones de Lrg1; obtener una preparación de anticuerpo de dicho mamífero; y obtener del mismo anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente dicho epítipo.

60 La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conserva la capacidad para unirse específicamente con un antígeno. Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento Fab', un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento dAb y una

región determinante de complementariedad (CDR) aislada. También se pretende que los anticuerpos monocatenarios tales como anticuerpos scFv estén abarcados dentro de la expresión “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos pueden explorarse con respecto a utilidad de la misma manera que anticuerpos intactos.

Un anticuerpo de la invención puede prepararse, expresarse, crearse o aislarse por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de inmunoglobulina de interés o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo de interés, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos combinatoria, recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. Se pretende que la expresión “anticuerpo humano”, como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos que tienen regiones variables en las que se obtienen regiones tanto marco conservadas como CDR de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, no se pretende que la expresión “anticuerpo humano”, como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias marco conservadas humanas.

Dicho anticuerpo humano puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Dicho anticuerpo monoclonal humano puede producirse por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados con una célula inmortalizada.

Pueden prepararse anticuerpos humanos por inmunización *in vitro* de linfocitos humanos seguido de transformación de los linfocitos con virus de Epstein-Barr.

La expresión “derivados de anticuerpos humanos” se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

Se pretende que la expresión “anticuerpo humanizado” se refiera a anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias marco conservadas humanas. Pueden realizarse modificaciones de región marco conservada adicionales dentro de las secuencias marco conservadas humanas.

Pueden usarse métodos de exploración como se han descrito en el presente documento para identificar anticuerpos adecuados que son capaces de unirse con Lrg1. Por lo tanto, los métodos de exploración descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo usando un anticuerpo de interés como el compuesto de ensayo.

Pueden ensayarse anticuerpos de la invención para unión con Lrg1 mediante, por ejemplo, ELISA convencional o transferencia de Western. También puede usarse un ensayo ELISA para explorar con respecto a hibridomas que muestran reactividad positiva con la proteína diana. La especificidad de unión de un anticuerpo también puede determinarse supervisando la unión del anticuerpo con células que expresan la proteína diana, por ejemplo mediante citometría de flujo. Por lo tanto, un método de exploración de la invención puede comprender la etapa de identificar un anticuerpo que es capaz de unirse con Lrg1 llevando a cabo un ELISA o transferencia Western o por citometría de flujo. Pueden después ensayarse adicionalmente anticuerpos que tienen las propiedades de unión requeridas para determinar sus efectos sobre la actividad de Lrg1 como se ha descrito anteriormente adicionalmente.

Los anticuerpos de la invención tendrán propiedades antagonistas de Lrg1 (de bloqueo) como se ha analizado anteriormente. En una realización, un anticuerpo monoclonal reconoce específicamente un epítipo dentro de Lrg1 y bloquea la actividad de Lrg1. En una realización, el anticuerpo monoclonal reconoce específicamente un epítipo dentro de Lrg1 y bloquea la interacción entre TGFβRII, TGFβ, una ALK, endoglina, betaglucano, una BMP o un BMPRII y Lrg1. En una realización, un anticuerpo monoclonal reconoce específicamente un epítipo dentro de los aminoácidos L1-24 del Apéndice 1 o L94-117 del Apéndice 2 (SEQ ID NO: 3), L169-192 del Apéndice 1 o L262-285 del Apéndice 2 (SEQ ID NO: 4) o L227-252 del Apéndice 1 o L320-345 del Apéndice 2 (SEQ ID NO: 5) y bloquea la actividad de Lrg1. En una realización, un anticuerpo monoclonal reconoce específicamente un epítipo dentro de los aminoácidos L1-24 del Apéndice 1 o L94-117 del Apéndice 2 (SEQ ID NO: 3), L169-192 del Apéndice 1 o L262-285 del Apéndice 2 (SEQ ID NO: 4) o L227-252 del Apéndice 1 o L320-345 del Apéndice 2 (SEQ ID NO: 5) y bloquea la interacción entre TGFβRII, TGFβ, una ALK, endoglina, betaglucano, una BMP, BMPRII o receptor de tipo activina II (ACVRII) y Lrg1.

Los anticuerpos de la invención reconocen específicamente Lrg1, es decir, epítopos dentro de Lrg1. Un anticuerpo, u otro compuesto, "se une específicamente" o "reconoce específicamente" una proteína cuando se une con afinidad preferente o alta con la proteína para la que es específica pero no se une sustancialmente, o se une con baja afinidad, con otras proteínas. La especificidad de un anticuerpo de la invención para proteína diana puede estudiarse adicionalmente determinando si el anticuerpo se une o no con otras proteínas relacionadas como se ha analizado anteriormente o se diferencia entre ellas. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede unirse con Lrg1 humana pero no con Lrg1 de ratón u otra de mamífero.

Los anticuerpos de la invención se unirán convenientemente con Lrg1 con alta afinidad, preferentemente en el intervalo picomolar, por ejemplo con una constante de afinidad ( $K_D$ ) de 10 nM o menos, 1 nM o menos, 500 pM o menos o 100 pM o menos, medida por resonancia de plasmón superficial o cualquier otra técnica adecuada.

Una vez que se ha identificado y seleccionado un anticuerpo adecuado, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo puede identificarse por métodos conocidos en la técnica. Los genes que codifican el anticuerpo pueden clonarse usando cebadores degradados. El anticuerpo puede producirse de forma recombinante por métodos rutinarios.

Pueden identificarse epítopos dentro de Lrg1 por métodos conocidos en la técnica y analizados en el presente documento, notablemente por exploración sistemática de péptidos contiguos o solapantes mediante un enfoque de "PEPSCAN" o formando anticuerpos para fragmentos peptídicos (véase anteriormente) que se ha mostrado que bloquean Lrg1. Son ejemplos de dichos péptidos dentro de los que pueden identificarse epítopos para la producción de anticuerpos los péptidos L1-24 del Apéndice 1 o el L94-117 del Apéndice 2 (SEQ ID NO: 3), el L169-192 del Apéndice 1 o el L262-285 del Apéndice 2 (SEQ ID NO: 4) y L227-252 del Apéndice 1 o L320-345 del Apéndice 2 (SEQ ID NO: 5) analizados en el presente documento. Estos y otros péptidos que contienen epítopos pueden usarse como inmunógenos para la generación de anticuerpos.

### **Efecto en células neoplásicas**

Como se analiza en el presente documento, los inventores han mostrado previamente que pueden usarse antagonistas de Lrg1 para inhibir la angiogénesis. Los agentes antiangiogénicos son una clase conocida de productos terapéuticos antineoplásicos. Sin embargo, los presentes inventores han mostrado ahora que los antagonistas de Lrg1 pueden ejercer un efecto en células neoplásicas, es decir que los antagonistas de Lrg1 son capaces de tener un efecto terapéutico antineoplásico que es independiente de la capacidad de estos antagonistas para inhibir la angiogénesis.

El efecto de los antagonistas de Lrg1 de la invención en células neoplásicas puede ser directo, es decir el antagonista interacciona directamente con una o más células neoplásicas, o indirecto, es decir el antagonista interacciona con otro tipo celular o compuesto y ejerce su efecto en células neoplásicas mediante un intermediario. Preferentemente el efecto del antagonista de Lrg1 en células neoplásicas es directo.

Los efectos de los antagonistas de Lrg1 en células neoplásicas incluyen la regulación negativa de proliferación de células neoplásicas, regulación negativa de transición epitelial-mesenquimatosa (EMT), invasión tumoral, diseminación metastásica, evasión del sistema inmunitario, regulación negativa de la migración de células neoplásicas, modulación, incluyendo regulación negativa, de interacciones célula-célula entre células neoplásicas, regulación negativa de la expresión de genes neoplásicos (tales como oncogenes) o regulación positiva de expresión de genes antineoplásicos (tal como genes supresores de tumores) por células neoplásicas o bloqueo del cambio de TGF $\beta$  de un factor anti a uno prooncogénico para células neoplásicas.

El antagonista de Lrg1 de la invención puede reducir la actividad de Lrg1 de modo que, por ejemplo, la proliferación, migración, interacción célula-célula, expresión de genes neoplásicos o cambio de TGF $\beta$  se reduce del 10 al 50 %, al menos 50 % o al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %. Si el efecto del antagonista de Lrg1 es aumentar la expresión de genes antineoplásicos por una célula neoplásica, el antagonista puede aumentar esta expresión del 10 al 50 %, al menos 50 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos el doble de la expresión de los genes antineoplásicos en ausencia del antagonista.

El efecto del antagonista de Lrg1 puede estar mediado por el antagonista que bloquea la interacción entre endoglina-Lrg1, betaglucono-Lrg1, TGF $\beta$ RII-Lrg1, TGF $\beta$ -Lrg1, una quinasa de tipo receptor de activina (ALK)-Lrg1, una proteína morfogenética del hueso (BMP)-Lrg1, un receptor de proteína morfogenética del hueso (BMPR)-Lrg1, BMP-ALK, BMPR-ALK, receptor de tipo activina II (ACVRII)-Lrg1, endoglina-ALK o ALK-TGF $\beta$ RII. El receptor de proteína morfogenética del hueso es preferentemente BMPRII.

El efecto del antagonista de Lrg1 de la invención en células neoplásicas puede medirse directamente, por ejemplo midiendo la proliferación de células neoplásicas, migración y/o direccionalidad de la migración en presencia del antagonista (y opcionalmente comparando esto con el nivel de proliferación de células neoplásicas, migración y/o direccionalidad de la migración en ausencia del antagonista), o midiendo el nivel de interacción entre endoglina-Lrg1, betaglucono-Lrg1, TGF $\beta$ RII-Lrg1, TGF $\beta$ -Lrg1, una quinasa de tipo receptor de activina (ALK)-Lrg1, una proteína morfogenética del hueso (BMP)-Lrg1, un receptor de proteína morfogenética del hueso (BMPR)-Lrg1, BMP-ALK o

BMPR-ALK, receptor de tipo activina II (ACVRII)-BMPR, ACVRII-Lrg1, endoglina-ALK o ALK-TGF $\beta$ RII o la presencia de moléculas de señalización corriente abajo. Se conocen en este campo técnicas convencionales para medir dichos parámetros.

- 5 El trabajo de los presentes inventores sugiere que la endoglina puede ser un receptor de Lrg1 y también que Lrg1 puede ser mitógena en ciertas células. Por lo tanto, Lrg1 puede ejercer un efecto proliferativo mediante células que expresan endoglina. Además, se sabe que TGF $\beta$  tiene propiedades mitógenas y los inventores han mostrado previamente que Lrg1 modula la señalización de TGF $\beta$ . Por lo tanto, los antagonistas de Lrg1 pueden ser capaces de ejercer un efecto antineoplásico en células neoplásicas indirectamente, mediante la inhibición del efecto proliferativo de Lrg1 proporcionado mediante endoglina y TGF $\beta$ .

### **Indicaciones terapéuticas**

- 15 Cualquier cáncer en el que Lrg-1 medie en un efecto en células neoplásicas o en función de células inmunitarias en ambiente tumoral puede, en principio, tratarse, prevenirse o aliviarse de acuerdo con la presente divulgación. Un “efecto en células neoplásicas” o expresiones similares como se usa en el presente documento abarca todos y cada uno de los efectos directos de Lrg1 en células neoplásicas, incluyendo efectos en la proliferación de células neoplásicas, migración de células neoplásicas, adhesión de células neoplásicas a otras células neoplásicas, expresión de genes neoplásicos o genes requeridos para el crecimiento y progresión del cáncer, el cambio de TGF $\beta$  de un factor anti a uno prooncogénico. Un “efecto en la función de células inmunitarias en ambiente tumoral” o expresiones similares como se usa en el presente documento abarca todos y cada uno de los efectos de Lrg1 en cualquier célula inmunitaria en proximidad al tumor, es decir en contacto directo o indirecto dentro de células neoplásicas o dentro de los límites del crecimiento neoplásico, incluyendo reducción del porcentaje de células CD14 positivas CD11b positivas dentro de una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o aumento del porcentaje de células T CD4 ROR $\gamma$ t positivas y mediante mecanismos del sistema inmunitario tales como bloqueo de células T proinflamatorias, regulación positiva de células inmunitarias reguladoras incluyendo Treg y macrófagos reguladores, induciendo anergia o regulación positiva de mecanismos tolerogénicos y promoviendo muerte celular inducida por activación. En el contexto de la presente invención, la expresión “células inmunitarias” o cualquier expresión similar usada en el presente documento abarca tanto leucocitos polimorfonucleares como leucocitos mononucleares. Los leucocitos polimorfonucleares pueden ser uno o más de neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los leucocitos mononucleares pueden ser uno o más de linfocitos B, linfocitos T, monocitos, macrófagos y células dendríticas. En una realización preferida las células inmunitarias son leucocitos mononucleares. En una realización particularmente preferida los leucocitos mononucleares son monocitos o linfocitos T. En una realización aún más preferida las células inmunitarias son CD4 positivas (linfocitos T auxiliares).

- 35 Todos los efectos del antagonista de Lrg1 de la invención, solo o en combinación con otro producto terapéutico antineoplásico, puede medirse en comparación con un control apropiado en el que no se han administrado el antagonista de Lrg1 o, cuando sea apropiado, combinación de antagonista de Lrg1 y otro producto terapéutico antineoplásico.

- 40 Los tumores en los que se producen efectos mediados por Lrg1 pero que no se basan en la angiogénesis para el crecimiento tumoral son afecciones que pueden tratarse, prevenirse o aliviarse de acuerdo con la presente invención. Además, los tumores que no son sensibles o son resistentes a productos terapéuticos antiangiogénicos se tratan, previenen o alivian de acuerdo con la presente invención. Además, los tumores que pueden beneficiarse de la inhibición de la angiogénesis tumoral y la inhibición de los efectos directos de Lrg1 en células neoplásicas pueden tratarse, prevenirse o aliviarse de acuerdo con la presente invención.

- 50 Preferentemente, no hay ningún efecto, o hay un efecto mínimo, en células normales, incluso cuando las células normales están en proximidad estrecha o en contacto directo con las células tumorales para tratar.

- Los tumores que pueden tratarse, prevenirse o aliviarse de acuerdo con la presente invención incluyen mieloma, leucemia, tumores de cerebro, de mama, de riñón, colorrectal, de pulmón, de próstata, de cabeza y cuello, de estómago, pancreático, de piel, de cuello uterino, de hueso, ovárico, testicular y de hígado.

### **Composiciones farmacéuticas, dosificaciones y regímenes de dosificación**

- Los antagonistas de la invención se formularán típicamente en composiciones farmacéuticas, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 60 Como se usa en el presente documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para administración parenteral, por ejemplo intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular o intravítrea (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el modulador puede recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y no transmite ningún efecto toxicológico no deseado. Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases.

5 Los vehículos farmacéuticamente aceptables preferidos comprenden vehículos o diluyentes acuosos. Los ejemplos de vehículos acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, agua tamponada y solución salina. Los ejemplos de otros vehículos incluyen etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como etil oleato. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición.

15 Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración farmacológica.

20 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender principios activos adicionales como se analiza en el presente documento.

Se desvelan kits que comprenden antagonistas de la invención e instrucciones para su uso. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un producto terapéutico o agente profiláctico adicional como se analiza posteriormente.

25 Los antagonistas y composiciones de la presente invención pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos.

30 En aplicaciones terapéuticas, se administran moduladores o composiciones a un sujeto que ya padece un trastorno o una afección como se ha descrito anteriormente, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o parcialmente detener la afección o uno o más de sus síntomas. Dicho tratamiento terapéutico puede dar como resultado una reducción de la gravedad de los síntomas de enfermedad, o un aumento de la frecuencia o duración de periodos sin síntomas. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "cantidad terapéuticamente eficaz".

35 En aplicaciones profilácticas, se administran formulaciones a un sujeto en riesgo de un trastorno o una afección como se ha descrito anteriormente, en una cantidad suficiente para prevenir o reducir los efectos posteriores de la afección o uno o más de sus síntomas. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "cantidad profilácticamente eficaz". Las cantidades eficaces para cada fin dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como el peso y el estado general del sujeto.

40 Un sujeto para administración de los antagonistas de la invención puede ser un ser humano o animal no humano. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. Se prefiere la administración a seres humanos.

45 Un antagonista de la presente invención puede administrarse mediante una o más vías de administración usando uno o más de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciarán los expertos en la materia, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías preferidas de administración para moduladores de la invención incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraocular, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras parenterales, por ejemplo por inyección o infusión, administración intracraneal ventricular o subdural. La expresión "administración parenteral" como se usa en el presente documento significa modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, habitualmente por inyección. Como alternativa, un anticuerpo de la invención puede administrarse mediante una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa.

55 Una dosificación adecuada de un antagonista de la invención puede determinarse por un practicante médico experto. Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que es eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de secreción del compuesto particular que se emplee, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y el historial médico previo del paciente que se trate, y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

65 Una dosis adecuada puede ser, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente

100 mg/kg de peso corporal del paciente para tratar. Por ejemplo, una dosificación adecuada puede ser de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día o de aproximadamente 10 g/kg a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por día.

- 5 Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse una dosis individual, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como indiquen las exigencias de la situación terapéutica. La forma de dosificación unitaria como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos para tratar; cada
- 10 unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

La administración puede ser en dosis individuales o múltiples. Pueden administrarse múltiples dosis mediante las mismas vías o vías diferentes en la misma localización o en localizaciones diferentes. Como alternativa, las dosis pueden ser mediante una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia pueden variar dependiendo de la semivida del antagonista en el paciente y la duración del tratamiento deseado.

15

Como se analiza en detalle posteriormente, los antagonistas de la invención pueden coadministrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

20

### **Terapias de combinación**

Como se ha observado anteriormente, pueden administrarse antagonistas de Lrg1 de la invención en combinación con cualquier otro compuesto activo adecuado. En particular, el antagonista de Lrg1 de la invención puede administrarse en combinación con uno o más productos terapéuticos antineoplásicos adicionales y/o uno o más agentes antiangiogénicos. La terapia de combinación incluye la administración de una formulación de una única dosificación farmacéutica que contiene antagonista de Lrg1 de la invención y uno o más agentes terapéuticos adicionales; así como administración de un antagonista de Lrg1 de la invención y uno o más agentes terapéuticos adicionales en su propia formulación de dosificación farmacéutica separada. Por ejemplo, un antagonista de Lrg1 de la invención y un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento o un anticuerpo monoclonal antineoplásico pueden administrarse al paciente juntos en una composición de una única dosificación tal como una formulación combinada, o cada agente puede administrarse en una formulación de dosificación separada. Cuando se usan formulaciones de dosificaciones separadas, el antagonista de Lrg1 de la invención y uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse simultáneamente, o en momentos escalonados por separado, es decir, secuencialmente. El efecto antineoplásico ejercido por la combinación de un antagonista de Lrg1 y otro producto terapéutico antineoplásico será preferentemente mayor que el efecto antineoplásico del antagonista de Lrg1 o el otro producto terapéutico antineoplásico administrado solo.

25

30

35

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

45 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (Cytosan®); alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuoona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, calicheamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-díazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; desfofamina; demecolcina; diazicuoona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxixiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuoona; 2,2',2"-triclortrietilamina; uretano; vindesina;

50

55

60

65

dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel (Taxol®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y docetaxel (Taxotere®, Aventis Antony, Francia); gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como antiestrógenos incluyendo por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromataasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolide y goserelina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa bien *in vitro* o bien *in vivo*. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de fase S), tales como agentes que inducen detención en G1 y detención en fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), Taxol® e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen en G1 también se propagan a detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C.

Un “anticuerpo monoclonal antineoplásico” cuando se usa en el presente documento significa cualquier anticuerpo monoclonal que puede usarse para ejercer un efecto antineoplásico, independientemente del mecanismo por el que se consigue el efecto antineoplásico. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales antineoplásicos incluyen alemtuzumab (Campath) para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica, bevacizumab (Avastin) para el tratamiento de cáncer de cerebro, cáncer de colon, cáncer de riñón y cáncer de pulmón, cetuximab (Erbitux) para el tratamiento de cáncer de colon y cánceres de cabeza y cuello, ibritumomab (Zevalin) para el tratamiento de linfoma no de Hodgkin, ofatumumab (Arzerra) o para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica, panitumumab (Vectibix) para el tratamiento de cáncer de colon, rituximab (Rituxan) para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica y linfoma no de Hodgkin, tositumomab (Bexxar) para el tratamiento de linfoma no de Hodgkin, trastuzumab (Herceptin) para el tratamiento de cáncer de mama y cáncer de estómago y edrecolomab (Panorex) para el tratamiento de cáncer de colon.

Pueden administrarse antagonistas de Lrg1 de la invención en combinación con uno o más agentes o compuestos antiangiogénicos. El compuesto antiangiogénico puede seleccionarse de un antagonista de cualquier molécula proangiogénica. Los antagonistas pueden seleccionarse de péptidos y peptidomiméticos, anticuerpos, inhibidores de moléculas pequeñas, ARN bicatenario, aptámeros y ribozimas adecuados, como se ha analizado anteriormente en relación con Lrg1. Por ejemplo, el compuesto antiangiogénico puede seleccionarse de un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un antagonista de angiopoyetina, un antagonista del factor de crecimiento placentario (PLGF), un antagonista de endoglina, un antagonista de CD160 o un antagonista de quinasa de tipo receptor de activina 1 (ALK1). Preferentemente el agente antiangiogénico es un antagonista de VEGF o PLGF. Los antagonistas de VEGF pueden ser preferentemente un anticuerpo anti VEGF tales como Avastin y/o Lucentis y/o una trampa de VEGF basada en receptor tal como Aflibercept.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

## Ejemplos

### 1. El crecimiento tumoral está reducido en ratones con inactivación de Lrg1

El efecto de Lrg1 en el crecimiento tumoral se ha investigado. Se cultivaron células B16-F0 (melanoma) o LL/2 (carcinoma de pulmón de Lewis) como cultivos de adhesión en DMEM complementado con FCS 10 %, L-glutamina 4 mM y penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml. Las células subconfluentes se tripsinizaron y se resuspendieron en medio sin suero. Se inyectaron  $1 \times 10^6$  células tumorales en 100 µl por vía subcutánea en la región dorsal cerca del muslo de ratones de tipo silvestre (WT) o con inactivación de Lrg1 (KO) de 2 meses de edad. Los tumores se calibraron 3 veces a la semana, 7 días después de la inyección. Los ratones se sacrificaron cuando el tumor hubo alcanzado un volumen superior a 1,5 cm<sup>3</sup>. Al final del experimento, los tumores se recogieron y se procesaron para análisis histológico.

Para los tumores tanto B16-F0 como LL/2, el crecimiento tumoral se redujo en ratones Lrg1 KO en comparación con ratones WT (Figura 1a). Los datos presentados en la Figura 1a de hecho infraestiman la diferencia en el crecimiento tumoral entre ratones WT y Lrg1 KO, debido a que los tumores en ratones WT alcanzaron con frecuencia el volumen final de 1,5 cm<sup>3</sup>, y por lo tanto tuvieron que sacrificarse antes del punto final del experimento. Estos datos muestran que en ratones que carecían de expresión de Lrg1 endógena, se redujo el crecimiento tumoral, es decir, el número total de células tumorales. Esto demuestra que Lrg1 estimula la proliferación de células tumorales.

El medio de cultivo de muestras de las líneas celulares B16-F0 y LL/2 se analizó por transferencia de Western y se descubrió que ambas líneas celulares cancerosas expresaban y secretaban proteína Lrg1 (Figura 1a, panel inferior). Se sometieron matrices tisulares de un cáncer de mama humano (derivado de células epiteliales de mama) y un control de tejido de mama humano no canceroso a análisis histológico para examinar la expresión de Lrg1 (Figura 1b). Se usó un anticuerpo específico para Lrg1 para teñir las matrices, indicándose la expresión de Lrg1 por tinción marrón de la muestra. El tejido de mama no canceroso expresó poca Lrg1, observándose solamente mínima tinción en células epiteliales (Figura 1b, panel superior). Sin embargo, la matriz tisular de cáncer de mama humano se tiñó fuertemente con respecto a Lrg1 (Figura 1b, panel inferior). Se cree que las células teñidas más fuertemente expresan Lrg1 y la secretan al ambiente extracelular del tumor, por lo tanto el nivel de fondo de tinción de Lrg1 observado a través de la matriz de cáncer de mama (casi no se observa tinción de fondo en la muestra de control). Esta Lrg1 secretada no pudo entonces actuar solamente en otras células tumorales, sino también en otras células en el ambiente tumoral, tales como células inmunitarias.

A partir de estos datos de transferencia de Western e histológicos se ha concluido que las células tumorales son capaces de producir su propio aporte de Lrg1. Ya que se ha mostrado que el crecimiento tumoral se reduce en ausencia de Lrg1 (Figura 1a), se predice que en ausencia de esta Lrg1 generada por tumor, o si la actividad biológica de la Lrg1 producida por las células tumorales se bloqueaba, el nivel de proliferación de células tumorales y crecimiento tumoral se reduciría aún más en ratones Lrg1 KO. Esto podría conseguirse debido a que el ratón KO no produce Lrg1 y la actividad de Lrg1 que se produce por las células tumorales se inhibiría.

## **2. La expresión de Lrg1 está regulada positivamente en una diversidad de tumores**

Habiendo descubierto que el crecimiento tumoral se reduce en ausencia de expresión de Lrg1, los inventores investigaron después la expresión de Lrg1 en una diversidad de tipos tumorales. La exploración de publicaciones y bases de datos de cáncer (Tabla 1) muestra que la expresión del gen y proteína de Lrg1 aumenta con frecuencia en tumores tales como ovárico, de mama, de pulmón y de próstata. Tomado junto con los resultados en el Ejemplo 1, esto demuestra que Lrg1 es una diana a la que puede dirigirse un fármaco para el tratamiento de cáncer.

## **3. Anticuerpos anti Lrg1 reducen el crecimiento de células tumorales *in vitro***

Habiendo establecido que las células de carcinoma de pulmón de Lewis (LL/2) crecen más lentamente en ratones Lrg1<sup>-/-</sup> en comparación con controles WT se determinó a continuación si el bloqueo de Lrg1 con un anticuerpo policlonal anti Lrg1 redujo el crecimiento celular independiente de anclaje usando un ensayo de formación de colonias de agar blando convencional. Se suspendieron células LL/2 a  $6,7 \times 10^4$  células/ml en agarosa 0,5 % compuesta en DMEM complementado con FCS 10 % en presencia de IgG 500 nM, anticuerpo policlonal anti Lrg1 500 nM o solamente con medio. La suspensión se sembró en pocillos que estaban recubiertos con agarosa 1 % compuesta en DMEM. Se añadió medio y tratamiento correspondiente sobre la suspensión semisólida y se cambió semanalmente. El tamaño de las colonias se analizó después de 20 días usando software ImageJ. El bloqueo de Lrg1 dio como resultado una reducción significativa en el tamaño de las colonias en comparación con medio solo o controles de IgG irrelevantes (Figura 2).

Habiendo generado anticuerpo monoclonal (mAb) contra el LRG1 humano, se determinó a continuación si cualquiera de estos anticuerpos podría bloquear la proliferación de la línea celular de carcinoma epitelial de pulmón humano A549. La adición de un anticuerpo monoclonal, pero no un segundo, dio como resultado una reducción significativa de la proliferación *in vitro* de las células A549 como se evaluó por el ensayo de MTT (n = 3) (Figura 3). En este experimento el medio de cultivo se complementó con mAb 100 nM y las células se mantuvieron en cultivo durante 5 días. El resultado muestra que el bloqueo funcional de Lrg1 conduce a una reducción en la tasa de crecimiento celular, lo que apoya además la idea de que la dirección a Lrg1 en cáncer puede tener valor terapéutico.

## **4. Lrg1 induce señalización de TGFβ canónica y no canónica**

Para determinar si Lrg1 puede inducir rutas de señalización de TGFβ canónicas o no canónicas en líneas celulares epiteliales normales y derivadas de tumor se trataron células *in vitro* con diversas combinaciones de Lrg1 y TGFβ1. Las células se privaron de suero durante una noche y después se trataron con TGFβ 5 ng/ml o Lrg1 200 ng/ml o una combinación de ambos y a continuación después de 10-60 minutos se lisaron y se analizaron por transferencia de Western. En la línea celular de adenocarcinoma mamario humano MDA MB 468, se descubrió que Lrg1 inducía fosforilación de Smad 1/5 (Figura 4a), lo que indica que la ruta de señalización canónica puede inducirse. Además, tanto en la línea celular epitelial mamaria humana MCF10A como en la línea celular de carcinoma epitelial de pulmón humano A549, se descubrió que Lrg1 inducía activación no canónica de la ruta de Rho/ROCK como se reveló por fosforilación de Thr18/Ser19 de cadena ligera de miosina (MLC) (Figura 4b y c) que es coherente con la activación de EMT. El histograma muestra semicuantificación de transferencia de western para las células A549 (n = 3) usando software ImageJ.

## **5. Lrg1 induce señalización de TGFβ canónica y no canónica**

Ya que se ha mostrado que Lrg1 induce señalización tanto canónica como no canónica en estas células se

determinó a continuación si esto dio como resultado un cambio en la función celular. La función migratoria de células epiteliales mamarias humanas MCF10A se evaluó solamente en medio o en presencia de TGFβ 5 ng/ml, Lrg1 200 ng/ml o una combinación de ambos factores. Para determinar la migración, se empleó el ensayo de arañazo ampliamente usado (cierre de heridas) en el que se realizó un arañazo a través de una monocapa confluyente de células MCF10A con una punta de pipeta estéril. Se añadió medio nuevo con tratamientos correspondientes y se registró el cierre del arañazo por células migratorias durante un período de 25 h. El tamaño del arañazo se midió después usando ImageJ. Se descubrió que la adición de Lrg1 induce un aumento significativo en la tasa de cierre en comparación con células no tratadas (Figura 5a). TGFβ por sí solo no alteró la tasa de cierre pero en combinación con Lrg1 invirtió el efecto (n = 3). La direccionalidad de la migración celular se determinó después en células MCF10A. Las células se sembraron a baja confluencia (1x10<sup>4</sup> células/ml) y se trataron como se ha descrito anteriormente. Se capturaron imágenes de las pistas celulares por microscopía de lapso temporal cada 15 minutos y se analizaron usando software ImageJ, siendo la direccionalidad una medida de la distancia desde el origen/distancia acumulada. El análisis reveló que Lrg1 provoca una reducción significativa en la direccionalidad de la migración de células MCF10A (n = 3) (Figura 5b). Estos datos indican que además de inducir señalización celular Lrg1 también afecta al comportamiento celular.

## 6. La expresión de Lrg1 modula poblaciones de células inmunitarias

Se prepararon bazos de ratones C57/BL6 en suspensiones celulares individuales y se contaron en un hemocitómetro. Se aislaron células T sin tratamiento previo a partir de 1 x 10<sup>8</sup> células usando el kit de aislamiento de células T CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> (Miltenyl Biotech). Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 1 x 10<sup>5</sup>/ml y se estimularon con 1 µg/ml de anti CD3 soluble y 2 µg/ml de anti CD28 soluble con y sin la adición de 200 ng/ml de LRG-1 humano recombinante y se mantuvo a 37 °C con CO<sub>2</sub> 5 %. Después de 5 días las células se tiñeron en superficie con respecto a CD4 (APC) y se tiñeron intracelularmente para factores de transcripción nuclear ROR<sub>γt</sub> (PE) y FoxP3 (FITC). Se adquirieron datos en un FACSCalibur y se analizaron usando software FlowJo.

El tratamiento de los esplenocitos de ratón con Lrg1 redujo la población de células T CD4<sup>+</sup> Th17 desde casi el 20 % hasta menos del 5 % (Figura 6). Estos datos demuestran por lo tanto que Lrg1 es capaz de modular células inmunitarias. En particular, los inventores han mostrado que Lrg1 modula los esplenocitos de ratón para reducir una población de células T que podrían atacar células cancerosas si estuvieran presentes esas células T.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de la sangre completa de donantes sanos usando centrifugación de densidad de gradiente Ficoll-Histopaque. Se cultivaron PBMC en placas de 96 pocillos a una densidad de 2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml en RPMI Glutamax que contenía FBS inactivado por calor al 10 %, aminoácidos no esenciales 2 mM, piruvato sódico 2 mM, 2-mercaptoetanol 50 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml y gentamicina 50 µg/ml. Las células se trataron con Lrg1 humana recombinante 200 ng/ml y/o TGFβ1 humano 5 ng/ml y se mantuvieron a 37 °C con CO<sub>2</sub> 5 %. Después de 4 días las células se recogieron y se lavaron una vez con PBS seguido de la adquisición de 20.000 células por muestra en un citómetro de flujo FACSCalibur. Se analizaron datos de FACS usando FSC frente a SSC usando software Flow Jo.

El tratamiento de las PBMC con TGFβ aumentó la población de células CD14<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> de 0,362 % (control, Figura 7, panel superior izquierdo) a 1,23 % (Figura 7, panel superior derecho). El tratamiento de las PBMC con Lrg1 también aumentó la población de células CD14<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> en comparación con la muestra de PBMC de control (hasta 1,79 %, Figura 7, panel inferior izquierdo). Sin embargo, el tratamiento de PBMC tanto con TGFβ como con Lrg1 aumentó la población de células CD14<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> hasta 4,74 %. Estos datos ilustran que Lrg1 es capaz de modular respuestas inmunitarias de una manera dependiente de TGFβ, y sugiere además que un tumor que produce Lrg1 (como se ha demostrado en el Ejemplo 1 anterior) sería capaz de modular la respuesta inmunitaria de un paciente mediante esta producción de Lrg1 (Figura 8a).

Se investigó a continuación el efecto que Lrg1 puede tener en el fenotipo de monocito/macrófago en el contexto de la supervivencia y expansión tumoral. Los monocitos recogidos de células mononucleares de sangre periférica humana se trataron durante 48 h solamente con medio, TGFβ1, Lrg1 o TGFβ1+ Lrg1 y se determinó la expresión de HLA-DR por citometría de flujo. El tratamiento con Lrg1 200 ng/ml o una combinación de Lrg1 200 ng/ml y TGFβ1 5 ng/ml dio como resultado una reducción significativa en la expresión de HLA DR (Figura 8a). El porcentaje de células HLA DR<sup>hi</sup> se redujo y el porcentaje de células HLA DR<sup>lo</sup> aumentó en los macrófagos CD14<sup>+</sup> tratados con Lrg-1 o Lrg-1+ TGFβ1 (Figura 8b). Esto es relevante para el cáncer ya que los macrófagos asociados a tumor (TAM) que expresan MHC de clase II bajo son inmunosupresores y promueven la angiogénesis tumoral. Una proporción pequeña de TAM también expresan Tie2 y bajos niveles de MHC de clase II, los denominados macrófagos que expresan Tie2 (TEM), y se ha descubierto que la supresión de TEM mejora en gran medida la eficacia de la terapia tumoral. Se ha investigado por lo tanto si la población de CD14<sup>+</sup> HLA DR<sup>lo</sup> inducida en presencia de Lrg-1 a las 48 h era tanto endoglina (CD105) como TIE2 positiva. La citometría de flujo reveló que la población de CD14<sup>+</sup> HLA DR<sup>lo</sup> también expresaba endoglina (Figura 8c) y TIE2 (Figura 8d). La demostración de los inventores de que Lrg1 induce una población de macrófagos CD14<sup>+</sup> que son HLADR<sup>lo</sup>, ENG<sup>hi</sup>, TIE2<sup>+</sup> es coherente con la población de macrófagos protumorigénicos TAM/TEM.

Los inventores han demostrado por lo tanto no solamente que Lrg1 es capaz de ejercer un efecto estimulante directo

en células tumorales, particularmente proliferación de células tumorales, sino también que algunos tumores son capaces de producir su propio aporte endógeno de Lrg1. Además, los inventores han demostrado por primera vez que los tumores pueden ser capaces de modular la respuesta inmunitaria mediante expresión de Lrg1, haciendo a la dirección de la función de células inmunitarias en el ambiente tumoral mediante el antagonismo de la expresión de Lrg1 una terapia antineoplásica potencial.

#### Referencias

- WO 96/38579
- 10 WO 2011/027129
- US 2005/0064516
- 15 WO 2008/092214
- US 2007/0184503
- US 5.654.151
- 20 US 5.503.978
- US 5.567.588
- 25 Haupt H, Baudner S; Hoppe Seylers Z (1977) Isolation and characterization of an unknown, leucine-rich 3.1-S-alpha2-glycoprotein from human serum *Physiol Chem. Jun*; 358(6): 639-46. (Título traducido del original alemán)
- Takahashi N, Takahashi Y, Putnam FW; (1985) Periodicity of leucine and tandem repetition of a 24-amino acid segment in the primary structure of leucine-rich alpha 2-glycoprotein of human serum *Proc Natl Acad Sci USA. Abr*; 82(7): 1906-10.
- 30 Lynch J, Fay J, Meehan M, Bryan K, Watters K, Murphy D, Stallings R (2012) MiRNA-335 suppresses neuroblastoma cell invasiveness by direct targeting of multiple genes from the non-canonical TGFp signalling pathway *Carcinogenesis* 1 Mar (epub antes de la impresión)
- 35 Sun D, Kar S, Carr BI (1995) Differentially expressed genes in TGF-beta 1 sensitive and resistant human hepatoma cells *Cancer Lett. Feb 10*; 89(1): 73-9.
- Li X, Miyajima M, Jiang C, Arai H (2007) Expression of TGF-betas and TGF-beta type II receptor in cerebrospinal fluid of patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus *Neurosci Lett. Feb 14*; 413(2): 141-4. Epub 27 Dic 2006.
- Meulmeester, E. y ten Dijke, P. (2011). The dynamic roles of TGF-p in cancer. *J. Pathol.* 223: 205-218.
- 45 Flavell, R. A., Sanjabi, S., Wrzesinski, S. H. y Licona-Limon, P. (2010). The polarisation of immune cells in the tumour environment by TGFp. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 554-567.
- Daly, A. C., Randall, R. A y Hill, C.S. (2008). Transforming growth factor beta-induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Mol. Cell Biol.* 28: 6889-6902
- 50 Zou, W. y Restifo, N. P. (2010). Th17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 248-256.
- 55 Schmieder A, Schledzewski K, Michel J, Tuckermann JP, Tome L, Sticht C, Gkaniatsou C, Nicolay JP, Demory A, Faulhaber J, Kzhyshkowska J, Géraud C, Goerd S. (2011). Synergistic activation by p38MAPK and glucocorticoid signaling mediates induction of M2-like tumor-associated macrophages expressing the novel CD20 homolog MS4A8A. *Int J Cancer.* 129: 122-132.
- 60 Welford AF, Bizziato D, Coffelt SB, Nucera S, Fisher M, Pucci F, Di Serio C, Naldini L, De Palma M, Tozer GM, Lewis CE. (2011). TIE2-expressing macrophages limit the therapeutic efficacy of the vascular-disrupting agent combretastatin A4 phosphate in mice. *J Clin Invest.* 121: 1969-1973.

Tabla 1. Expresión de Lrg1 por tumores y líneas celulares tumorales

Patología	Especie	Título del estudio	Experimento	Muestra	Aumento/reducción	Resultados	Plataforma/métodos	Fuente de datos	Enlace de publicación	Enlace de datos
Cáncer ovárico	Ser humano	<small>Genome-wide analysis of gene expression in upregulated cancer patients.</small>	LRG1 cuantificada por ELISA en suero de dos cohortes de mujeres con cáncer ovárico y enfermedad ginecológica benigna (BGO)	Suero	AUMENTO	LRG1 en suero media mayor en 58 pacientes con cáncer ovárico que en 56 mujeres sanas (aumento doble). Mayor en pacientes de estadio 3/4. En un conjunto separado (193 pacientes), el LRG1 fue mayor en pacientes con cáncer ovárico seroso o de células claras en comparación con pacientes con BGO	ELISA	<small>Journal of Ovarian Biology and Menopause, 2010</small>	<small>DOI: 10.1002/job.100</small>	
Cáncer ovárico	Ser humano	<small>Genome-wide analysis of gene expression in upregulated cancer patients.</small>	Muestra tisular-92 con cáncer ovárico (diferentes tipos) y 57 ovarios normales para matriz génica. 7 muestras de cáncer ovárico adicionales y 13 muestras de ovarios normales adicionales usadas para RT-PCR/western	Tejido	AUMENTO	Niveles de ARNm y proteína de LRG1 mayores en tejidos de cáncer ovárico en comparación con sus homólogos normales (3-4 veces mayor)	Matriz génica (Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0) y RT-PCR			
Cáncer ovárico	Ser humano	<small>Quantitative proteomic analysis by ITRAQ for the identification of candidate biomarkers in ovarian cancer fluids</small>	13 líneas celulares de cáncer ovárico y 7 líneas celulares epiteliales de superficie ovárica normal inmortalizadas (NOSE) usadas	Línea celular	AUMENTO	Niveles de ARNm y proteína de LRG1 mayores en líneas celulares ováricas en comparación con sus homólogos normales. Además del hígado, las células de cáncer ovárico producen y secretan LRG1.	Inmunocitoquímica, transferencia de Western, ELISA			
Cáncer ovárico	Ser humano	<small>A proteomic approach of ovarian cancer biomarkers: analysis to identify putative biomarkers</small>	Se compararon proteínas de 6 grupos de suero, que contienen cada uno 10 pacientes de mujeres con carcinoma ovárico seroso, y 6 grupos de control sin cáncer, que contienen cada uno 10 pacientes sanos	Suero	AUMENTO	LRG1 aumentó en el suero de pacientes con cáncer ovárico (3.1 veces mayor). Este aumento se validó con transferencias de western	ITRAQ y transferencias de western	<small>Proteomic science, 2010</small>	<small>DOI: 10.1002/psp.1100</small>	
Cáncer ovárico	Ser humano	<small>Quantitative proteomic analysis integrated with microarray data reveals that extracellular matrix proteins, chemokines, and TSG binding proteins are upregulated in ovarian cancer fluids</small>	Se combinaron muestras ascíticas de cuatro pacientes de cáncer con un análisis computacional integrado de otros conjuntos de datos de micromatrices publicados para explorar con respecto a nuevos biomarcadores	Líquido ascítico	AUMENTO	LRG1 aumentó en líquido ascítico de pacientes con cáncer ovárico	Tecnología de identificación de proteínas multidimensional (Mud-PUT)	<small>Journal of Proteomics, 2008</small>	<small>DOI: 10.1002/jpm.1000</small>	
Cáncer ovárico	Ser humano	<small>Deep depletion of abundant serum proteins reveals ovarian cancer biomarkers for human ovarian cancer</small>	Se usaron una muestra tisular quimiosensible y una muestra tisular ovárica quimiorresistente	Tejido	AUMENTO	LRG1 se sobreexpresa en tejido de cáncer ovárico quimiorresistente en comparación con quimiosensible (diferencia de tres veces)	Tecnología ICA/TMS/MS	<small>Journal of Proteomics, 2009</small>	<small>DOI: 10.1002/jpm.1001</small>	
Cáncer ovárico	Ser humano	<small>Deep depletion of abundant serum proteins reveals ovarian cancer biomarkers for human ovarian cancer</small>	Se compararon sueros de 10 pacientes con cáncer y 10 controles sanos con respecto a nuevos biomarcadores	Suero	AUMENTO	LRG1 está regulada positivamente en suero de pacientes con cáncer ovárico	Tecnología ICA/TMS/MS	<small>Proteomics, 2009</small>	<small>DOI: 10.1002/jpm.1002</small>	
Cáncer ovárico	Ser humano	<small>Proteomic analysis of ovarian cancer fluids reveals ovarian precursors of protein secretion and shedding of extra-cellular domains</small>	Evaluación de proteoma de superficie celular y las proteínas liberadas al medio extracelular de tres líneas celulares de cáncer ovárico CaOV3, OVACR3 y E82 y de células tumorales ováricas enriquecidas de líquido ascítico	Líquido ascítico	AUMENTO	LRG1 se identificó en células de cáncer ovárico y células de tumor ovárico enriquecido de líquido ascítico	Cromatografía líquida y análisis de MS	<small>Journal of Proteomics, 2008</small>	<small>DOI: 10.1002/jpm.1003</small>	
Cáncer ovárico	Ser humano	<small>Ovarian cancer cell lines</small>	Expresión de ARNm de LRG medida en líneas celulares de cáncer ovárico y comparada con suero de pacientes de cáncer	Línea celular	AUMENTO	Se descubrió que la expresión estaba elevada en 5 de 10 líneas celulares de cáncer ovárico y aumento en los niveles de LRG1 en suero en aproximadamente la mitad de pacientes con cáncer ovárico	codeLink, Human 20K ver 4.1	<small>Journal of Proteomics, 2008</small>	<small>DOI: 10.1002/jpm.1004</small>	

Cáncer ovárico	Ser humano	Ch ovarian cancer epithelial cells	Comparación de epitelios de superficie ovárica normal (OSE) y células epiteliales de cáncer ovárico (CEPI). Las CEPI se aislaron por microdissección con captura por láser de adenocarcinomas ováricos papilares serosos. Los resultados proporcionan información acerca de papel de los OSE en el desarrollo de adenocarcinoma ovárico	Células	AUMENTO	Sobreexpresado en células epiteliales de cáncer ovárico en comparación con células epiteliales ováricas normales	Matriz [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0	GEO - GDS30592		<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS30592">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS30592</a>
Cáncer ovárico seroso	Ser humano	Transcription profiling of human multiple cancer cell lines	Múltiples estudios de micromatrices de todo el genoma realizados por triplicado para medir el perfil de transcritos de diversas líneas celulares de cáncer	Línea celular	AUMENTO	LRG1 regulada positivamente en una línea celular de carcinoma seroso ovárico	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0	MicroArray Ex. E-MTAB-37		<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS117206">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS117206</a>
Cáncer ovárico	Ser humano	Ch ovarian normal surface epithelia and ovarian cancer epithelial cells	Comparación de epitelios de superficie ovárica normal (OSE) y células epiteliales de cáncer ovárico (CEPI). Se aislaron CEPI por microdissección con captura por láser de adenocarcinomas ováricos papilares serosos. Los resultados proporcionan información acerca del papel de los OSE en el desarrollo de adenocarcinoma ovárico	Células	AUMENTO	LRG1 regulada positivamente en células epiteliales de cáncer ovárico	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0	GEO - GDS30592		<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS30592">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS30592</a>
Cáncer de próstata	Ser humano	Discovery of candidate tumor markers for prostate cancer via proteomic analysis of cell culture conditioned medium	Se usó una línea celular de cáncer de próstata (PCE3(AR16)) para buscar nuevos marcadores tumorales de próstata candidatos de las proteínas secretadas al medio de cultivo	Línea celular	AUMENTO	LRG1 se secretó al medio de cultivo de la línea celular de cáncer de próstata	Cromatografía líquida y análisis de MS	Ch ovarian surface epithelia and ovarian cancer epithelial cells		<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS117206">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS117206</a>
Cáncer de próstata	Ser humano	Metastatic prostate cancer (MD-U95B). Expression profiling by array	Análisis de tumores de próstata metastásicos y tumores de próstata primarios. También se examinó tejido normal adyacente al tumor y tejido de dominante normal. La metástasis refleja el resultado clínico más adverso. Los resultados proporcionan información acerca de los mecanismos moleculares que subyacen al proceso metastásico	Tejido	AUMENTO	LRG1 se sobreexpresa en cáncer de próstata metastásico en comparación con tejido de próstata normal	Matriz [HG_U95B] Affymetrix Human Genome U95B	GEO - GDS2546		<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS2546">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS2546</a>
Cáncer de próstata	Ser humano	Prostate cancer progression	Perfil de expresión de tumores de cáncer de próstata que son benignos, clínicamente localizados o metastásicos y refractarios a hormonas. Los resultados comparados con los obtenidos de inmunotransferencia para identificar cambios concordantes en niveles de ARNm y proteínas	Tejido	AUMENTO	LRG1 se sobreexpresa en cáncer de próstata metastásico en comparación con tumor primario y benigno	Matriz [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0	GEO - GDS1439		<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS1439">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS1439</a>
Cáncer de próstata	Ser humano	Prostate cancer progression	Perfil de expresión de tumores de cáncer de próstata que son benignos, clínicamente localizados o metastásicos y refractarios a hormonas. Los resultados comparados con los obtenidos de inmunotransferencia para identificar cambios concordantes en niveles de ARNm y proteínas	Tejido	AUMENTO	LRG1 está regulada positivamente en cáncer de próstata metastásico	Matriz Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0	GEO - GDS1439		<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS1439">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS1439</a>

Cáncer de próstata	Ser humano	Metastatic prostate cancer (Hs-U95B)	Análisis de tumores de próstata metastásicos y tumores de próstata primarios. También se examinó tejido normal adyacente al tumor y tejido de donante normal. La metastasis refleja el resultado clínico más adverso. Los resultados proporcionan información acerca de los mecanismos moleculares que subyacen al proceso metastásico	Tejido	AUMENTO	LRG1 está regulada positivamente en cáncer de próstata metastático	Matriz Affymetrix Human Genome U95B	10.1006/ajhg.2004.00258 AJHG 14(2):258-264
Cáncer de mama	Ser humano	profiling analysis of conditioned media from three breast cancer cell lines	Se compararon perfiles proteómicos de tres líneas celulares 1) MCF-10A (control), 2) BT474 (canceroso), 3) MDA-MB-468 (metastático de estado tardío)	Medio celular	AUMENTO	LRG1 se expresó más en MDA-MB-464. LRG1 se expresó menos en células MCF-10A de control	Cromatografía líquida de intercambio catiónico fuerte MS/MS	10.1006/molcel.2007.00025 MOLCEL 13(1):27-36
Cáncer de mama	Ratón	Gene expression analysis of macrophages of breast cancer identifies a set of up-regulated proteins in metastatic breast primary mammary tumors	Se aislaron macrofagos promotores de la invasión y se sometieron a análisis de su transcriptoma en comparación con macrofagos asociados a tumor (TAM) aislados indiscriminadamente para actuar usando marcadores de macrofagos establecidos	Célula	AUMENTO	Aumento triple en la expresión de LRG1 en macrofagos promotores de la invasión. TAM invasivos ligán la angiogénesis y la invasión tumoral	Journal Immuno - Open et al 2010	10.1006/jimm.2009.00020 JIMM 15(2):102-110
Cáncer de mama	Ser humano y ratón	Plasma proteome profiling of a mouse model of breast cancer identifies a set of up-regulated proteins in common with human breast cancer cells	Se obtuvieron plasma de ratones portadores de tumores transgénicos PyMT y controles coincidentes en dos puntos temporales durante el crecimiento tumoral. Se descubrió que un total de 133 proteínas habían aumentado 1,5 veces o más en uno o ambos puntos temporales. Una comparación de este conjunto de proteínas con hallazgos publicados de análisis proteómicos de líneas celulares de cáncer de mama humanos produjo 49 proteínas con niveles aumentados en plasma de ratón que se identificaron en líneas celulares de cáncer de mama	Tejido	AUMENTO	LRG1 se sobreexpresó (1,65 veces en plasma) en los ratones portadores de tumores y la línea celular de cáncer de mama humano	Marcaje de isotopos/espectrometría de masas	10.1006/jmab.2009.00020 JMAB 27(10):1020-1024
Carcinoma de mama	Ser humano	Tumor microenvironment-derived proteins downregulate the plasma proteome response during breast cancer reduction and progression	El desarrollo de tumor se basa en contribuciones esenciales del microambiente tumoral y alteraciones inmunitarias del hospedador. Estas contribuciones pueden afectar al proteoma del plasma de una manera que podría aprovecharse para diagnóstico y pronóstico de cáncer. En este estudio, se usa un enfoque de biología de sistemas para caracterizar la respuesta de proteoma de plasma en el modelo de ratón HR2/Ineu inducible de cáncer de mama durante la inducción, progresión y regresión tumoral	Tejido	AUMENTO	LRG1 mostró aumentos progresivos de la abundancia relativa durante la progresión tumoral y se redujo a niveles casi de control después de la regresión tumoral	LC-MS/MS	10.1006/cancer.2011.00001 CANCER 18(1):1-10
Cáncer de mama	Ser humano	Transcription profiling of human multiple cancer cell lines	Múltiples estudios de micromatrices de todo el genoma realizados por triplicado para medir el perfil de transcritos de diversas líneas celulares de cáncer	Línea celular	AUMENTO	LRG1 regulada positivamente en línea celular de carcinoma de mama	Affymetrix Genechip Human Genome U133 Plus 2.0	10.1006/jmab.2009.00020 JMAB 27(10):1020-1024
Carcinoma hepatocelular	Ser humano	Transcription profiling of human multiple cancer cell lines	Múltiples estudios de micromatrices de todo el genoma realizados por triplicado para medir el perfil de transcritos de diversas líneas celulares de cáncer	Línea celular	AUMENTO	LRG1 se reguló positivamente en una línea celular de carcinoma hepatocelular	Affymetrix Genechip Human Genome U133 Plus 2.0	10.1006/jmab.2009.00020 JMAB 27(10):1020-1024

Cáncer del tracto biliar	Ser humano	A combination of serum LfG1 (CA19-9 and LfG1) differentially detect pancreatic cancer from benign structures	Protoma de suero analizado a partir de 30 pacientes sanos y 37 pacientes con BTC	Suero	AUMENTO	LRG1 regulada positivamente 4,49 veces (2D-DIAGE) y 2,7 veces (ELISA) en los grupos de BTC frente a sanos.	2D-DIGE, MS y ELISA en tándem	British Journal of Cancer Sandovalyake et al 2011 <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3052011/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3052011/</a>	
Cáncer pancreático	Ser humano	Characterization of Proteins in Human Pancreatic Cancer Serum Using Differential Gel Electrophoresis and Tandem Mass Spectrometry	Identificación de biomarcadores de cáncer en suero humano usando electroforesis en gel diferencial (DIGE), perfiles proteómicos de suero de 3 pacientes de cáncer pancreático y 3 controles sanos comparados	Suero	Sin cambios	No se vio que LRG1 se expresara diferencialmente en suero de pacientes de cáncer pancreático	20-DIAGE y LC-MS/MS	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1910719/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1910719/</a>	
Cáncer pancreático	Ser humano	Protein Expression Profiles in Pancreatic Adenocarcinoma, Tissue Complexes with Normal Pancreatic Tissue and Tissue Affected by Pancreatitis as Detected by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry	Identificación de proteínas expresadas diferencialmente en 6 casos de adenocarcinoma pancreático, 2 tejidos adyacentes normales, 7 casos de pancreatitis y 6 tejidos pancreáticos normales	Tejido	Sin cambios	No se vio que LRG1 se expresara diferencialmente en suero de pacientes de cáncer pancreático	20-DIAGE y LC-MS/MS	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1542001/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1542001/</a>	
Cáncer pancreático	Ser humano	Analysis of the Pancreatic Tumor Progression by a Quantitative Proteomic Approach and Immunohistochemical Validation	Se sometieron proteínas de 1000 células microdisecadas a un procedimiento que combinaba marcaje por saturación de colorante de fluorescencia con electroforesis en gel bidimensional de alta resolución (2-DE)	Célula	Sin cambios	No se vio que LRG1 se expresara diferencialmente en suero de pacientes de cáncer pancreático	Microdisección y 2D-DIAGE	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1910719/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1910719/</a>	
Cáncer pancreático	Ser humano	Transcription profiling of human multiple cancer cell lines	Múltiples estudios de micromatrices de todo el genoma realizados por triplicado para medir el perfil de transcriptoma de diversas líneas celulares de cáncer	Línea celular	AUMENTO	LRG1 estaba regulada positivamente en una línea celular de carcinoma pancreático	Affymetrix Genechip Human Genome U133 Plus 2.0	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC317226/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC317226/</a>	
Cáncer de pulmón	Ser humano	Predictors: Identification of essential (EGF) and potential urinary biomarkers for detecting NSCLC	Explorado con respecto a proteínas relacionadas con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) en exosomas urinarios comparando proteoma de exosomas urinarios de 10 controles normales y 8 pacientes con NSCLC. Se hicieron 20 muestras de pulmones de pacientes con NSCLC con respecto a LRG1 y se compararon con tejido de pulmón no tumoral adyacente	Orina	AUMENTO	LRG1 sobreexpresada en muestras de orina de pacientes con NSCLC (aumento de 6 veces). 85 % de las muestras de pulmón de pacientes con NSCLC se tiñeron positivas para sobreexpresión de LRG-1	Nano-HPLC-microplaca-MS/MS y transferencia de western	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC317226/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC317226/</a>	
Cáncer de pulmón	Ser humano	Discovery of lung cancer biomarkers by proteomic analysis of serum with monoclonal antibody libraries	Proteómica de mAb aplicada para descubrimiento de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) de estadio 1. Se compararon 301 pacientes con cáncer de pulmón y 385 controles sanos. ELISA para LRG1 uso cyt C como herramienta de captura	Plasma	AUMENTO	LRG1 regulada positivamente en pacientes con cáncer de pulmón. Aumento de 2,13-2,22 veces (ELISA de tipo sandwich)	ELISA de proteómica de mAb	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC317226/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC317226/</a>	
Cáncer de pulmón	Ser humano	Plasma proteomics of lung cancer by a linkage of multi-dimensional liquid chromatography and two dimensional difference gel electrophoresis	Para encontrar proteínas de plasma aberrantes en cáncer de pulmón, se compararon perfiles proteómicos de suero de 5 pacientes con cáncer de pulmón y 4 controles sanos	Plasma	AUMENTO	Una isoforma de LRG1 regulada positivamente en suero de pacientes con cáncer de pulmón	20-DIAGE y LC-MS/MS	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC317226/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC317226/</a>	
Leucemia mielode	Ser humano	Transcription profiling of human multiple cancer cell lines	Múltiples estudios de micromatrices de todo el genoma realizados por triplicado para medir el perfil de transcriptoma de diversas líneas celulares de cáncer	Línea celular	AUMENTO	LRG1 estaba regulada positivamente en dos líneas celulares de leucemia mielode	Affymetrix Genechip Human Genome U133 Plus 2.0	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC317226/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC317226/</a>	

Tabla 2: Expresión de Lrg1 y endoglina en líneas celulares epiteliales normales y tumorales humanas.

Línea celular	Descripción	Lrg1 Secretado	Endoglina
MCF10A	Línea celular epitelial mamaria humana	S	S
A549	Carcinoma de pulmón epitelial humano	S	S
MDA MB 468	Adenocarcinoma mamario humano	N	N
LL2	Carcinoma de pulmón de Lewis murino	S	N/D

Apéndice 1

```

HLrgl 1   LRELHLSSEHLQALSPELLAPVPR 24
             L+ELEHLSSE L++LSPE L PVP+
HLrgl 1   LQELHLSSENGLESLSPEFLRPVPG 24
HLrgl 25  LRALDLTRREALRSLPPGLFSTSAH 48
             LR LDLTRREAL LPPGLF SA
HLrgl 25  LRVLDLTRREALTGLPPGLFQASAT 48
HLrgl 49  LSTLVLRKHNQIREVSAQWLQGLDA 72
             L TLVL+ENQL + WL GL A
HLrgl 49  LDTLVLKRNQIEVLEVSULHGLKA 72
HLrgl 73  LGHLDLAENQLSSLPGLLASLGA 96
             LGHLDL+ E+L LP GLLA+
HLrgl 73  LGHLDLSGHRIRKLPGLLANFTL 96
HLrgl 97  LHTLDLGYHLLIESLPEGLLRGPRR 120
             L TLDLG H LE+LP LLRGP +
HLrgl 97  LRTLDLGENQIETLPPDLLRGPLQ 120
HLrgl 121 LQRLHLEGNRIQRLEDSELLAQQPF 144
             L+RLHLEGN+LQ L LL PQP
HLrgl 121 LERLHLEGNKIQVLGKDLLLPQPD 144
HLrgl 145 LRVLFLNENQLYGVATGSPQGLQH 168
             LR LFLN E+L VA G+FGGL+
HLrgl 145 LRYLFLNENKLRVAAGAFQGLRQ 168
HLrgl 169 LDHLDLSNNSLSSTPPGLWAF LGR 192
             LDHLDLSNNSL+S P GLWA LG+
HLrgl 169 LDHLDLSNNSLASVPEGLWASLGQ 192
HLrgl 193 PTRDNDGDFDISHPWICDKHLADLCRNLVARRH 226
             P DE+DGFDIS HPWICD+HL+DL RNL A ++
HLrgl 193 FNDNRDGFDISGHPWICDQWLSDLYRNLQ&QKD 226
HLrgl 227 KEFSQNDTRC&GPEAHEKGRLLDVAE 252
             KEFSQNDTRC&GPEA+KGG LL VA+
HLrgl 227 KEFSQNDTRC&GPEAVKGGTLLAVAK 252

L1-24: LQELHLSSENGLESLSPEFLRPVPG
L169-192: LDHLDLSNNSLASVPEGLWASLGQ
L227-252: KEFSQNDTRC&GPEAVKGGTLLAVAK
    
```

5 Alineamiento de secuencias parcial de Lrg1 de ratón y humana, dispuesto para ilustrar las repeticiones ricas en leucina (rojo) y los dominios C terminales altamente conservados (verde).

Apéndice 2

Humano 1 MSSWSRQRPK SPGGIQPHVS RTLFLLLLLA ASAWGVTLS P M SW Q L LL G S  
 Ratón 1 MVSWQHQQGSL QDLKTCLART LFLLALL--- ----GRVSSL  
 5 Humano 41 KDCQVFRSDH GSSISCQPPA EIPGYLPADT VHLAVEFFNL K+C + +SGS++SCPEPLPADT  
 VHL+VEF  
 NL  
 Ratón 34 KECLILQSAE GSTV SCHGPT EFPSSLPADT VHLSVEFSNL  
 Humano 81 THLPANLLQG ASKLQELHLS SNGLESLSPE FLRPVPQLRV T LPA LQG L+ELHLS SN L++LSPE L  
 10 PVP+LR  
 Ratón 74 TQLPAAALQG CPGLRELHLS SNRLQALSPE LLAPVPR LRA  
 Humano 121 LDLTRNALTG LPPGLFQASA TLDTLVLKEN QLEVLEVS WL LDLTRNAL LPPGLF SA L TLVL+EN  
 QL  
 + WL  
 15 Ratón 114 LDLTRNALRS LPPGLFSTSA NLSTLVLREN QLREVS AQWL  
 Humano 161 HGLKALGHLD LSGNRLRKL PGLLANFTLL RTLDLGENQL GL ALGHLD L+ N+L LP GLLA+ L  
 TLDLG  
 N L  
 Ratón 154 QGLDALGHLD LAENQLSSLP SGLLASLGAL HTLDLGYNLL  
 20 Humano 201 ETLPPDLLRG PLQLERLHLE GNKLQVLGKD LLLQPDLRY E+LP LLRGP +L+RLHLE GN+LQ L  
 LL  
 PQP LR  
 Ratón 194 ESLPEGLLRG PRRLQRLHLE GNRLQRLEDS LLAPQPFLRV  
 Humano 241 LFLNGNKLAR VAAGAFQGLR QLDMLDLSNN SLASVPEGLW LFLN N+L VA G+FAQGL+  
 25 LDMLDLSNN  
 SL+S P GLW  
 Ratón 234 LFLNDNQLVG VATGSFQGLQ HLDMLDLSNN SLSSTPPGLW  
 Humano 281 ASLGQPNWDM RDGFDISGNP WICDQNLSDL YRWLQAQKDK A LG+P DM +DGFDIS NP WICD  
 NL+DL RWL A ++K  
 30 Ratón 274 AFLGRPTRDM QDGF DISHNP WICDKNLADL CRWL VANRNK  
 Humano 321 MFSQNDTRCA GPEAVKGQTL LAVAKSQ MFSQNDTRCA GPEA+KGQ L L VA+  
 Ratón 314 MFSQNDTRCA GPEAMKGQRL LDVAELGSL

La  $\alpha$ -2-glucoproteína 1 rica en leucina (Lrg1) mostró el mayor factor de cambio en los vasos retinianos remodelados.  
 35 Secuencia de aminoácidos alineada de Lrg1 humana y de ratón. En rojo están las regiones de repeticiones ricas en  
 leucina y en verde está la región de dominio C terminal humana usada como un péptido de bloqueo.

**Información de secuencia**

40 *Secuencias de Lrg1 humana*

**SEQ ID NO: 1** - Secuencia de ADN de Lrg1 humana

45 [La secuencia que codifica la proteína de SEQ ID NO: 2 está en **negrita y subrayada** dentro de SEQ ID NO:  
 1 a continuación]

GCAGAGCTACCATGTCCTCTTGGAGCAGACAGCGACCAAAAAGCCCAG  
GGGGCATTCAACCCCATGTTTCTAGAACTCTGTTCCCTGCTGCTGCTGT  
TGGCAGCCTCAGCCTGGGGGGTACCCTGAGCCCCAAAGACTGCCAG  
GTGTTCCGCTCAGACCATGGCAGCTCCATCTCCTGTCAACCACCTGCC  
GAAATCCCCGGCTACCTGCCAGCCGACACCGTGCACCTGGCCGTGGA  
ATTCTTCAACCTGACCCACCTGCCAGCCAACCTCCTCCAGGGCGCCTC  
TAAGCTCCAAGAATTGCACCTCTCCAGCAATGGGCTGGAAAGCCTCT  
CGCCCGAATTCCTGCGGCCAGTGCCGCAGCTGAGGGTGCTGGATCTA  
ACCCGAAACGCCCTGACCGGGCTGCCCCCGGGCCTCTTCCAGGCCTC  
AGCCACCCTGGACACCCTGGTATTGAAAGAAAACCAGCTGGAGGTCC  
TGGAGGTCTCGTGGCTACACGGCCTGAAAGCTCTGGGGCATCTGGAC  
CTGTCTGGGAACCGCCTCCGGAAACTGCCCCCGGGCTGCTGGCCAA  
CTTCACCCTCCTGCGCACCTTGACCTTGGGGAGAACCAGTTGGAGA  
CCTTGCCACCTGACCTCCTGAGGGGTCCGCTGCAATTAGAACGGCTA  
CATCTAGAAGGCAACAAATTGCAAGTACTGGGAAAAGATCTCCTCTTG  
CCGCAGCCGGACCTGCGCTACCTCTTCCTGAACGGCAACAAGCTGGC  
CAGGGTGGCAGCCGGTGCCTTCCAGGGCCTGCGGCAGCTGGACATGC  
TGGACCTCTCCAATAACTCACTGGCCAGCGTGCCCGAGGGGCTCTGG  
GCATCCCTAGGGCAGCCAAACTGGGACATGCGGGATGGCTTCGACAT  
CTCCGGCAACCCCTGGATCTGTGACCAGAACCTGAGCGACCTCTATC  
GTTGGCTTCAGGCCCAAAAAGACAAGATGTTTCCAGAATGACACG

**CGCTGTGCTGGGCCTGAAGCCGTGAAGGGCCAGACGCTCCTGGCAGT**  
**GGCCAAGTCCCAGT**GTAGACCAGGGGCTTGGGTTGAGGGTGGGGGGTCTG  
GTAGAACACTGCAACCCGCTTAACAAATAATCCTGCCTTTGGCCGGGTGC  
GGGGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAGGTGGGCGGA  
TCACGAGGTCAGGAGATCGAGACCATCTTGGCTAACATGGTGAAACCCTG  
TCTCTACTAAAAATATAAAAAATTAGCCAGGCGTGGTGGTGGGCACCTGT  
AGTCCCAGCAACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCGTGAACCTGGG  
AGGCGGAGCTTGCGGTGAGCCAAGATCGTGCCACTGCACTCTAGCCTGGG  
CGACAGAGCAAGACTGTCTCAAAAAAATTAATAATAATAATAAAAAACAA  
ATAATCCTGCCTTTTACAGGTGAAACTCGGGGCTGTCCATAGCGGCTGGG  
ACCCCGTTTCATCCATCCATGCTTCCTAGAACACACGATGGGCTTTCCTTA  
CCCATGCCCAAGGTGTGCCCTCCGTCTGGAATGCCGTTCCCTGTTTCCCAG  
ATCTCTTGAACCTCTGGGTTCTCCCAGCCCCTTGTCCTTCCCTTCCAGCTGAGC  
CCTGGCCACACTGGGGCTGCCTTTCTCTGACTCTGTCTTCCCCAAGTCAGG  
GGGCTCTCTGAGTGCAGGGTCTGATGCTGAGTCCCCTTAGCTTGGGGTCA  
GAACCAAGGGGTTTAATAAATAACCCTTGAAAACCTGGA

SEQ ID NO: 2 - Secuencia de Aminoácidos de Lrg1 humana

5 [Las secuencias de SEQ ID NOS: 3-5 están en **negrita y subrayadas** dentro de SEQ ID NO: 2 a continuación]

MSSWSRQRPKSPGGIQPHVSRFLFLLLLAASAWGVTLSPKDCQVFRSDHGSS  
ISCQPPAEIPGYLPADTVHLAVEFFNLTHLPANLLQGASK**LQELHLSSNGLES**  
**LSPEFLRPVPQ**LRVLDLTRNALTGLPPGLFQASATLDTLVLKENQLEVLEVS  
WLHGLKALGHLDLSGNRLRKLPPGLLANFTLLRTLSDLGENQLETLPDLLRG  
PLQLERLHLEGKQLQVLGKDLLLPQPDRLRYLFLNGNKLARVAAGAFQGLRQ  
**LDMLDLSNNSLASVPEGLWASLGQ**PNWDMRDGFDISGNPWICDQNLSDLY  
RWLQAQKDK**KMFSQNDTRCAGPEAVKGQTL**LAVAKSQ

10 **SEQ ID NO: 3-5 - Secuencias de Aminoácidos de Péptidos dentro de Lrg1**

**SEQ ID NO: 3 - Aminoácidos 1 – 24 de Lrg1 humana del Apéndice 2 (L94-117 del Apéndice 3)**

L1-24/L94-117: LQELHLSSNGLESLSPEFLRPVPQ

15

**SEQ ID NO: 4 - Aminoácidos 169-192 de Lrg1 humana del Apéndice 2 (L262-285 del Apéndice 3)**

L169-192/L262-285: LDMLDLSNNSLASVPEGLWASLGQ

20

**SEQ ID NO: 5 - Aminoácidos 227-252 de Lrg1 humana del Apéndice 2 (L320-345 del Apéndice 3)**

L227-252/L320-345: KMFSQNDTRCAGPEAVKGQTLAVAK

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UCL Business PLC  
5 <120> Tratamiento de cáncer  
<130> N.116113B  
10 <150> US 61/608.872  
<151> 09-03-2012  
<160>8  
15 <170> PatentIn versión 3.5  
<210> 1  
<211> 1780  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*  
20 <400> 1

ES 2 647 568 T3

gcagagctac catgtcctct tggagcagac agcgaccaa aagcccaggg ggcattcaac 60  
 cccatgtttc tagaactctg ttcctgctgc tgctgttggc agcctcagcc tggggggtca 120  
 ccctgagccc caaagactgc caggtgttcc gctcagacca tggcagctcc atctcctgtc 180  
 aaccacctgc cgaaatcccc ggctacctgc cagccgacac cgtgcacctg gccgtggaat 240  
 tcttcaacct gacccacctg ccagccaacc tcctccaggg cgcctctaag ctccaagaat 300  
 tgcacctctc cagcaatggg ctggaaagcc tctcgcgccga attcctgcgg ccagtgcgcg 360  
 agctgagggg gctggatcta acccgaaacg ccctgaccgg gctgcccccg ggctcttcc 420  
 aggctcagc caccctggac accctggtat tgaagaaaa ccagctggag gtctctggag 480  
 tctcgtggct acacggcctg aaagctctgg ggcatctgga cctgtctggg aaccgcctcc 540  
 ggaaactgcc ccccgggctg ctggccaact tcaccctcct gcgcaccctt gaccttgggg 600  
 agaaccagtt ggagacctg ccacctgacc tcctgagggg tccgctgcaa ttagaacggc 660  
 tacatctaga aggcaacaaa ttgcaagtac tgggaaaaga tctcctcttg ccgagccgg 720  
 acctgcgcta cctcttctg aacggcaaca agctggccag ggtggcagcc ggtgccttcc 780  
 agggcctgcg gcagctggac atgctggacc tctccaataa ctactggcc agcgtgcccc 840  
 aggggctctg ggcatcccta gggcagccaa actgggacat ggggatggc ttcgacatct 900  
 ccggcaacc ctggatctgt gaccagaacc tgagcgacct ctatcgttg cttcaggccc 960  
 aaaaagacaa gatgttttcc cagaatgaca cgcgctgtgc tgggcctgaa gccgtgaagg 1020  
 gccagacgct cctggcagtg gccaaagccc agtgagacca ggggcttggg ttgagggtg 1080  
 ggggtctggt agaacaactgc aaccgctta acaaataatc ctgcctttgg ccgggtgcgg 1140  
 gggctcacgc ctgtaatccc agcactttgg gaggcccagg tgggcggatc acgaggtcag 1200  
 gagatcgaga ccatcttggc taacatggtg aaaccctgtc tctactaaaa atataaaaa 1260  
 ttagccaggc gtggtggtgg gcacctgtag tcccagcaac tggggaggct gaggcaggag 1320  
 aatggcgtga acttgggagg cggagcttgc ggtgagccaa gatcgtgcca ctgactcta 1380  
 gcctgggcca cagagcaaga ctgtctcaaa aaaattaaaa ttaaaattaa aaacaaataa 1440  
 tcctgccttt tacaggtgaa actcggggct gtccatagcg gctgggacct cgtttcatcc 1500  
 atccatgctt cctagaacac acgatgggct ttccttacct atgcccaagg tgtgccctcc 1560  
 gtctggaatg ccgttcctg tttcccagat ctcttgaact ctgggttctc ccagcccctt 1620  
 gtcttcctt ccagctgagc cctggccaca ctggggctgc ctttctctga ctctgtctc 1680  
 cccaagtcag ggggctctct gactgcaggg tctgatgctg agtcccactt agcttgggg 1740  
 cagaaccaag gggtttaata aataaccctt gaaaactgga 1780

<210> 2  
 <211> 347  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

ES 2 647 568 T3

<400> 2

Met Ser Ser Trp Ser Arg Gln Arg Pro Lys Ser Pro Gly Gly Ile Gln  
 1 5 10 15

Pro His Val Ser Arg Thr Leu Phe Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ser  
 20 25 30

Ala Trp Gly Val Thr Leu Ser Pro Lys Asp Cys Gln Val Phe Arg Ser  
 35 40 45

Asp His Gly Ser Ser Ile Ser Cys Gln Pro Pro Ala Glu Ile Pro Gly  
 50 55 60

Tyr Leu Pro Ala Asp Thr Val His Leu Ala Val Glu Phe Phe Asn Leu  
 65 70 75 80

Thr His Leu Pro Ala Asn Leu Leu Gln Gly Ala Ser Lys Leu Gln Glu  
 85 90 95

Leu His Leu Ser Ser Asn Gly Leu Glu Ser Leu Ser Pro Glu Phe Leu  
 100 105 110

Arg Pro Val Pro Gln Leu Arg Val Leu Asp Leu Thr Arg Asn Ala Leu  
 115 120 125

Thr Gly Leu Pro Pro Gly Leu Phe Gln Ala Ser Ala Thr Leu Asp Thr  
 130 135 140

Leu Val Leu Lys Glu Asn Gln Leu Glu Val Leu Glu Val Ser Trp Leu



ES 2 647 568 T3

Leu Gln Glu Leu His Leu Ser Ser Asn Gly Leu Glu Ser Leu Ser Pro  
1 5 10 15

Glu Phe Leu Arg Pro Val Pro Gln

20

5 <210> 4  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Leu Asp Met Leu Asp Leu Ser Asn Asn Ser Leu Ala Ser Val Pro Glu  
1 5 10 15

10 Gly Leu Trp Ala Ser Leu Gly Gln  
20

15 <210> 5  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Lys Met Phe Ser Gln Asn Asp Thr Arg Cys Ala Gly Pro Glu Ala Val  
1 5 10 15

20 Lys Gly Gln Thr Leu Leu Ala Val Ala Lys  
20 25

25 <210> 6  
<211> 342  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

<400> 6

ES 2 647 568 T3

Met Val Ser Trp Gln His Gln Gly Ser Leu Gln Asp Leu Lys Thr Cys  
 1 5 10 15

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

Leu Lys Glu Cys Leu Ile Leu Gln Ser Ala Glu Gly Ser Thr Val Ser  
 35 40 45

Cys His Gly Pro Thr Glu Phe Pro Ser Ser Leu Pro Ala Asp Thr Val  
 50 55 60

His Leu Ser Val Glu Phe Ser Asn Leu Thr Gln Leu Pro Ala Ala Ala  
 65 70 75 80

Leu Gln Gly Cys Pro Gly Leu Arg Glu Leu His Leu Ser Ser Asn Arg  
 85 90 95

ES 2 647 568 T3

Leu Gln Ala Leu Ser Pro Glu Leu Leu Ala Pro Val Pro Arg Leu Arg  
100 105 110

Ala Leu Asp Leu Thr Arg Asn Ala Leu Arg Ser Leu Pro Pro Gly Leu  
115 120 125

Phe Ser Thr Ser Ala Asn Leu Ser Thr Leu Val Leu Arg Glu Asn Gln  
130 135 140

Leu Arg Glu Val Ser Ala Gln Trp Leu Gln Gly Leu Asp Ala Leu Gly  
145 150 155 160

His Leu Asp Leu Ala Glu Asn Gln Leu Ser Ser Leu Pro Ser Gly Leu  
165 170 175

Leu Ala Ser Leu Gly Ala Leu His Thr Leu Asp Leu Gly Tyr Asn Leu  
180 185 190

Leu Glu Ser Leu Pro Glu Gly Leu Leu Arg Gly Pro Arg Arg Leu Gln  
195 200 205

Arg Leu His Leu Glu Gly Asn Arg Leu Gln Arg Leu Glu Asp Ser Leu  
210 215 220

Leu Ala Pro Gln Pro Phe Leu Arg Val Leu Phe Leu Asn Asp Asn Gln  
225 230 235 240

Leu Val Gly Val Ala Thr Gly Ser Phe Gln Gly Leu Gln His Leu Asp  
245 250 255

Met Leu Asp Leu Ser Asn Asn Ser Leu Ser Ser Thr Pro Pro Gly Leu  
260 265 270

Trp Ala Phe Leu Gly Arg Pro Thr Arg Asp Met Gln Asp Gly Phe Asp  
275 280 285

Ile Ser His Asn Pro Trp Ile Cys Asp Lys Asn Leu Ala Asp Leu Cys  
290 295 300

Arg Trp Leu Val Ala Asn Arg Asn Lys Met Phe Ser Gln Asn Asp Thr  
305 310 315 320

Arg Cys Ala Gly Pro Glu Ala Met Lys Gly Gln Arg Leu Leu Asp Val  
325 330 335

Ala Glu Leu Gly Ser Leu  
340

ES 2 647 568 T3

<211> 248  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 7

His Leu Ser Ser Asn Arg Leu Gln Ala Leu Ser Pro Glu Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Pro Val Pro Arg Leu Arg Ala Leu Asp Leu Thr Arg Asn Ala Leu Arg  
 20 25 30

Ser Leu Pro Pro Gly Leu Phe Ser Thr Ser Ala Asn Leu Ser Thr Leu  
 35 40 45

Val Leu Arg Glu Asn Gln Leu Arg Glu Val Ser Ala Gln Trp Leu Gln  
 50 55 60

Gly Leu Asp Ala Leu Gly His Leu Asp Leu Ala Glu Asn Gln Leu Ser  
 65 70 75 80

Ser Leu Pro Ser Gly Leu Leu Ala Ser Leu Gly Ala Leu His Thr Leu  
 85 90 95

Asp Leu Gly Tyr Asn Leu Leu Glu Ser Leu Pro Glu Gly Leu Leu Arg  
 100 105 110

Gly Pro Arg Arg Leu Gln Arg Leu His Leu Glu Gly Asn Arg Leu Gln  
 115 120 125

Arg Leu Glu Asp Ser Leu Leu Ala Pro Gln Pro Phe Leu Arg Val Leu  
 130 135 140

Phe Leu Asn Asp Asn Gln Leu Val Gly Val Ala Thr Gly Ser Phe Gln  
 145 150 155 160

Gly Leu Gln His Leu Asp Met Leu Asp Leu Ser Asn Asn Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Pro Pro Gly Leu Trp Ala Phe Leu Gly Arg Pro Thr Arg Asp  
 180 185 190

Met Gln Asp Gly Phe Asp Ile Ser His Asn Pro Trp Ile Cys Asp Lys  
 195 200 205

Asn Leu Ala Asp Leu Cys Arg Trp Leu Val Ala Asn Arg Asn Lys Met  
 210 215 220

ES 2 647 568 T3

Phe Ser Gln Asn Asp Thr Arg Cys Ala Gly Pro Glu Ala Met Lys Gly  
 225 230 235 240

Gln Arg Leu Leu Asp Val Ala Glu  
 245

<210> 8  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 8

Leu Gln Glu Leu His Leu Ser Ser Asn Gly Leu Glu Ser Leu Ser Pro  
 1 5 10 15

Glu Phe Leu Arg Pro Val Pro Gln Leu Arg Val Leu Asp Leu Thr Arg  
 20 25 30

Asn Ala Leu Thr Gly Leu Pro Pro Gly Leu Phe Gln Ala Ser Ala Thr  
 35 40 45

Leu Asp Thr Leu Val Leu Lys Glu Asn Gln Leu Glu Val Leu Glu Val  
 50 55 60

Ser Trp Leu His Gly Leu Lys Ala Leu Gly His Leu Asp Leu Ser Gly  
 65 70 75 80

Asn Arg Leu Arg Lys Leu Pro Pro Gly Leu Leu Ala Asn Phe Thr Leu  
 85 90 95

Leu Arg Thr Leu Asp Leu Gly Glu Asn Gln Leu Glu Thr Leu Pro Pro  
 100 105 110

Asp Leu Leu Arg Gly Pro Leu Gln Leu Glu Arg Leu His Leu Glu Gly  
 115 120 125

Asn Lys Leu Gln Val Leu Gly Lys Asp Leu Leu Leu Pro Gln Pro Asp  
 130 135 140

Leu Arg Tyr Leu Phe Leu Asn Gly Asn Lys Leu Ala Arg Val Ala Ala  
 145 150 155 160

Gly Ala Phe Gln Gly Leu Arg Gln Leu Asp Met Leu Asp Leu Ser Asn  
 165 170 175

Asn Ser Leu Ala Ser Val Pro Glu Gly Leu Trp Ala Ser Leu Gly Gln  
 180 185 190

10

ES 2 647 568 T3

Pro Asn Trp Asp Met Arg Asp Gly Phe Asp Ile Ser Gly Asn Pro Trp  
195 200 205

Ile Cys Asp Gln Asn Leu Ser Asp Leu Tyr Arg Trp Leu Gln Ala Gln  
210 215 220

Lys Asp Lys Met Phe Ser Gln Asn Asp Thr Arg Cys Ala Gly Pro Glu  
225 230 235 240

Ala Val Lys Gly Gln Thr Leu Leu Ala Val Ala Lys  
245 250

**REIVINDICACIONES**

1. Un antagonista de la alfa-2-glucoproteína 1 rica en leucina (Lrg1) para uso en el tratamiento de un cáncer que no depende de la vasculoproliferación para el crecimiento o que no es sensible al tratamiento con un agente antiangiogénico o antivascularproliferativo, comprendiendo el antagonista un anticuerpo que se une con Lrg1, un ARN bicatenario que se dirige a ARN de Lrg1, un ARN antisentido que se dirige a ARN de Lrg1, un aptámero que se une con Lrg1 o un péptido o peptidomimético que compite con Lrg1 de longitud completa y por lo tanto bloquea la función de Lrg1.
2. Un antagonista de Lrg1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que actúa en células no vasculares.
3. Un antagonista de Lrg1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el antagonista regula negativamente la proliferación de células neoplásicas.
4. Un antagonista de Lrg1 para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el antagonista de Lrg1 tiene al menos un efecto adicional en células neoplásicas seleccionado de:
- (a) regulación negativa de la migración de células neoplásicas;
  - (b) regulación negativa de interacciones célula-célula entre células neoplásicas;
  - (c) regulación negativa de la expresión de genes neoplásicos por células neoplásicas; y
  - (d) bloqueo del cambio de TGFβ de un factor anti a uno prooncogénico para células neoplásicas.
5. Un antagonista de Lrg1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el antagonista:
- (a) regula negativamente la migración de células neoplásicas;
  - (b) regula negativamente las interacciones célula-célula entre células neoplásicas;
  - (c) regula negativamente la expresión de genes neoplásicos por células neoplásicas; o
  - (d) bloquea el cambio de TGFβ de un factor anti a uno prooncogénico para células neoplásicas.
6. Un antagonista de alfa-2-glucoproteína 1 rica en leucina (Lrg1) para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tratamiento del cáncer es mediante un efecto en la función de células inmunitarias en ambiente tumoral.
7. Un antagonista de Lrg1 para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que:
- (a) dicho antagonista reduce el porcentaje de células CD14 positivas CD11b positivas dentro de una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en comparación con un control en el que no se administra el antagonista; y/o
  - (b) dicho antagonista aumenta el porcentaje de células T CD4 RORγt positivas a en comparación con un control en el que no se administra el antagonista.
8. Un antagonista de Lrg1 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho antagonista bloquea la interacción entre:
- (a) Lrg1 y receptor de TGFβ II (TGFβRII); y/o
  - (b) Lrg1 y TGFβ y/o
  - (c) Lrg1 y una quinasa de tipo receptor de activina (ALK) y/o
  - (d) Lrg1 y endoglina; y/o
  - (e) Lrg1 y betaglucono; y/o
  - (f) Lrg1 y una proteína morfogenética del hueso (BMP); y/o
  - (g) Lrg1 y un receptor de proteína morfogenética del hueso (BMPR); y/o
  - (h) ALK y BMPR y/o
  - (i) Lrg1 y receptor de tipo activina II (ACVRII); y/o
  - (j) endoglina y ALK; y/o
  - (k) ALK y BMPR; y/o
  - (l) ALK y TGFβRII, en señalización de TGFβ o BMP,
- opcionalmente en el que dicho bloqueo por dicho antagonista:
- (i) reduce la interacción entre endoglina y Lrg1 y modula de este modo la interacción entre la ALK y el receptor de TGFβ II (TGFβRII); y/o
  - (ii) reduce la interacción entre betaglucono y Lrg1, y modula de este modo la interacción entre la ALK y el TGFβRII; y/o
  - (iii) altera la formación de un complejo de BMP, BMPR y ALK, o la señalización por dicho complejo; y/o
  - (iv) altera la señalización de TGFβ no canónica; y/o
  - (v) altera la formación de un complejo de BMP, ACVRII y ALK, o la señalización por dicho complejo.

9. Un antagonista de Lrg1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:

- 5 (a) el ARN bicatenario antagonista es un ARN de interferencia corto (ARNip) o microARN (miARN); o  
(b) el péptido antagonista es un fragmento de Lrg1, preferentemente que comprende una o más de las secuencias L1-24 (SEQ ID NO: 3), L169-192 (SEQ ID NO: 4) y L227-252 (SEQ ID NO: 5) o una parte de las mismas, que además preferentemente comprende o consiste en los aminoácidos 227-252 de Lrg1.

10. Un anticuerpo antagonista para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de un anticuerpo monoclonal.

11. Un anticuerpo monoclonal antagonista para uso de acuerdo con la reivindicación 10, que reconoce específicamente un epítipo dentro de la secuencia de L1-24 (SEQ ID NO: 3), L169-192 (SEQ ID NO: 4) o L227-252 (SEQ ID NO: 5) de Lrg1, opcionalmente que reconoce específicamente un epítipo dentro de L227-252 (SEQ ID NO: 5) de Lrg1.

12. Un antagonista de Lrg1 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso en combinación con:

- 20 (a) otro producto terapéutico antineoplásico, opcionalmente en el que el otro producto terapéutico antineoplásico se selecciona de un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento y un anticuerpo monoclonal antineoplásico; y/o  
(b) un compuesto antiangiogénico, preferentemente en el que el compuesto antiangiogénico es un antagonista de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un antagonista de angiopoyetina, un antagonista del factor de crecimiento placentario (PLGF), un antagonista de endoglina, un antagonista de CD160 o un antagonista de quinasa de tipo receptor de activina 1 (ALK1), en el que además preferentemente dicho antagonista de VEGF es un anticuerpo anti VEGF.

13. Un antagonista de Lrg1 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:

- 30 (a) el antagonista de Lrg1 es para uso en el tratamiento de un cáncer que se selecciona de mieloma, leucemia, tumor de cerebro, tumor de mama, tumor de riñón, tumor colorrectal, tumor de pulmón, tumor de próstata, tumores de cabeza y cuello, tumor de estómago, tumor pancreático, tumor de piel, tumor del cuello uterino, tumor de hueso, tumor ovárico, tumor testicular y tumores del hígado; y/o  
35 (b) el antagonista de Lrg1 es para administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraocular, intraperitoneal, subcutánea, espinal, parenteral, tópica, epidérmica, subdural, intracraneal, ventricular o mucosa.

Figura 1

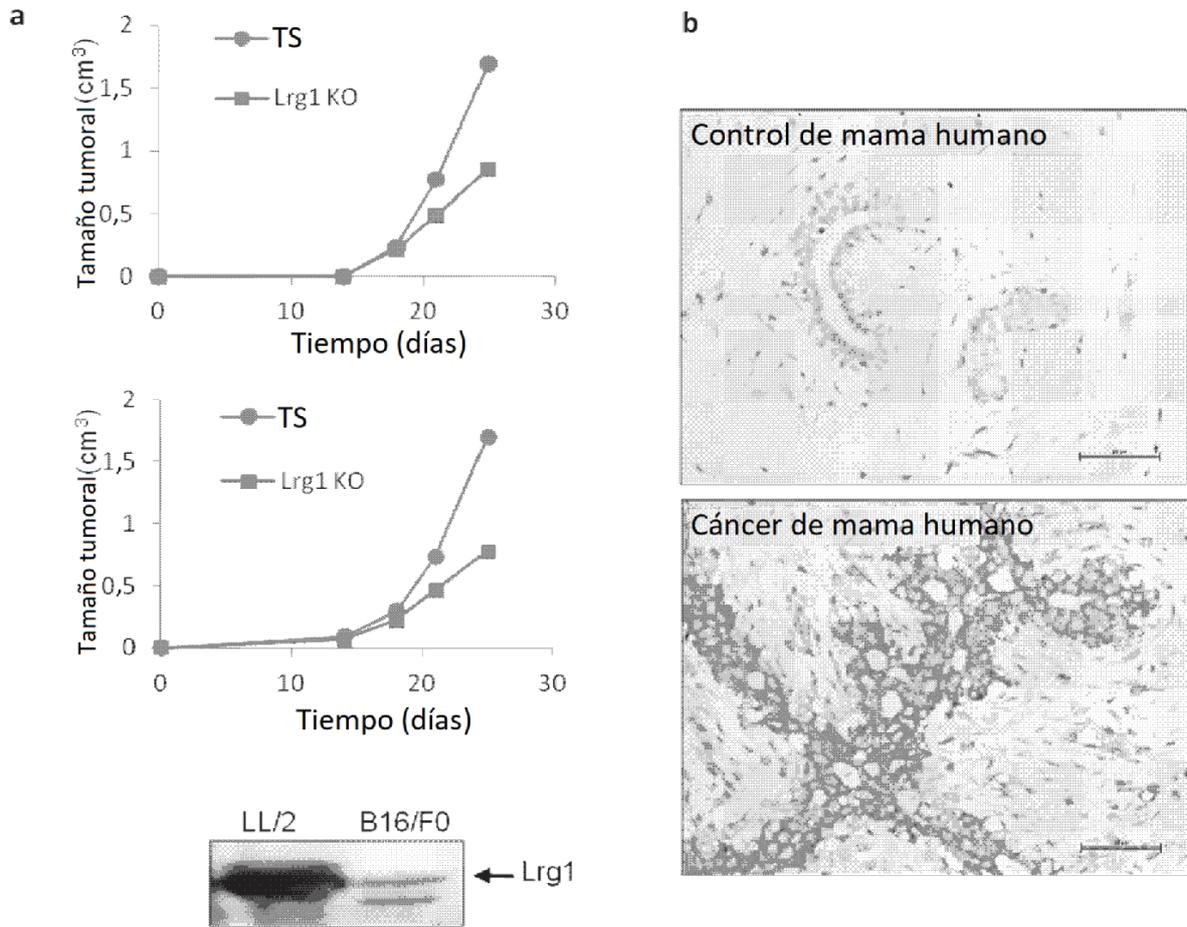


Figura 2

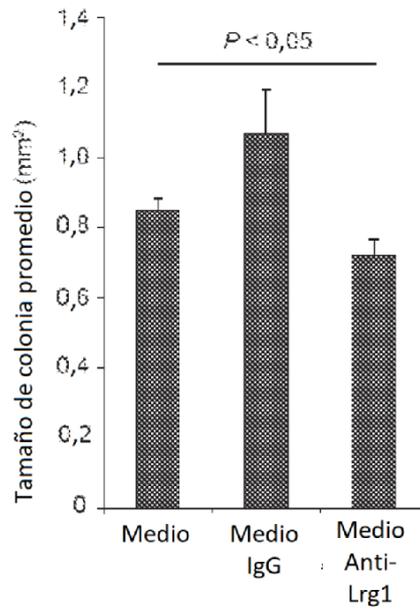


Figura 3

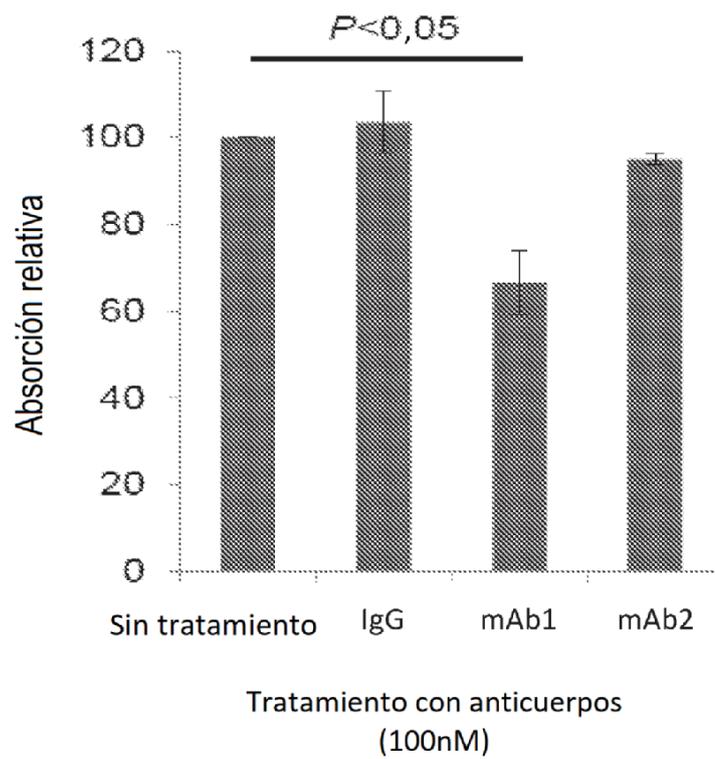


Figura 4

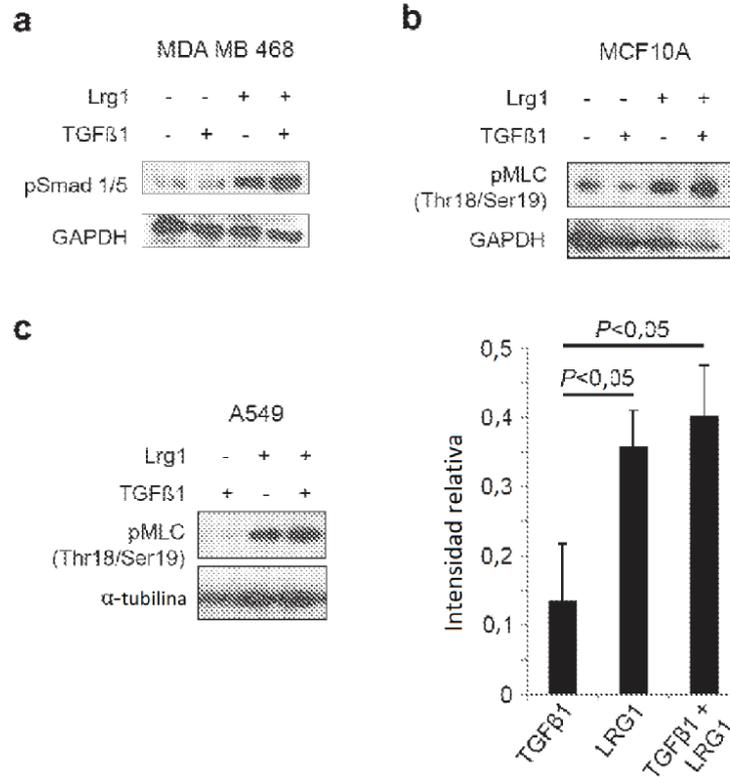


Figura 5

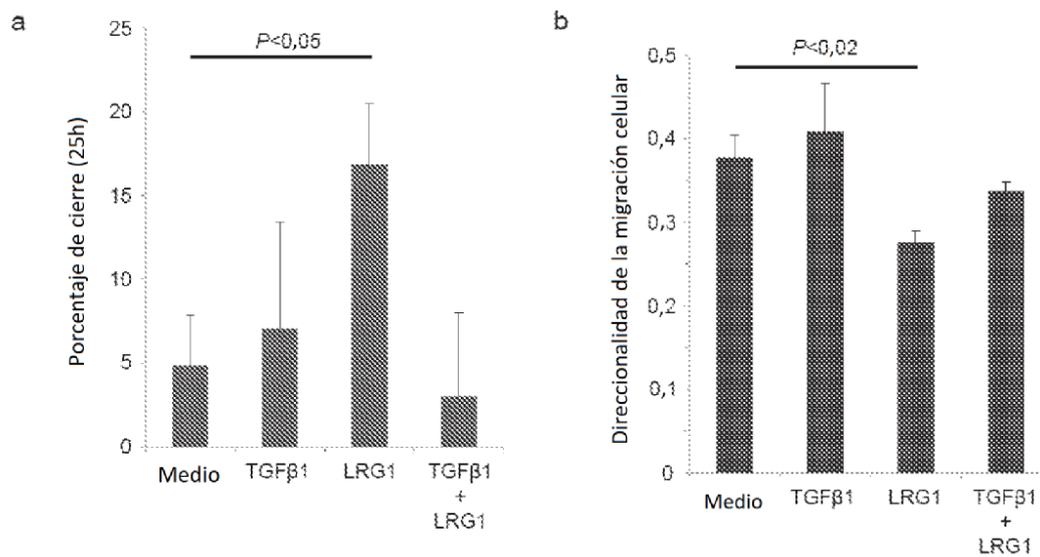
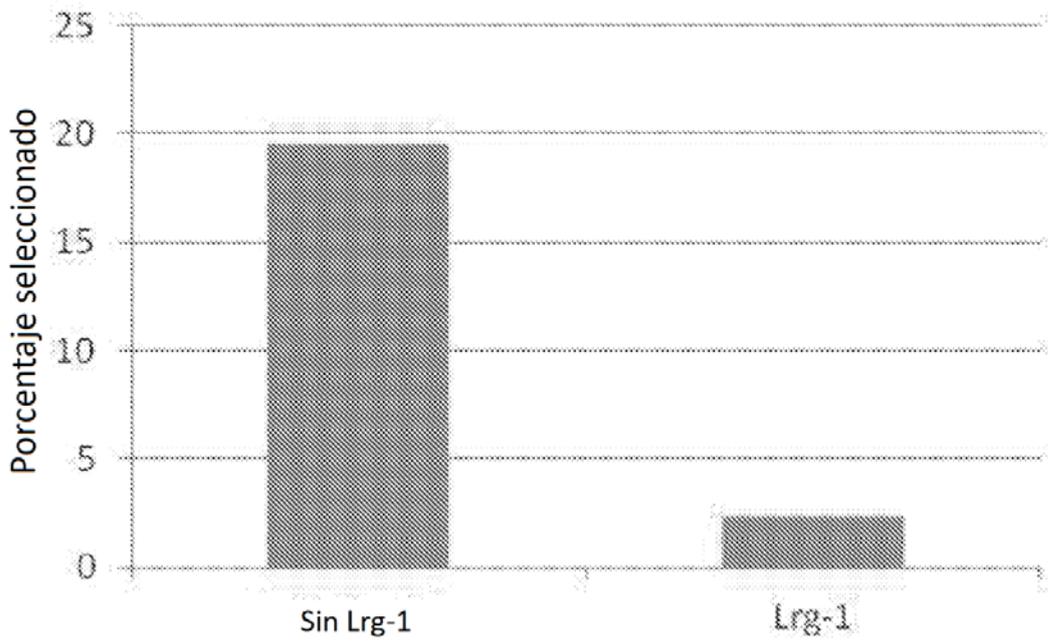


Figura 6

### Expresión de ROR $\gamma$ t en esplenocitos de ratón CD4<sup>+</sup>



Esplenocitos de ratón sin tratamiento previo estimulados con anti CD3/CD28 en presencia o ausencia de Lrg-1 200ng/ml

Figura 7

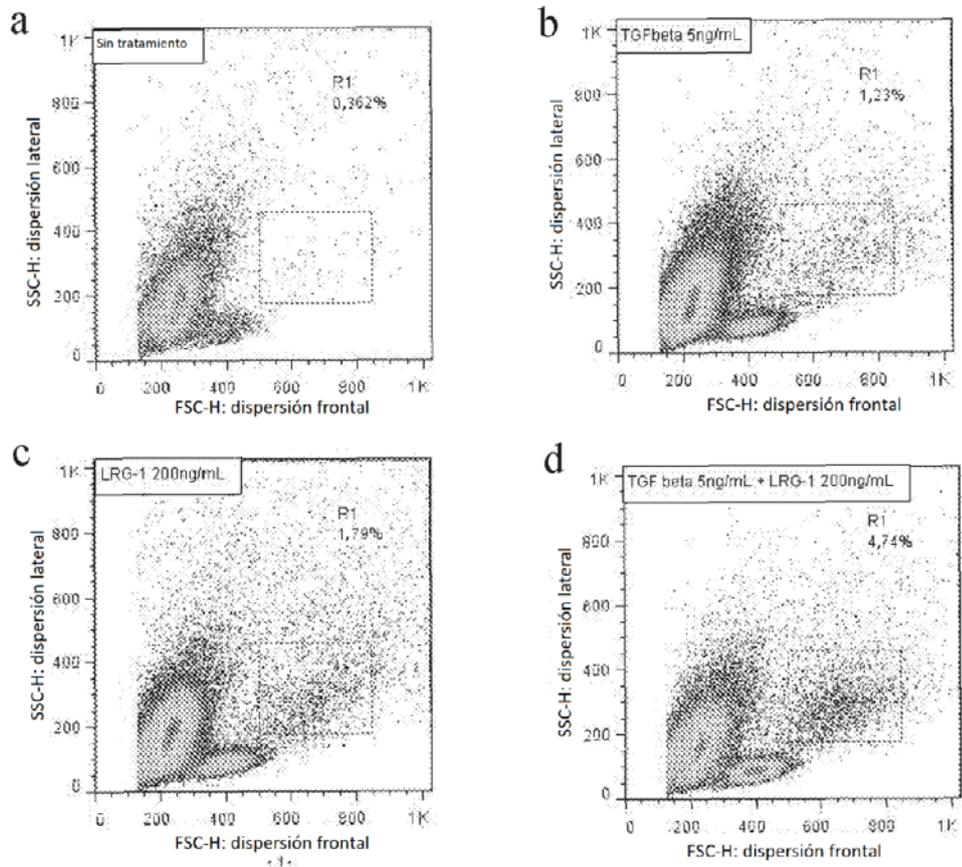


Figura 8

