

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 731**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 33/24** (2009.01)  
**C07K 16/26** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2015 PCT/EP2015/062079**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185478**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2015 E 15726593 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3149038**

54 Título: **Anticuerpos anti-neurotensina y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**02.06.2014 EP 14305826**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.03.2020**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA  
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (50.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR y  
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FORGEZ, PATRICIA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 747 731 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-neurotensina y usos de los mismos

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-neurotensina y sus usos.

**5 Antecedentes de la invención**

La neurotensina (NTS) es un péptido de 13 aminoácidos, descubierto por Carraway y Leeman en 1973 (1). Su acción como neuromodulador en el sistema nervioso central ha sido ampliamente estudiada desde su descubrimiento y continúa siendo el foco de muchos estudios. En la periferia, la NTS se libera de las células N enteroendocrinas del tracto gastrointestinal en respuesta a la ingestión de lípidos intraluminales (2). El péptido ejerce predominantemente regulación hormonal y neurocrina en el proceso digestivo, incluyendo la inhibición de la motilidad del intestino delgado y las secreciones de ácido gástrico, la estimulación de las secreciones pancreáticas y biliares, y la facilitación de la absorción de ácidos grasos (3). La acción de la NTS está mediada por dos receptores acoplados a proteínas G diferentes, los receptores de neurotensina de alta y baja afinidad NTSR1 y NTSR2, respectivamente, y por un receptor de clasificación transmembrana individual no específico codificado por el gen SORT1, NTSR3/sortilina (4).

Además de estas acciones fisiológicas, los datos generales de la bibliografía argumentan a favor de un papel estratégico de la NTS en la carcinogénesis (para una revisión, véase (5-7)). La acción oncogénica de la NTS se ha descrito en numerosos tipos de células cancerosas y tumores con efectos en cada etapa de la progresión del cáncer desde el crecimiento tumoral, con efectos proliferativos y de supervivencia, hasta la diseminación metastásica, con crecimiento independiente del anclaje y efectos pro-migratorios y pro-invasivos. Se supone que todos estos eventos celulares se activan debido a la expresión anormal del receptor 1 de neurotensina de alta afinidad (NTSR1) durante las primeras fases de la transformación celular en relación con la desregulación de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina. Los datos clínicos recientes han sido esenciales para identificar la expresión de NTSR1 como un marcador de pronóstico peyorativo independiente en carcinomas de células escamosas de mama, pulmón, y cabeza y cuello (HNSCC) (8-10).

En particular, se demostró que la NTS estimula el crecimiento de tejidos normales como la mucosa del intestino delgado, el colon, el páncreas, el estómago y la corteza suprarrenal, y se propuso en tumores benignos, tales como los leiomiomas uterinos o los adenomas de colon. Este efecto trófico se extendió a las células cancerosas de diversos orígenes, ya que se descubrió que la NTS exógena induce la estimulación del crecimiento de células de cáncer de páncreas, colon, próstata y pulmón de células pequeñas en cultivo. Los experimentos de incorporación de timidina tritiada realizados en células de cáncer de próstata, pancreático y de mama mostraron un efecto estimulador del crecimiento que dio como resultado la mejora parcial de la síntesis de ADN (11-13). Las alteraciones en la regulación de la apoptosis son otro mecanismo susceptible de influir en el crecimiento tumoral. Los efectos anti-apoptóticos inducidos por NTS se describieron por primera vez en la línea celular de adenocarcinoma de mama MCF-7 (14). La contribución del complejo NTS/NTSR1 en la estimulación del crecimiento tumoral ha sido referida en varios estudios. Se observó una disminución de al menos el 50% en el volumen y el peso del tumor en xenoinjertos de células de cáncer de colon y pulmón de células pequeñas cuando los animales se trataron diariamente con un antagonista de NTSR1. Este resultado ha sido confirmado desde entonces utilizando ARN de interferencia. Además, estos experimentos revelaron un efecto adicional sobre el crecimiento tumoral ya que la expresión de NTSR1 estaba completamente abolida en tumores experimentales de carcinoma de mama y de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) (8, 15). De acuerdo con estos hallazgos, también se demostró que la NTS exógena aumentaba significativamente el tamaño, el peso y la síntesis de ADN de las células de cáncer de colon MC26 y las células de cáncer de páncreas MIA Paca-2 xenoinjertadas en ratones carentes de sistema inmunitario (16, 17). En la misma vena, la administración sostenida carcinogénesis inducida experimental promovida por NTS, tal como la hepatocarcinogénesis inducida por N-nitrosomorfolina, la carcinogénesis de colon inducida por azoximetano, o la carcinogénesis gástrica inducida por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina en ratas al aumentar el número y el tamaño de las lesiones neoplásicas en comparación con el uso de carcinógeno solo (18, 19).

Los procesos de migración e invasión celular son, de hecho, requisitos previos para la propagación metastásica. En las células tumorales, recientemente se demostró que la NTS modula la capacidad migratoria de las células inicialmente adherentes, como las de glioblastoma, cáncer de colon, adenocarcinoma ductal pancreático, HNSCC y cáncer de mama. También se demostró que la NTS induce la adquisición de un fenotipo celular invasivo en ensayos de movilidad 3D (20). Cuando las células de adenocarcinoma de próstata, LNCaP, se sometieron a NTS, se observó un aumento del 75% de su capacidad invasiva basal en Matrigel. Bajo privación de andrógenos, estas células de cáncer de próstata se volvieron espontáneamente invasivas. Estas propiedades invasivas adquiridas se correlacionaron con NTS secretada intrínsecamente ya que el efecto se abolió en presencia de silenciamiento específico de NTS (ARNhc). El agonista de NTS incrementó tres o cuatro veces el número de células invasivas en Matrigel en células de HNSCC que expresan NTSR1 (10).

5 Se han identificado tres vías principales inducidas por la activación de NSTR1 por NTS. PKC es la vía efectora central y principal por la cual se produce la activación de ERK1/2 y para la cual se inducen los efectos celulares proliferativos y de supervivencia posteriores. La segunda vía se forma a partir de la cascada de movilización de PLC, IP3 y [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> que regula la expresión génica. La tercera vía provoca la activación de las pequeñas proteínas G que ejercen funciones sobre la movilidad celular (21).

10 Los efectos oncogénicos finales inducidos por NTS dependen principalmente de PKC. La activación de PKC por NTS se demostró mediante el uso de inhibidores de isotipo amplio, siendo Gö6976 el más utilizado ya que tiene la ventaja de inhibir preferentemente las PKC convencionales  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (22). El uso del antagonista específico de NTSR1, SR48692, confirmó que NTSR1 mediaba los efectos (23). La inducción de la actividad PKC por NTS condujo a la rápida activación de la ruta MAPK y preferentemente ERK1/2. Se produjeron varias rutas para la estimulación en cascada de MAPK, que implicaban el receptor del factor de crecimiento epidérmico o la estimulación directa de Raf-1, que es independiente de la activación de Ras como se describió en células PANC-1 de adenocarcinoma ductal pancreático humano mutado con K-Ras. Curiosamente, en la misma línea celular, también se demostró que NTS inducía la actividad temprana y transitoria de la proteína quinasa D1 (PKD1) en una ruta dependiente de PKC. La inducción de la cascada de MAPK también se asoció adicionalmente con la inducción aguas abajo del gen 1 de respuesta de crecimiento temprano (Egr-1), y el factor de transcripción AP-1 c-Fos en los niveles transcripcional y traduccional. Ambos mecanismos fueron evitados en presencia de antagonista de NTSR1. En un contexto tumoral, la activación mediada por NTS de la ruta de MAPK se asocia principalmente con el crecimiento celular incontrolado y puede exacerbar la tasa trófica en varios tumores.

20 Dentro de la ruta principal de transducción de NTS, la activación de PKC estimula las rutas laterales que implican la transactivación de los Receptores del Factor de Crecimiento Epidérmico en ciertas líneas celulares de cáncer. En el modelo de células de cáncer de próstata PC3, NTS indujo la fosforilación de EGFR, así como ERK1/2 y la proteína Akt. Esta estimulación de EGFR deriva directamente de la liberación inducida por NTS de ligandos similares a EGF (HB-EGF o anfirregulina) a través de una ruta dependiente de PLC/PKC (24, 25). Los sucesivos eventos de señalización aguas abajo condujeron a la estimulación de la clásica cascada Ras-Raf-MEK-ERK a través de un mecanismo dependiente de PI3K. Paralelamente, se mostró una estimulación sinérgica de NTS combinada con EGF en la síntesis de ADN resultante de una prolongación de la duración de la señal ERK (26). La estimulación sostenida de NTS en células de cáncer de pulmón y mama, debido a la regulación autocrina o paracrina, dio como resultado el aumento de la expresión de EGFR, HER2 y HER3 (Dupouy et al. Oncotarget 2014, Younes et al. Oncotarget 2014). Paralelamente, se produjo la activación de metaloproteasas, acompañada de la posterior liberación de ligandos similares a EGF. En las células de cáncer de pulmón, se activaron las metaloproteasas MMP1, HB-EGF y Neurregulina 1. En las células de cáncer de mama se activaron MMP2, HB-EGF y Neurregulina 2. Por lo tanto, en ambos modelos se activaron concomitantemente EGFR y HER3.

35 La NTS puede modular la actividad de las pequeñas RhoGTPasas Rac1, RhoA y Cdc42, que son en parte responsables de la dinámica del citoesqueleto que se sabe que contribuye a la formación de varias extensiones citoplasmáticas como lamelipodios, filopodios, pseudopodios o invadopodios (27, 28).

40 También se demostró que NTS estimulaba la actividad de varias tirosina quinasas no receptoras mediante una fosforilación dependiente de la dosis de residuos de tirosina en CPCNP. El sustrato principal identificado correspondía a la Quinasa de Adhesión Focal (FAK), una proteína que contribuye a la regulación de la dinámica de la proteína en la interfaz célula-matriz, y también está involucrada en los fenómenos de adhesión y migración celular (29). La fosforilación de la tirosina de FAK es transitoria y rápida, y se evita mediante el tratamiento con SR48692. La ruta NTS/NTSR1 también activó otras tirosina quinasas intracelulares, entre ellas Src y Etk/Bmx, en una línea celular de cáncer de próstata. Etk/Bmx es activada por FAK, posiblemente a través de Src, y las tres tirosina quinasas activadas forman un complejo de señalización (30). Este complejo está potencialmente involucrado en los efectos tróficos, inducidos por NTS alternativos posteriores a la privación de andrógenos.

El documento WO2009/127619 reivindica el uso de anticuerpos anti-TNS para el tratamiento del cáncer.

Por consiguiente, los anticuerpos anti-neurotensina que tienen actividades neutralizadoras son altamente deseables para el tratamiento del cáncer.

### Compendio

50 La presente invención se refiere a un anticuerpo neutralizador que es capaz de unirse a fragmentos largos de neurotensina con alta afinidad. El anticuerpo de la presente descripción neutraliza la actividad de la neurotensina, en particular las actividades oncogénicas de la neurotensina. En particular, la presente invención se define por las reivindicaciones. Más concretamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo neutralizador que se une al fragmento largo de neurotensina humana como se expone en SEQ ID NO: 9, y que tiene una región variable de cadena pesada que comprende una región H-CDR1 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 2, una región H-CDR2 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 3 y una región H-CDR3 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 4; y una región variable de la cadena ligera que comprende una región L-CDR1 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 6, una L-CDR2 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 7 y una región L-CDR3 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 8. La presente

descripción también proporciona el uso de tales anticuerpos en el tratamiento del cáncer.

### Descripción detallada

Para inhibir las propiedades oncogénicas de la neurotensina (NTS), los autores de la presente invención produjeron un anticuerpo monoclonal contra NTS dirigido contra NTS (es decir, FLp26-8.2). Los autores de la presente invención han clonado y caracterizado el dominio variable de las cadenas ligeras y pesadas de dicho anticuerpo, y así han determinado el dominio de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de dicho anticuerpo como se describe en la Tabla A (véanse los Ejemplos). Los autores de la presente invención demuestran que dicho anticuerpo monoclonal neutralizador de NTS representa un fármaco potencial para limitar la progresión del cáncer y restaurar las respuestas a la quimioterapia.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un anticuerpo neutralizador que es capaz de unirse a la neurotensina con alta afinidad. El anticuerpo de la presente descripción neutraliza la actividad de la neurotensina, en particular las actividades oncogénicas de la neurotensina como se describe en los Ejemplos. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente descripción tienen la propiedad ventajosa de que pueden inhibir la actividad biológica de la neurotensina. Por consiguiente, la presente descripción también proporciona el uso de tales anticuerpos en el tratamiento del cáncer.

En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un anticuerpo neutralizador que se une al fragmento largo de la neurotensina humana, y que tiene una región variable de cadena pesada que comprende una región H-CDR1 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 2, una región H-CDR2 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 3 y una región H-CDR3 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 4; y una región variable de la cadena ligera que comprende una región L-CDR1 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 6, una L-CDR2 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 7 y una región L-CDR3 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 8.

De acuerdo con la presente invención, "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tienen el mismo significado, y se utilizarán igualmente en la presente descripción. El término "anticuerpo" como se emplea en la presente memoria se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo abarca no solo moléculas de anticuerpo completas, sino también fragmentos de anticuerpos, así como variantes (incluyendo derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En los anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están conectadas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada está conectada a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ). Hay cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene dominios de secuencia distintos. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, denominados colectivamente CH). Las regiones variables de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad de unión al antígeno. Los dominios de región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren propiedades biológicas importantes tales como asociación de cadenas de anticuerpos, la secreción, la movilidad transplacentaria, la unión al complemento y la unión a receptores Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación del anticuerpo están formados por residuos que provienen principalmente de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o hipervariables. Ocasionalmente, los residuos de regiones no hipervariables o marco (FR) influyen en la estructura general del dominio y, por lo tanto, en el sitio de combinación. Las regiones determinantes de complementariedad o CDR se refieren a secuencias de aminoácidos que juntas definen la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión a inmunoglobulina nativa. Las cadenas ligeras y pesadas de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR, denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de las regiones V de cadena pesada y ligera. Las Regiones Marco (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR. Los residuos en dominios variables de anticuerpos están numerados convencionalmente de acuerdo con un sistema ideado por Kabat et al. Este sistema se expone en Kabat et al., 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, NIH, EE.UU. (en adelante "Kabat et al."). Este sistema de numeración se utiliza en la presente memoria descriptiva, excepto donde se indique lo contrario. Las designaciones de residuos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos que en la numeración estricta de Kabat correspondiente a un acortamiento o inserción en un componente estructural, ya sea una región marco o determinante de complementariedad (CDR), de la estructura básica del dominio variable. La numeración correcta de Kabat de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado mediante el alineamiento de los residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón". Las CDR del dominio variable de la cadena pesada se encuentran localizadas en los residuos 31-35 (CDR-H1), los residuos 50-65 (CDR-H2) y los residuos 95-102 (CDR-H3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, según Chothia (Chothia, C. y Lesk, A. M. J. Mol. Biol,

196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el residuo 26 hasta el residuo 32. Por lo tanto, 'CDR-H1', como se emplea en la presente memoria, comprende los residuos 26 a 35, como se describe mediante una combinación del sistema de numeración Kabat y la definición del bucle topológico de Chothia. Las CDR del dominio variable de la cadena ligera se encuentran en los residuos 24-34 (CDR-L1), los residuos 50-56 (CDR-L2) y los residuos 89-97 (CDR-L3) de acuerdo con el sistema de numeración Kabat.

De acuerdo con la presente descripción, el anticuerpo está aislado. Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían en los usos de diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más de 95% en peso de anticuerpo según lo determinado por el método de Lowry, y lo más preferiblemente más de 99% en peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de las células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Como se emplea en la presente memoria, el término "anticuerpo neutralizador" describe un anticuerpo que es capaz de neutralizar la actividad de señalización biológica de la neurotensina, por ejemplo, bloqueando la unión de la neurotensina a su receptor correspondiente. Se apreciará que el término "neutralizador" como se emplea en la presente memoria se refiere a una reducción en la actividad de señalización biológica que puede ser parcial o completa. En particular, un anticuerpo neutralizador según la presente descripción se refiere a un anticuerpo que inhibe (parcial o completamente) las propiedades oncogénicas de la neurotensina. Por ejemplo, dichas actividades neutralizadoras se evalúan típicamente de acuerdo con cualquier ensayo descrito en los Ejemplos.

Según la presente descripción, una primera secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con una segunda secuencia de aminoácidos significa que la primera secuencia tiene 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99 o 100% de identidad con la segunda secuencia de aminoácidos.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de péptidos o polipéptidos se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia específica de péptidos o polipéptidos, después de alinear el secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias maneras que están dentro del conocimiento práctico de la técnica, por ejemplo, utilizando soporte lógico informático disponible públicamente como los soportes lógicos BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr el máximo alineamiento en toda la longitud de las secuencias que se estén comparando. Sin embargo, para los fines de la presente memoria, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en donde el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla A a continuación. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente que se muestra en la Tabla A a continuación se ha archivado con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos, Washington DC, 20559, donde está registrado bajo el Registro de Derechos de Autor de los Estados Unidos Núm. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede recopilar a partir del código fuente proporcionado en la FIG. 8 a continuación. El programa ALIGN-2 se debe recopilar para su uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 para H-CDR1, SEQ ID NO: 3 para H- CDR2 y SEQ ID NO: 4 para H-CDR3.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción comprende una cadena ligera en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 para L-CDR1, SEQ ID NO: 7 para L-CDR2 y SEQ ID NO: 8 para L-CDR3.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 para H-CDR1, SEQ ID NO: 3 para H-CDR2 y SEQ ID NO: 4 para H-CDR3 y una cadena ligera en donde el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 para L-CDR1, SEQ ID NO: 7 para L-CDR2 y SEQ ID NO: 8 para L-CDR3.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción comprende una región variable de cadena pesada

que comprende SEQ ID NO: 2 en la región H-CDR1, SEQ ID NO: 3 en la región H-CDR2 y SEQ ID NO: 4 en la región H-CDR3; y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 6 en la región L-CDR1, SEQ ID NO: 7 en la región L-CDR2 y SEQ ID NO: 8 en la región L-CDR3.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos 70% de identidad con SEQ ID NO: 5.

10 Según la presente descripción, una primera secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con una segunda secuencia de aminoácidos significa que la primera secuencia tiene 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; o 100% de identidad con la segunda secuencia de aminoácidos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 1 y/o una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 5.

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción es un anticuerpo quimérico, típicamente un anticuerpo quimérico de ratón/humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo quimérico de ratón/humano comprende los dominios variables del anticuerpo FLp26-8.2 como se definió anteriormente.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo derivado del anticuerpo FLp26-8.2, y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción es un anticuerpo humanizado. En particular, en dicho anticuerpo humanizado, el dominio variable comprende regiones marco de aceptor humano, y opcionalmente un dominio constante humano cuando está presente, y CDR donadoras no humanas, tales como CDR de ratón como se definió anteriormente.

25 De acuerdo con la presente descripción, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que tiene regiones marco de la región variable y regiones constantes de un anticuerpo humano pero conserva las CDR del anticuerpo FLp26-8.2 (es decir, SEQ ID NO: 2, 3, 4, 6, 7 y 8).

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona adicionalmente fragmentos de dichos anticuerpos que incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub> y diacuerpos.

30 Como se emplea en la presente memoria, el término "Fab" denota un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y una actividad de unión a antígeno, en la que aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L completa, entre los fragmentos obtenidos por tratamiento de la IgG con una proteasa, papaína, se unen a través de un enlace disulfuro.

35 Como se emplea en la presente memoria, el término "F(ab')<sub>2</sub>" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 y una actividad de unión al antígeno, que es ligeramente mayor que el Fab unido a través de un enlace disulfuro de la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos por tratamiento de la IgG con una proteasa, pepsina.

Como se emplea en la presente memoria, el término "Fab'" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y una actividad de unión al antígeno, que se obtiene cortando un enlace disulfuro de la región bisagra de F(ab')<sub>2</sub>.

40 Como se emplea en la presente memoria, un polipéptido Fv de cadena sencilla ("scFv") es un heterodímero VH::VL conectado covalentemente que normalmente se expresa a partir de una fusión génica que incluye los genes codificantes de VH y VL conectados por un conector que codifica un péptido.

45 Como se emplea en la presente memoria, el término "dsFv" se refiere a un heterodímero VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. Los fragmentos de anticuerpos divalentes y multivalentes se pueden formar espontáneamente por asociación de scFv monovalentes, o se pueden generar mediante el acoplamiento de scFv monovalentes mediante un conector peptídico, tal como sc(Fv)<sub>2</sub> divalente.

50 Como se emplea en la presente memoria, el término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH-VL). Al utilizar un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

El anticuerpo de la presente descripción se puede producir mediante cualquier mecanismo conocido en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier mecanismo químico, biológico, genético o enzimático, solo o combinado. Por ejemplo, conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la materia puede producir

- fácilmente dichos anticuerpos, por medio de mecanismos convencionales para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, se pueden sintetizar utilizando un método en fase sólida bien conocido, preferiblemente utilizando un aparato de síntesis de péptidos disponible comercialmente (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, los anticuerpos de la presente descripción se pueden sintetizar mediante mecanismos de ADN recombinante bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden obtener como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican los anticuerpos en los vectores de expresión y la introducción de tales vectores en anfitriones eucariotas o procariotas adecuados que expresarán los anticuerpos deseados, a partir de los cuales se pueden aislar a continuación utilizando mecanismos bien conocidos.
- 5
- 10 Por consiguiente, un objeto adicional de la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la presente invención. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico codifica una cadena pesada y/o una cadena ligera de un anticuerpo de la presente invención.
- Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede incluirse en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector viral.
- 15 Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (p. ej., un gen foráneo) en una célula anfitriona, para transformar el anfitrión y promover la expresión (p. ej. transcripción y traducción) de la secuencia introducida.
- Así, un objeto adicional descrito en la presente memoria se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de la presente descripción.
- 20 Tales vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para causar o dirigir la expresión de dicho anticuerpo tras la administración a un sujeto. Los ejemplos de promotores y potenciadores utilizados en el vector de expresión para células animales incluyen el promotor temprano y el potenciador de SV40 (Mizukami T. et al. 1987), el promotor LTR y el potenciador del virus de la leucemia de ratón de Moloney (Kuwana Y et al. 1987), el promotor (Mason JO et al. 1985) y el potenciador (Gillies SD et al. 1983) de la cadena H de inmunoglobulina y similares.
- 25 Se puede utilizar cualquier vector de expresión para células animales, siempre que se pueda insertar y expresar un gen que codifique la región C del anticuerpo humano. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji H et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T et al. 1987), pHSG274 (Brady G et al. 1984), pKCR (O'Hare K et al. 1981), pSGI beta d2-4 (Miyaji H et al. 1990) y similares.
- 30 Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como por ejemplo pUC, pcDNA, pBR y similares.
- Otros ejemplos de vectores virales incluyen vectores adenovirales, retrovirales, de virus del herpes y AAV. Tales virus recombinantes se pueden producir mediante mecanismos conocidos en la técnica, tales como transfección de células de empaquetamiento o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Los ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Se pueden encontrar protocolos detallados para producir tales virus recombinantes de replicación defectuosa, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.
- 35
- 40 Un objeto adicional de la presente invención se refiere a una célula anfitriona que ha sido transfectada, infectada o transformada por un ácido nucleico y/o un vector según la presente descripción.
- El término "transformación" significa la introducción de un gen, secuencia de ADN o ARN "foráneos" (es decir, extrínsecos o extracelulares) a una célula anfitriona, de modo que la célula anfitriona expresará el gen o secuencia introducidos para producir una sustancia deseada, típicamente un proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducidos. Una célula anfitriona que recibe y expresa el ADN o ARN introducido ha sido "transformada".
- 45 Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para producir un anticuerpo de la presente descripción en un sistema de expresión adecuado. El término "sistema de expresión" significa una célula anfitriona y un vector compatible en condiciones adecuadas, p. ej., para la expresión de una proteína codificada por ADN foráneo portado por el vector e introducido en la célula anfitriona.
- 50 Los sistemas de expresión comunes incluyen células anfitrionas de E. coli y vectores plasmídicos, células anfitrionas de insectos y vectores de Baculovirus, y células anfitrionas de mamífero y vectores. Otros ejemplos de células anfitrionas incluyen, sin limitación, células procarióticas (tales como bacterias) y células eucarióticas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Los ejemplos específicos incluyen E. coli, levaduras Kluyveromyces o Saccharomyces, líneas celulares de mamífero (p. ej., células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.), así como cultivos de células de mamífero primarios o establecidos (p. ej., producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos también incluyen células SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), célula P3X63-
- 55

Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), células CHO en la que un gen de dihidrofolato reductasa (en lo sucesivo denominado "gen DHFR") es defectuoso (Urlaub G et al; 1980), células YB2/3HL.P2.G1 1.16Ag.20 de rata (ATCC CRL1662, en adelante referidas como "células YB2/0"), y similares.

5 La presente invención también se refiere a un método para producir una célula anfitriona recombinante que expresa un anticuerpo de acuerdo con la presente descripción, comprendiendo dicho método las etapas de: (i) introducir in vitro o ex vivo un ácido nucleico recombinante o un vector como se describe anteriormente en una célula anfitriona competente, (ii) cultivar in vitro o ex vivo la célula anfitriona recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o secretan dicho anticuerpo. Tales células anfitrionas recombinantes se pueden utilizar para la producción de anticuerpos de la presente descripción.

10 En otra realización particular, el método comprende las etapas de: (i) cultivar el hibridoma FLp26-8.2 en condiciones adecuadas para permitir la expresión del anticuerpo FLp26-8.2; y (ii) recuperar el anticuerpo expresado.

Los anticuerpos de la presente descripción se separan adecuadamente del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo quimérico humano de la presente descripción se puede producir obteniendo secuencias de ácido nucleico que codifican dominios VL y VH como se describió previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano insertándolos en un vector de expresión para células animales que tienen genes que codifican CH de anticuerpo humano y CL de anticuerpo humano, y expresando la secuencia codificante mediante la introducción del vector de expresión en una célula animal.

20 En cuanto al dominio CH de un anticuerpo quimérico humano, éste puede ser cualquier región que pertenezca a la inmunoglobulina humana, pero las de la clase IgG son adecuadas y también se puede utilizar cualquiera de las subclases que pertenecen a la clase IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Asimismo, en cuanto a CL de un anticuerpo quimérico humano, éste puede ser cualquier región que pertenezca a Ig, y se pueden utilizar las de la clase kappa o la clase lambda.

25 Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican mecanismos de ADN recombinante de transfección génica convencionales bien conocidos en la técnica (véase Morrison SL. et al. (1984) y los documentos de patente US 5.202.238 y US 5.204.244).

30 El anticuerpo humanizado de la presente descripción se puede producir obteniendo secuencias de ácido nucleico que codifican dominios CDR, como se describió previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo humanizado insertándolos en un vector de expresión para células animales que tengan genes que codifiquen (i) una región constante de cadena pesada idéntica a la de un anticuerpo humano y (ii) una región constante de cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano, y que expresen los genes mediante la introducción del vector de expresión en una célula animal.

35 El vector de expresión de anticuerpo humanizado puede ser de un tipo en el que un gen que codifica una cadena pesada de anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera de anticuerpo existen en vectores separados o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado, la facilidad de introducción en las células animales y el equilibrio entre los niveles de expresión de las cadenas H y L de anticuerpos en las células animales, se prefiere un vector de expresión de anticuerpos humanizados del tipo tándem (Shitara et al. 1994). Los ejemplos de vectores de expresión de anticuerpos humanizados de tipo tándem incluyen pKA TEX93 (documento WO 97/10354), pEE18 y similares.

40 Los métodos para producir anticuerpos humanizados basados en mecanismos de ADN recombinante de transfección génica convencionales son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Riechmann L. et al., 1988; Neuberger MS. et al. 1985). Los anticuerpos se pueden humanizar utilizando una variedad de mecanismos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO91/09967; Patentes de Estados Unidos Núm. 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), técnicas de remodelación o reconstrucción de la superficie (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan EA (1991); Studnicka GM et al. (1994); Roguska MA. et al. (1994)), y barajado de cadenas (Patente de Estados Unidos Núm. 5.565.332). También se conoce la tecnología de ADN recombinante general para la preparación de tales anticuerpos (véase la Solicitud de Patente Europea EP 125023 y la Solicitud de Patente Internacional WO 96/02576).

50 El Fab de la presente descripción se puede obtener tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con Axl con una proteasa, papaína. Asimismo, el Fab se puede producir insertando el ADN que codifica el Fab del anticuerpo en un vector para el sistema de expresión procariótico, o para el sistema de expresión eucariótico, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según corresponda) para expresar el Fab.

55 El F(ab')<sub>2</sub> de la presente descripción se puede obtener tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con Axl con una proteasa, pepsina. Asimismo, el F(ab')<sub>2</sub> se puede producir uniendo el Fab' descrito a continuación mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

El Fab' de la presente descripción se puede obtener tratando F(ab')<sub>2</sub> que reacciona específicamente con Axl con un agente reductor, ditiotreitól. Asimismo, el Fab' se puede producir insertando el ADN que codifica el fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para procariotas, o un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según corresponda) para realizar su expresión.

5 El scFv de la presente descripción se puede producir obteniendo un ADNc que codifica los dominios VH y VL como se describió previamente, construyendo un ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas, o un vector de expresión para eucariotas, y a continuación introduciendo el vector de expresión en un procariota o eucariota (según corresponda) para expresar el scFv. Para generar un fragmento scFv humanizado, se puede utilizar una tecnología bien conocida llamada injerto de CDR, que implica seleccionar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un fragmento scFv donante e injertarlas en un marco de un fragmento scFv humano de estructura tridimensional conocida (véase, p. ej. los documentos WO98/45322; WO 10 87/02671; US5.859.205; US5.585.089; US4.816.567; EP0173494). Se contemplan modificaciones en la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se sabe que cuando se produce un anticuerpo humanizado simplemente injertando solamente CDR en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en las FR de VH y VL de un anticuerpo humano, la actividad de unión al antígeno se reduce en comparación con la del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Se considera que varios residuos de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo no humano, no solo en las CDR sino también en FR, están directa o indirectamente asociados con la actividad de unión al antígeno. Por lo tanto, la sustitución de estos residuos de aminoácidos con diferentes 15 20 25 residuos de aminoácidos derivados de las FR de VH y VL del anticuerpo humano reduciría la actividad de unión. Para resolver el problema, en los anticuerpos injertados con CDR humanas, se deben hacer intentos para identificar, entre las secuencias de aminoácidos de la FR de VH y VL de los anticuerpos humanos, un residuo de aminoácido que esté directamente asociado con la unión al anticuerpo, o que interaccione con un residuo de aminoácido de CDR, o que mantenga la estructura tridimensional del anticuerpo y que esté directamente asociado con la unión al antígeno. La actividad reducida de unión al antígeno se podría incrementar reemplazando los aminoácidos identificados por residuos de aminoácidos del anticuerpo original derivado de un animal no humano.

Se pueden realizar modificaciones y cambios en la estructura de los anticuerpos de la presente descripción, y en las secuencias de ADN que los codifican, y aún obtener una molécula funcional que codifica un anticuerpo con características deseables. Al realizar los cambios en las secuencias de aminoácidos, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir una función biológica interactiva a una proteína se entiende generalmente en la técnica. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en función de su carácter hidrófobo y sus características de carga, que son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); 30 35 40 45 50 55 60 cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparragina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). Un objeto adicional de la presente descripción también abarca variantes conservativas de la función de los anticuerpos de la presente descripción.

Las "variantes conservativas de la función" son aquellas en las que se ha cambiado un residuo de aminoácido dado en una proteína o enzima sin alterar la conformación y la función general del polipéptido, incluyendo, pero sin limitarse a, el reemplazo de un aminoácido por uno que tenga similares propiedades (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, hidrófobo, aromático y similares). Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de actividad. Dado que la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína definen la actividad biológica funcional de la proteína, ciertas sustituciones de aminoácidos se pueden realizar en una secuencia de proteínas y, por supuesto, en su secuencia codificante de ADN, mientras se obtiene, sin embargo, una proteína con propiedades similares. Por lo tanto, se contempla que se pueden realizar varios cambios en las secuencias de anticuerpos de la invención, o las secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos anticuerpos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica. Se sabe en la técnica que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropáticos similares y todavía dan como resultado una proteína con actividad biológica similar, es decir, todavía obtienen una proteína funcionalmente equivalente desde el punto de vista biológico. Como se planteó anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su carácter hidrófobo, hidrófilo, su carga, su tamaño y similares. Las sustituciones ilustrativas que toman en consideración varias de las características anteriores son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparragina; y valina, leucina e isoleucina.

Se puede someter a ensayo la unión específica de los anticuerpos mediante cualquier método conocido en la técnica. Se pueden utilizar muchos formatos de ensayo de unión competitiva diferentes para los estudios de especificidad de epítomos. Los inmunoensayos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos que utilizan técnicas tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos con precipitina, ensayos de precipitación por difusión en gel, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, y

ensayos de fijación de complemento. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Ausubel et al., eds, 1994 *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). Por ejemplo, BIACORE® (GE Healthcare, Piscataway, NJ) es uno de una variedad de formatos de análisis por resonancia de plasmón superficial que se utilizan de forma rutinaria para caracterizar y clasificar epítomos en paneles de anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, se pueden realizar ensayos rutinarios de bloqueo cruzado tales como los descritos en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane, 1988.

Los anticuerpos modificados por ingeniería genética de la presente descripción incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones en los residuos del marco dentro de VH y/o VL, p. ej., para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, tales modificaciones del marco se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque consiste en "retromutar" uno o más residuos del marco a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener residuos del marco que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que deriva el anticuerpo. Tales residuos se pueden identificar comparando las secuencias del marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las cuales deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden "retromutar" a la secuencia de la línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR. También se pretende que tales anticuerpos "retromutados" sean abarcados por la descripción. Otro tipo de modificación del marco implica la mutación de uno o más residuos dentro de la región marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar los epítomos de células T para reducir así la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se denomina "desinmunización" y se describe con más detalle en la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 20030153043 de Carr et al.

Además o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro de las regiones marco o CDR, los anticuerpos de la presente descripción se pueden diseñar para que incluyan modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígenos. Además, un anticuerpo de la presente descripción se puede modificar químicamente (p. ej., se pueden anclar al anticuerpo uno o más radicales químicos) o se pueden modificar para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo.

Por ejemplo, se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente descripción se puede alterar utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por lo tanto, la presente descripción también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente descripción, que tienen una mejor afinidad por la neurotensina. Tales variantes se pueden obtener mediante varios protocolos de maduración de afinidad, incluyendo la mutación de las CDR (Yang et al., *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995), el barajado de cadenas (Marks et al., *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992), el uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368, 1996), el barajado de ADN (Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997), presentación en fagos (Thompson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer et al., *Nature*, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al., (supra) discuten estos métodos de maduración de afinidad.

En algunas realizaciones, la región bisagra de CH1 se modifica de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región de bisagra se altera, p. ej., aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.677.425 de Bodmer et al. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En algunas realizaciones, la región bisagra de Fc del anticuerpo de la presente invención está mutada para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfase del dominio CH2-CH3 del fragmento de Fc-bisagra, de modo que el anticuerpo tenga una unión a la proteína A estafilocócica (SpA) deteriorada con respecto a la unión a SpA del dominio Fc-bisagra nativo. Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.165.745 de Ward et al.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles varios enfoques. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, se puede alterar el anticuerpo dentro de la región CH1 o CL para que contenga un epítomo de unión al receptor salvaje tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG como se describe en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al.

En algunas realizaciones, la región Fc se altera al reemplazar al menos un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden reemplazar uno o más aminoácidos por un residuo de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero retenga la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo original. El ligando efector para el que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente CI del complemento. Este enfoque se describe con más detalle en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al.

En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos seleccionados entre los residuos de aminoácidos se pueden reemplazar por un residuo de aminoácidos diferente de modo que el anticuerpo tenga una unión a Clq alterada y/o presente una reducción o eliminación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.194.551 de Idusogie et al.

- 5 En algunas realizaciones, se alteran uno o más residuos de aminoácidos para alterar de ese modo la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer et al. En otra realización más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor de Fc modificando uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe adicionalmente en la  
10 publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, se han mapeado los sitios de unión en IgG1 humana para FcyRI, FcyRII, FcyRIII y FcRn y se han descrito variantes con una unión mejorada (véase Shields, L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604, WO2010106180).

- En algunas realizaciones, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar para, por  
15 ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación en el marco de la región variable para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal enfoque se describe con más detalle en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.714.350 y 6.350.861 de Co et al. Adicional o alternativamente, se puede  
20 preparar un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado o no fucosilado que tenga cantidades reducidas o ausencia de residuos de fucosilo, o un anticuerpo que presente un aumento de estructuras GlcNac bisectantes. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula anfitriona con una maquinaria de glicosilación alterada. Las células con una maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células anfitrionas en las que expresar anticuerpos recombinantes de la presente descripción para producir de ese modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hang et al. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de manera que los anticuerpos expresados en tal línea celular muestran hipofucosilación o carecen de residuos de fucosilo. Por lo tanto, en una realización, los anticuerpos de la presente descripción se pueden producir mediante expresión recombinante en una línea celular que muestre un patrón de hipofucosilación o no fucosilación, por ejemplo, una línea celular de mamífero con una expresión deficiente del gen FUT8 que codifica la fucosiltransferasa. La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una línea celular CHO variante, células Lecl3, con una capacidad reducida para anclar la fucosa a carbohidratos conectados a Asn (297), que también produce una hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula anfitriona (véase también Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La Publicación PCT WO 99/54342 de Umana et al. describe líneas celulares modificadas por ingeniería genética para expresar glicosil transferasas modificadoras de glicoproteína (p. ej., beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas por ingeniería genética muestren un incremento de estructuras de GlcNac bisectantes que dan como resultado una mayor actividad ADCC de los anticuerpos (véase también Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17: 176-180 ) Eureka Therapeutics describe adicionalmente células de mamíferos CHO modificadas por ingeniería genética capaces de producir anticuerpos con un patrón de glicosilación en mamíferos alterado sin residuos de fucosilo (<http://www.eurekainc.com/a&boutus/companyoverview.html>). Alternativamente, los anticuerpos de la presente descripción se pueden producir en levaduras u hongos filamentosos modificados por ingeniería genética para un patrón de glicosilación similar al de mamíferos y capaces de producir anticuerpos que carecen de fucosa como patrón de glicosilación (véase, por ejemplo, el documento EP1297172B1).

- Otra modificación de los anticuerpos en la presente memoria que está contemplada por la presente descripción es la pegilación. Un anticuerpo se puede pegar para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (p. ej., en suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, se hacen reaccionar típicamente con polietilenglicol (PEG), tal como un derivado éster o aldehído reactivos de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se anclan al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La pegilación se puede llevar a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se emplea en la presente memoria, se pretende que el término "polietilenglicol" abarque cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivatizar otras proteínas, tales como mono (CI-CIO) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que se va a pegar es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para pegar proteínas son conocidos en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la presente descripción. Véanse, por ejemplo, el documento EP 0 154 316 de Shimura et al. y el documento EP 0 401 384 de Ishikawa et al.

- 60 Otra modificación de los anticuerpos que contempla la invención es un producto conjugado o una fusión de proteínas de al menos la región de unión al antígeno del anticuerpo de la presente descripción a la proteína sérica, tal como la albúmina de suero humana o un fragmento de la misma para aumentar la semivida de la molécula resultante. Tal enfoque es descrito, por ejemplo, por Ballance et al. en el documento EP0322094.

Otra posibilidad es una fusión de al menos la región de unión a antígeno del anticuerpo de la presente descripción a proteínas capaces de unirse a proteínas del suero, tales como la albúmina de suero humana para aumentar la semivida de la molécula resultante. Tal enfoque es descrito, por ejemplo, por Nygren et al., en el documento EP 0 486 525.

- 5 Un objeto adicional de la presente descripción se refiere a un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la presente descripción.

Los tumores que se van a tratar incluyen tumores primarios y metastásicos, así como tumores refractarios. Los tumores refractarios incluyen tumores que no responden o que son resistentes al tratamiento con agentes quimioterapéuticos solos, anticuerpos solos, radiación sola o combinaciones de los mismos. Los tumores refractarios también abarcan tumores que parecen ser inhibidos por el tratamiento con tales agentes, pero que reaparecen hasta cinco años, a veces hasta diez años o más después de la interrupción del tratamiento. Los ejemplos de cánceres que se pueden tratar mediante los métodos y composiciones descritos en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas de la vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mama, colon, esófago, tracto gastrointestinal, encía, cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaringe, cuello, ovario, próstata, piel, estómago, testículos, lengua o útero. Además, el cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque no se limita a estos: neoplasia maligna; carcinoma; carcinoma indiferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiformes; carcinoma de células pequeñas; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma epitelial linfoide; carcinoma de células basales; carcinoma de pilomatriz; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células de transición; adenocarcinoma; gastrinoma maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; poliposis adenomatosa familiar de colon; carcinoma sólido; tumor carcinoide maligno; adenocarcinoma bronquioloalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma cortical suprarrenal; carcinoma endometroide; carcinoma de apéndice de la piel; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma de conducto infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, de mama; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma maligno; tumor maligno del estroma ovárico; teca maligna; tumor maligno de células granulosas; y roblastoma maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor maligno de células de Leydig; tumor maligno de células lipídicas; paraganglioma maligno; paraganglioma extramamario maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma maligno en nevo gigante pigmentado; melanoma de células epitelioides; nevo azul maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomioma; rhabdomioma; rhabdomioma embrionario; rhabdomioma alveolar; sarcoma del estroma; tumor mixto maligno; tumor mixto mulleriano; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma maligno; tumor de Brenner maligno; tumor filodes maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma maligno; struma ovarii maligno; coriocarcinoma; mesonefoma maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor de células gigantes de hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma maligno; cordoma; glioma maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplasmático; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo; meningioma maligno; neurofibrosarcoma; neurilemmoma maligno; tumor maligno de células granulares; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, de células grandes, difuso; linfoma maligno folicular; micosis fungoide; otros linfomas no Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia con células de linfosarcoma; leucemia mieloides; leucemia basófila; leucemia eosinofílica; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloides; y leucemia de células pilosas.

55 En algunas realizaciones, el paciente padece un cáncer derivado de origen epitelial. Los ejemplos de tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma (incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma y cáncer de células de los islotes), mesotelioma, schwannoma (incluyendo neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o neoplasias malignas linfoides. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (p. ej., cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de pulmón escamoso, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático,

glioblastoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o útero, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, 5  
cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores del tracto biliar, así como cáncer de cabeza y cuello, como los subtipos de cualquiera de tales cánceres, incluyendo, pero no limitados a los tipos resistentes a quimioterapia, resistentes a platino, avanzados, refractarios, y/o recurrentes de los mismos.

Según la presente descripción, el anticuerpo de la presente descripción se administra al paciente con una cantidad terapéuticamente eficaz. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del anticuerpo 10  
de la presente descripción para el tratamiento del cáncer con una razón beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente descripción será decidido por el médico a cargo dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la 15  
ruta de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados de manera combinada o coincidente con el anticuerpo específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, es bien conocido dentro del conocimiento práctico de la técnica comenzar las dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación 20  
diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto por día. Típicamente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se vaya a tratar. Un medicamento típicamente contiene de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, típicamente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Normalmente se suministra una cantidad eficaz del medicamento a 25  
un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción se utiliza combinado con un agente quimioterapéutico. Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los 30  
ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colchicinas ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los 35  
análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfalmida, mecloretamina, hidrocloreuro de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enediina (p. ej., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omega II (véase, p. ej., Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo 40  
dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de enediina cromoproteína relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCINO, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, doxorubicina HCl en inyección de liposomas (DOXIL®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, 45  
olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de 50  
dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-corteza suprarrenal tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziacuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucida; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; 60  
pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziacuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINEO, FILDESIN®); dacarbazona; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina;

arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®), formulación de paclitaxel con albúmina en nanopartículas (ABRAXANE), y doxetaxel (TAXOTERE®); clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovorina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometillornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es útil para restaurar la sensibilidad de las células cancerosas al agente quimioterapéutico, tales como los fármacos antineoplásicos basados en platino. Los ejemplos de fármacos antineoplásicos basados en platino incluyen cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, picoplatino, nedaplatino, triplatino y lipoplatino.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente descripción se utiliza combinado con un inhibidor de HER.

Como se emplea en la presente memoria, "HER" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un receptor de proteína tirosina quinasa que pertenece a la familia de receptores HER e incluye los receptores EGFR, HER2, HER3 y HER4. Como se emplean en la presente memoria, los términos "ErbB1", "HER1", "receptor del factor de crecimiento epidérmico" y "EGFR" se utilizan indistintamente en la presente memoria y se refieren a EGFR como describen, por ejemplo, Carpenter et al. en Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987). Como se emplean en la presente memoria, los términos "ErbB2" y "HER2" se utilizan indistintamente en la presente memoria y se refieren a la proteína HER2 humana descrita, por ejemplo, por Semba et al., en PNAS (EE.UU.) 82:6497-6501 (1985) y Yamamoto et al. en Nature 319:230-234 (1986) (número de acceso de Genbank X03363). Como se emplea en la presente memoria, el término "ErbB3" y "HER3" se refieren al polipéptido receptor como se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.183.884 y 5.480.968, así como Kraus et al. PNAS (EE.UU.) 86:9193-9197 (1989). Como se emplean en la presente memoria, los términos "ErbB4" y "HER4" se refieren al polipéptido receptor como se describe, por ejemplo, en la Solicitud de Patente EP Núm. 599.274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750 (1993); y Plowman et al., Nature, 366:473-475 (1993). Por "ligando HER" se entiende un polipéptido que se une y/o activa un receptor HER.

Como se emplea en la presente memoria, el término "inhibidor de HER" se refiere a un agente que interfiere en la activación o función de HER. Los ejemplos de inhibidores de HER incluyen anticuerpos contra HER (p. ej., anticuerpos contra EGFR, HER2, HER3 o HER4); antagonistas de HER de molécula orgánica pequeña; inhibidores de la tirosina quinasa; inhibidores duales de tirosina quinasa HER2 y EGFR tales como lapatinib/GW572016; moléculas antisentido (véase, por ejemplo, el documento WO2004/87207); y/o agentes que se unen a o interfieren en la función de las moléculas de señalización aguas abajo, tales como MAPK o Akt. Típicamente, el inhibidor de HER es un anticuerpo o molécula orgánica pequeña que se une a un receptor HER. En algunas realizaciones, el inhibidor de HER es un "inhibidor de dimerización de HER" que es un agente que inhibe la formación de un dímero de HER o un heterodímero de HER.

En algunas realizaciones, el inhibidor de HER es un "anticuerpo anti-HER" que es un anticuerpo que se une a un receptor HER. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal anti-HER de la presente descripción se utiliza para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra células que expresan HER. En otra realización particular, el anticuerpo anti-HER puede ser adecuado para alterar la expresión de HER en la superficie celular (p. ej., provocando la internalización de HER) de modo que la migración celular, la proliferación celular y el crecimiento tumoral de las células tumorales serán limitados o inhibidos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-HER es un producto conjugado de anticuerpo monoclonal anti-HER-fármaco. Un "producto conjugado de anticuerpo monoclonal anti-HER-fármaco" como se emplea en la presente memoria se refiere a un anticuerpo monoclonal anti-HER de acuerdo con la invención conjugado a un agente terapéutico. Tales productos conjugados de anticuerpo monoclonal anti-HER-fármaco producen efectos clínicamente beneficiosos sobre las células tumorales que expresan HER cuando se administran a un sujeto. En realizaciones típicas, un anticuerpo monoclonal anti-HER se conjuga con un agente citotóxico, de modo que el producto conjugado de anticuerpo-fármaco resultante ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre una célula tumoral que expresa HER cuando es absorbido o internalizado por la célula. Se puede utilizar cualquier agente citotóxico bien conocido por el experto en la técnica. En algunas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es auristatina E (también conocida en la técnica como dolastatina-10) o un derivado de la misma. Típicamente, el derivado de auristatina E es, p. ej., un éster formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, la auristatina E se puede hacer reaccionar con ácido paraacetilbenzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados típicos de auristatina incluyen AFP (dimetilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproina-fenilalanina-p-fenilendiamina), MMAF (dovalina-valina-dolaisoleucina-dolaproina-fenilalanina) y MAE (monometil auristatina E). La síntesis y la estructura de la auristatina E y sus derivados se describen en la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 20030083263; Publicaciones de Patente Internacionales Núm. WO 2002/088172 y WO 2004/010957; y Patentes de

Estados Unidos Núm. 6.884.869; 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

- Las Publicaciones de Patente relacionadas con anticuerpos contra HER incluyen: la Patente de Estados Unidos Núm. 5.677.171, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.720.937, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.720.954, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.725.856, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.770.195, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.772.997, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.165.464, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.387.371, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.399.063, el documento US2002/0192211A1, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.015.567, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.333.169, la Patente de Estados Unidos Núm. 4.968.603, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.821.337, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.054.297, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.407.213, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.719.971, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.800.738, el documento US2004/0236078A1, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.648.237, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.267.958, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.685.940, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.821.515, el documento WO98/17797, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.127.526, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.333.398, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.797.814, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.339.142, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.417.335, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.489.447, los documentos WO99/31140, US2003/0147884A1, US2003/0170234A1, US2005/0002928A1, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.573.043, los documentos US2003/0152987A1, WO99/48527, US2002/0141993A1, WO01/00245, US2003/0086924, US2004/0013667A1, WO00/69460, WO01/00238, WO01/15730, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.627.196B1, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.632.979B1, los documentos WO01/00244, US2002/0090662A1, WO01/89566, US2002/0064785, US2003/0134344, WO 04/24866, US2004/0082047, US2003/0175845A1, WO03/087131, US2003/0228663, WO2004/008099A2, US2004/0106161, WO2004/048525, US2004/0258685A1, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.985.553, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.747.261, la Patente de Estados Unidos Núm. 4.935.341, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.401.638, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.604.107, los documentos WO 87/07646, WO 89/10412, WO 91/05264, EP 412.116 B1, EP 494.135 B1, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.824.311, los documentos EP 444.181 B1, EP 1.006.194 A2, US 2002/0155527A1, WO 91/02062, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.571.894, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.939.531, los documentos EP 502,812 B1, WO 93/03741, EP 554.441 B1, EP 656.367 A1, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.288.477, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.514.554, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.587.458, los documentos WO 93/12220, WO 93/16185, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.877.305, WO 93/21319, WO 93/21232, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.856.089, el documento WO 94/22478, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.910.486, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.028.059, el documento WO 96/07321, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.804.396, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.846.749, los documentos EP 711.565, WO 96/16673, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.783.404, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.977.322, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.512.097, el documento WO 97/00271, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.270.765, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.395.272, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.837.243, el documento WO 96/40789, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.783.186, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.458.356, los documentos WO 97/20858, WO 97/38731, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.214.388, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.925.519, el documento WO 98/02463, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.922.845, los documentos WO 98/18489, WO 98/33914, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.994.071, el documento WO 98/45479, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.358.682 B1, los documentos US 2003/0059790, WO 99/55367, WO 01/20033, US 2002/0076695 A1, WO 00/78347, WO 01/09187, WO 01/21192, WO 01/32155, WO 01/53354, WO 01/56604, WO 01/76630, WO02/05791, WO 02/11677, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.582.919, los documentos US2002/0192652A1, US 2003/0211530A1, WO 02/44413, US 2002/0142328, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.602.670 B2, los documentos WO 02/45653, WO 02/055106, US 2003/0152572, US 2003/0165840, WO 02/087619, WO 03/006509, WO03/012072, WO 03/028638, US 2003/0068318, WO 03/041736, EP 1,357,132, US 2003/0202973, US 2004/0138160, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.705.157, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.123.939, los documentos EP 616.812 B1, US 2003/0103973, US 2003/0108545, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.403.630 B1, los documentos WO 00/61145, WO 00/61185, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.333.348 B1, los documentos WO 01/05425, WO 01/64246, US 2003/0022918, US 2002/0051785 A1, la Patente de Estados Unidos Núm. 6.767.541, los documentos WO 01/76586, US 2003/0144252, WO 01/87336, US 2002/0031515 A1, WO 01/87334, WO 02/05791, WO 02/09754, US 2003/0157097, US 2002/0076408, WO 02/055106, WO 02/070008, WO 02/089842, WO 03/86467, WO2013164689, WO2012059857.
- 55 En algunas realizaciones, el inhibidor de HER es una molécula orgánica pequeña. Como se emplea en la presente memoria, el término "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula de tamaño comparable a las moléculas orgánicas generalmente demandadas en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos, etc.); las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en tamaño hasta 2000 da, y lo más preferiblemente hasta aproximadamente 1000 Da.
- 60 En algunas realizaciones, el inhibidor de HER es un inhibidor de tirosina quinasa. Un "inhibidor de tirosina quinasa" es una molécula que inhibe la actividad tirosina quinasa del receptor de HER. Los ejemplos de tales inhibidores incluyen el inhibidor de tirosina quinasa HER2 de molécula orgánica pequeña tal como TAK165 disponible de Takeda; CP-724,714, un inhibidor selectivo oral de tirosina quinasa del receptor de ErbB2 (Pfizer y OSI); inhibidores

5 duales de HER tales como EKB-569 (disponible de Wyeth) que se une preferentemente a EGFR pero inhibe las células que expresan de manera anormalmente alta tanto HER2 como EGFR; GW 72016 (disponible de Glaxo) un inhibidor oral de tirosina quinasa HER2 y EGFR; PKI-166 (disponible de Novartis); inhibidores de pan-HER tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores no selectivos de HER tales como mesilato de Imatinib (Gleevec™); inhibidor de quinasa I regulado extracelular MAPK CI-1040 (disponible en Pharmacia); quinazolininas, tales como PD 153035,4-(3-cloroanilino)quinazolinina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidinas; curcumina (diferuloilmetano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen radicales nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); quinoxalininas (Patente de Estados Unidos Núm. 5.804.396); trifostinas (Patente de Estados Unidos Núm. 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores de pan-HER tales como CI-1033 (Pfizer); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: Patente de Estados Unidos Núm. 5.804.396; documento WO99/09016 (American Cyanamid); WO98/43960 (American Cyanamid); WO97/38983 (Warner Lambert); documento WO99/06378 (Warner Lambert); documento WO99/06396 (Warner Lambert); documento WO96/30347 (Pfizer, Inc); documento W096/33978 (Zeneca); documento WO96/3397 (Zeneca); y documento WO96/33980 (Zeneca).

20 En algunas realizaciones, el inhibidor de HER es un inhibidor de EGFR. Los inhibidores de la GFR son bien conocidos en la técnica (Inhibitors of erbB-1 kinase: Expert Opinion on Therapeutic Patents Dic 2002, Vol. 12, Núm. 12, Páginas 1903-1907, Susan E. Kane. Cancer therapies targeted to the epidermal growth factor receptor and its family members. Expert Opinion on Therapeutic Patents Feb 2006, Vol. 16, Núm. 2, Páginas 147-164. Peter Traxler Tyrosine kinase inhibitors in cancer treatment (Parte II). Expert Opinion on Therapeutic Patents Dic 1998, Vol. 8, Núm. 12, Páginas 1599-1625). Los ejemplos de tales agentes incluyen antibióticos y moléculas orgánicas pequeñas que se unen a EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, la Patente de Estados Unidos Núm. 4.943.533, Mendelsohn et al.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o Cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano remodelado (H225) (véase, el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo dirigido a EGFR completamente humano (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutante tipo II (Patente de Estados Unidos Núm. 5.212.290); anticuerpos quiméricos y humanizados que se unen a EGFR como se describe en la la Patente de Estados Unidos Núm. 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF (véase el documento WO98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab) un anticuerpo contra EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compite con EGF y TGF-alfa por su unión a EGFR; y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR se puede conjugar con un agente citotóxico, generando de ese modo un producto inmunoconjugado (véase, p. ej., el documento EP659,439A2, Merck Patent GmbH). Los ejemplos de moléculas orgánicas pequeñas que se unen a EGFR incluyen ZD1839 o Gefitinib (IRESSA™; Astra Zeneca); CP-358774 o erlotinib (TARCEVA™; Genentech/OSI); y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen); EMD-7200. En algunas realizaciones, el inhibidor de HER es un inhibidor de pan-HER de molécula orgánica pequeña tal como dacomitinib (PF-00299804).

40 En algunas realizaciones, el inhibidor de HER se selecciona del grupo que consiste en cetuximab, panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab, erlotinib, gefitinib, lapatinib, neratinib, canertinib, vandetanib, afatinib, TAK-285 (inhibidor dual de HER2 y EGFR), ARRY334543 (inhibidor dual de HER2 y EGFR), Dacomitinib (inhibidor de pan-ErbB), OSI-420 (Desmetil erlotinib) (inhibidor de EGFR), AZD8931 (inhibidor de EGFR, HER2 y HER3), AEE788 (NVP-AEE788) (inhibidor de EGFR, HER2 y VEGFR 1/2), Pelitinib (EKB-569) (inhibidor pan-ErbB), CUDC-101 (inhibidor EGFR, HER2 y HDAC), XL647 (inhibidor dual de HER2 y EGFR), BMS-599626 (AC480) (inhibidor dual de HER2 y EGFR), PKC412 (inhibidor de EGFR, PKC, proteína quinasa dependiente de AMP cíclico y quinasa S6), BIBX1382 (inhibidor de EGFR) y AP261 13 (inhibidor de ALK y EGFR). Los inhibidores cetuximab, panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab son anticuerpos monoclonales. Erlotinib, gefitinib, lapatinib, neratinib, canertinib, vandetanib y afatinib son inhibidores de tirosina quinasa.

50 El anticuerpo de la presente descripción se combina típicamente con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones farmacéuticas. "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción perjudicial cuando se administra a un mamífero, especialmente a un ser humano, según corresponda. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables se refieren a una carga, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico auxiliar de cualquier tipo. En las composiciones farmacéuticas de la presente descripción para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o combinado con otro principio activo, se puede administrar en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de ruta oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutáneas, transdérmicas, tópicas, intraperitoneales, intramusculares, intravenosas, subdérmicas, transdérmicas, intratecales e intranasales y formas de administración rectal. Típicamente, las

composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación susceptible de ser inyectada. Estas pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente secadas mediante congelación, que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe preservar contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Las soluciones que comprenden compuestos descritos en la presente memoria como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. El anticuerpo se puede formular en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. El portador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el anticuerpo activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados a un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y secado mediante congelación que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos y similares. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se debe tamponar adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido se vuelve isotónico primero con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la técnica conocerán los medios acuosos estériles que se pueden emplear a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación se podría disolver en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadir a 1000 ml de líquido de hipodermoclasia o inyectar en el sitio de infusión propuesto. Alguna variación en la dosificación se producirá necesariamente dependiendo de la condición del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el sujeto individual.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras:

**Figura 1:** FLp26-8.2 inhibe la inhibición de la proliferación de CHO que expresan de manera anormalmente alta NTSR1 inducida por NTS o medios acondicionados de células de cáncer de pulmón que expresan de manera anormalmente alta NTS. Los resultados representan la media  $\pm$  ETM de 3 experimentos independientes.

**Figura 2:** FLp26-8.2 inhibe la invasión celular inducida por EGF y NTS en células de cáncer de mama. Sinergia entre NTS y EGF sobre la invasión en un ensayo de invasión de colágeno 1 de células MCF-7 y NTS-1. Las células se sembraron en la parte superior de un gel de colágeno tipo 1 y se trataron con EGF (100 ng/mL). Los resultados representan la media  $\pm$  ETM de 3 experimentos. Recuadro, análisis de transcritos de NTS y NTSR1 de 200 ng de MCF-7 y TS-h, ARN total.

**Figura 3.** FLp26-8.2 inhibe la invasión celular inducida por NTS en el carcinoma hepatocelular. A) Migración en un ensayo de invasión de colágeno 1 de células Hep 3B, HepR1a y HepR2b. Los resultados representan la media  $\pm$

ETM de 3 experimentos. Los resultados se expresan como % en células invasivas de células control, Hep3B. Recuadro, análisis de transcritos de NTS y NTSR1 de 200 ng de ARN total de Hep 3B, HepR1a y HepR2b. B) Migración en un ensayo de invasión de colágeno tipo 1 de células Hep 3B, HepR1a y HepR2b en presencia de 3,75 µg/mL de FLP26-8.2 purificado o IgG de ratón. Los resultados representan la media ± ETM de 3 experimentos. Los resultados se expresan como % en células invasivas de las células de control respectivas.

**Figura 4.** FLP26-8.2 inhibe el crecimiento experimental del tumor generado por líneas celulares de cáncer de pulmón. A) Se inyectaron células LNM-R o R-SI NTSR1 (LNM-R que expresa ARNhc para NTSR1) en el flanco izquierdo y derecho de los ratones, respectivamente. Aquí se muestra un ejemplo de un ratón de cada grupo después de 15 días de tratamiento. B) Crecimiento tumoral generado por células LNM-R (flanco izquierdo) xenoinjertadas en ratones carentes de sistema inmunitario y tratadas durante 15 días con PBS, o 15 mg/kg de FLP26-8.2. El día uno, se aleatorizaron 10 y 8 ratones con un tamaño de tumores LNM-R que alcanzó aproximadamente 40 mm<sup>3</sup> para el grupo control y FLP26-8.2, respectivamente. Los ratones se trataron en días alternos y se midieron todos los días. C) Crecimiento tumoral generado por células R-SI NTSR1 (flanco derecho) xenoinjertadas en los mismos ratones. D y E) Tasa de crecimiento tumoral desde el día uno generada por células LNM-R (flanco izquierdo) y células R-SI NTSR1 (flanco derecho).

**Figura 5.** FLP26-8.2 inhibe el crecimiento tumoral experimental generado por las líneas celulares de cáncer de mama. Crecimiento tumoral generado por células MDA-MB 231 (flanco izquierdo) (A) y células MDA Si2 (flanco derecho) (B), y tratadas durante 24 días con PBS, o 15 mg/kg de FLP26-8.2. El día uno, 7 y 6 ratones fueron aleatorizados para el tamaño del tamaño de los tumores MDA-MB231; alcanzando aproximadamente 50 mm<sup>3</sup>. Los ratones se trataron y se midieron en días alternos.

**Figura 6.** FLP26-8.2 restaura la respuesta a cisplatino para las líneas celulares de cáncer de pulmón que expresan NTS y NTSR1. A) Se inyectaron células LNM-R o R-SI NTSR1 (LNM-R que expresa ARNhc para NTSR1) en los flancos izquierdo y derecho de los ratones, respectivamente; Los ratones se trataron con PBS, o 15 mg/kg de FLP26-8.2 en días alternos y/o con cisplatino 1 mg/kg los días 1, 3, 5, 7, 15, 17 y 19. El día uno, se aleatorizaron 9 y 8 ratones para el tamaño de los tumores LNM-R; alcanzando aproximadamente 95 mm<sup>3</sup> como promedio. Los ratones se trataron en días alternos y se midieron todos los días. B) Tasa de crecimiento tumoral desde el día uno generada por las células R-SI NTSR1 (flanco derecho).

### Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación y secuenciación de regiones variables de anticuerpos:

Etapa 0: Síntesis y conjugación de péptidos

Con el fin de inhibir la acción oncogénica de NTS, los autores de la presente invención produjeron anticuerpo monoclonal contra NTS dirigido contra el fragmento largo de NTS (SEQ ID NO: 9: mmagmkiqlv cmllafssw slcsdseeem kaleadftn mhtskiskah vpswkmtiln vcslvnnlns paeetgevhe eelvarrklp taldfgslea mltiyqlhki chsrafqhwe liqedildtg ndkngkeevi krkipyilkr qlyenkprpp yilkrdsyyy). La secuencia del péptido antigénico elegido fue SEQ ID NO:10 (CQEDILDTGNDKNGKE-amida PM 1777,9). 1.

La síntesis peptídica se controló por medio de MS y HPLC. El péptido utilizado fue la forma liofilizada como sal de TFA y conjugada con BSA.

Etapa 1: Inmunización

Se inmunizaron 5 ratones con el antígeno.

DO<sub>405nm</sub> después de 15 minutos de incubación con el sustrato. Las placas de ELISA se recubrieron con 50 µl/pocillo de producto conjugado de p12026-BSA (concentración 4 µg/ml).

Dilución de antisuero	ratón 1	ratón 2	ratón 3	ratón 4	ratón 5	Suero normal
1:100	2,523	2,918	2,796	3,236	2,183	0,032
1:200	2,167	2,428	2,216	2,899	1,764	0,016
1:400	1,442	1,629	1,221	2,336	1,291	0,016
1:800	0,759	0,879	0,435	1,398	0,881	0,012
1:1600	0,342	0,446	0,131	0,687	0,497	0,008
1:3200	0,145	0,215	0,042	0,289	0,273	0,010
1:6400	0,056	0,092	0,011	0,094	0,132	0,009
1:12800	0,027	0,037	0,002	0,032	0,063	0,004

La prueba funcional fue la inhibición de los cambios morfológicos de CHO que expresaban de manera anormalmente alta NTSR1 de forma estable e inducidos por JMV449  $10^{-8}$  o  $10^{-7}$  M un agonista de NTS degradable semanalmente, o el medio de cultivo de células LNM35 que expresaban NTS y NTSR1. Los resultados fueron los siguientes:

5 El suero del ratón núm. 4 inhibió los cambios morfológicos en 10%. Los ratones núm. 3 y núm. 5 presentaron una inhibición de solamente 5% en comparación con el suero preinmunitario. El suero de los ratones 1 y los ratones 2 no inhibió los cambios morfológicos. Los ratones que tenían un bajo título de anticuerpo se reforzaron con el fin de poder realizar la fusión.

Etapa 2: Fusión:

10 Se seleccionó el ratón núm. 4. Se obtuvieron 5 clones. Los clones 1-6, 7-12, 8-2, 13-1, y 16-12 se sometieron a prueba. Se realizaron dos pruebas para los cambios morfológicos de CHO NTSR1 inducidos por NTS y la prueba de invasión sobre matrices de colágeno tipo I de células MCF-7 que expresaban de manera anormalmente alta NTS. Los experimentos se repitieron dos veces. Solamente el clon 8.2 inhibió el efecto de NTS en ambas pruebas de 40% a 70% de acuerdo con el control. No se observaron efectos con los otros clones.

Etapa 3: selección final

15 Se seleccionó el hibridoma del clon 8-2 (es decir, FLp26-8.2). El anticuerpo se purificó y se sometió a prueba en ensayos de proliferación para CHO NTSR1, ensayos de invasión de células cancerosas de mama que expresaban, o no, NTSR1. También se sometió a prueba FLp26-8.2 en cuanto a crecimientos tumorales de células cancerosas de mama y pulmón, y en cuanto a su respuesta a cisplatino en un modelo de cáncer de pulmón.

Etapa 4: clonación y secuenciación

20 El ARN total se preparó a partir de  $2 \times 10^7$  de las células del primer tubo proporcionado para cada hibridoma utilizando el mini kit Qiagen RNeasy (Núm. de Cat: 74104). El ARN se hizo eluir en 60  $\mu$ L de agua y se verificó en un gel de agarosa al 1,2% junto con los marcadores Qarta Bio 1Kb (cat: M-DNA-1Kb). Las ADNc de  $V_H$  y  $V_K$  se prepararon utilizando transcriptasa inversa con cebadores de región constante IgG y kappa. Los ADNc de la primera hebra se amplificaron por PCR utilizando un gran conjunto de cebadores de secuencia señal. Los ADN amplificados se purificaron en gel y se clonaron en el vector pGem T Easy (Promega). Los clones  $V_H$  y  $V_K$  obtenidos se escrutaron en busca de insertos del tamaño esperado. La secuencia de ADN de los clones seleccionados se determinó en ambas direcciones mediante secuenciación de ADN automatizada. Las ubicaciones de las CDR en las secuencias se determinaron con referencia a otras secuencias de anticuerpos (Kabat EA et al., 1991).

30 Se identificó una única secuencia productiva de  $V_K$  en diez clones (ocho independientes). Las secuencias eran idénticas aparte de un cambio de una única base en un clon en la posición 33 y un cambio de una única base en otro clon en la posición 315. También se encontraron una  $V_K$  aberrante no productiva con un error en la unión V-J y la secuencia  $V_K$  aberrante que surge del compañero de fusión. La secuencia de proteínas deducida con las CDR anotadas se muestra en la Tabla A.

35 Se identificó una única secuencia de  $V_H$ . Se encontró una secuencia idéntica en seis clones independientes, aparte de dos cambios de una única base en los residuos 22 y 243 en un clon, un cambio de una única base en un clon en la posición 103 y un cambio de una única base en otro clon en la posición 261. La secuencia de proteínas deducida con las CDR anotadas se muestran en la Tabla A.

Tabla A: Secuencias del anticuerpo FLp26-8.2

Dominio	Secuencias
VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS <b>GYTFTNYGMN</b> WVKQAP GKGLKWMG <b>WITTNTGEPTYAEEFKG</b> RFAFSLETSASTAYLQ INNLKNEDTATYFCARR <b>RAFAMDY</b> WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:1)
H-CDR1	GYTFTNYGMN (SEQ ID NO: 2)
H-CDR2	WITTNTGEPTYAEEFKG (SEQ ID NO: 3)
H-CDR3	RAFAMDY (SEQ ID NO: 4)
VL	DIVMTQAAPSPVPTPGESVSISCR <b>RSSKSLLSNGNTYLY</b> WFLQRPGQSPQLLIY <b>RMSNLAG</b> VPDRFSGSGSGTAFTLR ISRVEAEDVGVYYC <b>MOHLEYPYTF</b> GGGGTKLEIK (SEQ ID NO:5)

Dominio	Secuencias
L-CDR1	RSSKSLLSNGNTYLY (SEQ ID NO: 6)
L-CDR2	RMSNLAS (SEQ ID NO: 7)
L-CDR3	MQHLEYPYT (SEQ ID NO: 8)

Ejemplo 2: Ensayos funcionales:

Material y métodos:

Proliferación celular

- 5 Se sembraron 20 000 células CHO-NTSR1 en placas de 48 pocillos, en medios de 200  $\mu$ l al 10% con FCS. Al día siguiente, las células se trataron con neurotensina  $10^{-7}$  M o medio acondicionado con  $\frac{1}{2}$  LNM-R que se habían incubado previamente durante 2 h a temperatura ambiente en presencia o no de 2,8  $\mu$ g de anticuerpo FLp26-8.2 o P27-7.4. Los medios condicionados se prepararon como sigue. Se sembraron 3 millones de células LNM-R en un matraz de 75  $\text{cm}^2$  en medio con FCS al 10%. Las células se hicieron crecer durante 24 h, se eliminaron los medios y se añadieron 10 ml de medios sin suero. Los medios se recogieron y se centrifugaron 5 minutos a 500 g después de 48 h. El sobrenadante se dividió en alícuotas y se congeló a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso. Las células fueron tratadas durante 40 h en 200  $\mu$ l de medio con FCS al 2,5%. La proliferación celular se evaluó contando por medio de recuento utilizando el recuento celular de Beckman Coulter.

Ensayo de invasión

- 15 El inserto de cultivo celular (8  $\mu$ m, Beckton Dickinson®) se recubrió con colágeno tipo I (100  $\mu$ l/pocillo,  $4 \times 10^2$   $\mu$ g/ml, Sigma®) a  $37^\circ\text{C}$  24h antes del ensayo. Se sembraron 1 millón de células MCF, NTS-h, Hep 3B, HepR1a, y HepR2b en el inserto con 250  $\mu$ l de medio sin suero en presencia o ausencia de 7  $\mu$ g de anticuerpos FLp26-8.2. Fuera del inserto, se añadieron 750  $\mu$ l de medio con FCS al 10% en el pocillo como quimioatrayente. Después de 48 h de incubación, las células no invasoras y el colágeno se eliminaron de la superficie superior de la membrana frotando con un hisopo de algodón. Las células invasoras (las que se adhieren a la superficie inferior de la membrana) se fijaron y se tiñeron con el kit de tinción Kwif diff (Thermo®) y se contó el número de células teñidas con un microscopio invertido a un aumento de 200X.

Xenoinjertos tumorales

- 25 Se inocularon subcutáneamente  $1 \times 10^6$  células LMN-R y  $1 \times 10^6$  R-SI NTSR1 en ratones NMRI nu/nu, LMN-R en el flanco izquierdo y R-SI NTSR1 en el flanco derecho. Cuando los tumores generados por LMN-R alcanzaron un volumen promedio de 40  $\text{mm}^3$ , los ratones fueron aleatorizados en 2 grupos, a continuación se les administró el anticuerpo FLp26-8.2 (i.p. en días alternos, 15 mg/kg) un total de 8 veces. Se utilizó PBS como control de vehículo. El volumen del tumor se midió diariamente.

- 30 Se inocularon subcutáneamente  $3 \times 10^6$  células MDA-MB 231 y  $3 \times 10^6$  MDA si2 en 100  $\mu$ l de matrigel en el flanco izquierdo y el flanco derecho de ratones NMRI nu/nu, respectivamente. Cuando los tumores generados por MDA alcanzaron un volumen promedio de 50  $\text{mm}^3$ , los ratones fueron aleatorizados en 2 grupos, a continuación se les administró el anticuerpo FLp26-8.2 (i.p. en días alternos, 15 mg/kg) un total de 12 veces. Se utilizó PBS como control de vehículo.

- 35 Prueba de cisplatino, se inocularon subcutáneamente  $1 \times 10^6$  células LMN-R y  $1 \times 10^6$  R-SI NTSR1 en ratones NMRI nu/nu, LMN-R en el flanco izquierdo y R-SI NTSR1 en el flanco derecho. Cuando los tumores generados por LMN-R alcanzaron un volumen promedio de 95  $\text{mm}^3$ , los ratones se aleatorizaron en 5 grupos de 8 a 10 ratones. Al grupo 1 se le administró PBS, al grupo 2 el anticuerpo FLp26-8.2 (i.p. en días alternos, 15 mg/kg) un total de 13 veces y al grupo 3 IgG de ratón (i.p. en días alternos, 15 mg/kg). Al grupo 4 se le administraron PBS y cisplatino (1 mg/kg el día 1, 3, 5, 7, 15, 17 y 19) y a los grupos 5 anticuerpo FLp26-8.2 (i.p. en días alternos, 15 mg/kg) y cisplatino (1 mg/kg el día 1, 3, 5, 7, 15, 17 y 19). El volumen del tumor se midió en días alternos.

Resultados:

La neutralización de NTS indujo la inhibición de la proliferación de CHO sobre la expresión de NTSR1

- 45 Las células LNM-R expresaron NTS y NTSR1. NTS se liberó a los medios y se sometió a ensayo por medio de radioinmunoensayo. El medio de cultivo (CM) de las células LNM-R contenía  $76,4 \pm 10,3$ ,  $153,2 \pm 25,3$  y  $624,3 \pm 81,8$  fmoles/mL de NTS correspondientes a 14, 48 y 72 horas de cultivo, respectivamente. Cuando las células CHO que expresan de manera anormalmente alta NTSR1 se exponen a NTS, las células cambian de forma, lo que induce una disminución en la tasa de proliferación. En la figura 1, el crecimiento celular se reduce en 60% cuando las células son tratadas por NTS o CM, cuando el anticuerpo monoclonal purificado FLp26-8.2 se añade a los medios, esta inhibición del crecimiento celular se reduce al 48% y 15%, para las células tratadas con NTS o CM,

respectivamente.

Neutralización de la invasión inducida por NTS de células de cáncer de mama que expresan NTS.

La línea celular de cáncer de mama, MCF-7, que expresa NTS constitutivamente se transfectó de manera estable con la secuencia codificante completa de neurotensina. Se seleccionó un clon que expresaba de manera anormalmente alta NTS, NTS-h, (recuadro de la Figura 2). Las propiedades de invasividad de NTS-h se estudiaron mediante un ensayo de invasión de colágeno tridimensional. La expresión ectópica de NTS de las células MCF-7 indujo un pequeño aumento en las propiedades de invasividad. La invasión inducida por EGF se triplicó en las células que expresaban de manera anormalmente alta NTS en comparación con MCF-7 (Figura 2). La inducción de la invasividad inducida o no por EGF fue inhibida por FLp26-8.2 solo en los clones que expresaban de manera anormalmente alta NTS. Esto confirma las propiedades neutralizadoras del anticuerpo monoclonal FLp26-8.2 contra NTS.

Neutralización de la invasión inducida por NTS de células de cáncer de hígado que expresaban NTSR1

Hep3B es un carcinoma hepatocelular que expresa NTS constitutivamente, pero no expresa NTSR1. Las células Hep3B se transfectaron de manera estable con la secuencia codificante de NTSR1 y se seleccionaron dos clones, Hep-R1a y Hep-R1b (recuadro de la Figura 3A). Las propiedades de invasividad de las células se estudiaron utilizando un ensayo de invasión de colágeno tridimensional. La expresión ectópica de NTSR1 aumentó en gran medida las propiedades invasivas de las células como se muestra en la Figura 3A. Cuando las células se expusieron a FLp26-8.2, la tasa invasiva de las células que expresaban NTS y NTSR1 se redujo, y de manera más drástica para las células para las cuales el aumento de la tasa invasiva era moderada, Hep-R1a. Ambos resultados confirman las propiedades neutralizadoras de este anticuerpo contra NTS sobre la invasividad celular.

FLp26-8.2 reduce el crecimiento tumoral específicamente en tumores que expresaban NTS y NSTR1

La eficacia de FLp26-8.2 para disminuir el crecimiento tumoral se sometió a prueba en tumores experimentales de cáncer de pulmón generados por células LNM-R que expresaban NTS y NTSR1 o células R-SI NTSR1 que expresaban solo NTS. Las células R-SI NTSR1 son un clon obtenido a partir de LNM-R y transfectadas de manera estable con ARNhc de NTSR1. Los ratones fueron injertados con ambas líneas celulares. Las células LNM-R en el flanco izquierdo y células R-SI NTSR1 en el flanco derecho (Figura 4A). Los ratones fueron aleatorizados con tumores LNM-R de  $42 \pm 11 \text{ mm}^3$  y  $43 \pm 8 \text{ mm}^3$  para los grupos tratados con PBS y FLp26-8.2, respectivamente. El tamaño del tumor de los animales tratados con el FLp26-8.2 fue 2,6 veces menor en comparación con los controles (Figura 4B). El tiempo de duplicación después de 16 días de tratamiento fue de  $3,43 \pm 0,34$  y  $5,96 \pm 0,55$  días para los animales de control y tratados con FLp26-8.2, respectivamente. El crecimiento desde D1 fue de  $24,68 \pm 4,05$  veces para los animales tratados con PBS y solo de  $5,92 \pm 0,99$  para los animales tratados con FLp26-8.2 (figura 4D). La especificidad y la eficacia del anticuerpo se confirmaron cuando se analizaron los tumores que portaban NTSR1 no expresado, en los mismos ratones. Para los tumores R-I NTSR1, el tamaño del tumor y la tasa de crecimiento no fueron diferentes si los ratones se trataban con PBS o FLp26-8.2 (Figura 4C y 4E).

En la misma línea, también se demostró que FLp26-8.2 reducía eficazmente el crecimiento tumoral generado por las células de cáncer de mama. MDA-MD 231 que expresaba NTS y NTSR1, y su subclón, MDA Si2, transfectado de manera estable con sh NSTR1, se sometieron a xenoinjerto en el flanco de los ratones. Células MDA-MD 231 en el flanco izquierdo y células MDA Si2 en el flanco derecho. Se inyectaron células MDA Si2 unos días antes de MDA MD 231. Los ratones se aleatorizaron con tumores MDA-MB231, de la siguiente manera  $52 \pm 10 \text{ mm}^3$  para el grupo de control y  $51,8 \pm 6 \text{ mm}^3$  para el grupo con FLp26-8.2. La Figura 5A muestra una fuerte reducción del crecimiento tumoral MDA-MB231 de las células por FLp26-8.2 en comparación con los animales tratados con PBS. La tasa de crecimiento desde D1 fue de  $4,4 \pm 0,33$  veces para los animales tratados con PBS y solo de  $2,1 \pm 0,18$  para los animales tratados con FLp26-8.2. El tiempo de duplicación después de 24 días de tratamiento fue  $11,63 \pm 1$  y  $55,5 \pm 32$  días para los animales de control y tratados con FLp26-8.2, respectivamente. Los mismos parámetros analizados en los tumores MDA Si2 (NTSR1-) no mostraron diferencias entre los tamaños de los tumores (Figura 5B), la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación.

FLp26-8.2 restaura la respuesta de cisplatino

La capacidad de FLp26-8.2 para restaurar la respuesta al cisplatino se sometió a prueba en tumores experimentales de cáncer de pulmón generados por células LNM-R que expresaban NTS y NTSR1 o células R-SI NTSR1 que expresaban solo NTS. Los ratones fueron injertados con ambas líneas celulares. Células LNM-R en el flanco izquierdo y células R-SI NTSR1 en el flanco derecho.

Los ratones se aleatorizaron con tumores LNM-R  $96,3 \pm 18,5$ ,  $87,1 \pm 8,4$ ,  $91,3 \pm 14,9$ ,  $96,9 \pm 11,2$  and  $91,4 \pm 10,1 \text{ mm}^3$  para grupos de ratones tratados con PBS, FLp26-8.2, PBS y cisplatino, FLp26-8.2 y cisplatino, o IgG de ratón, respectivamente. Debido al gran tamaño de los tumores generados, los experimentos se detuvieron después de 21 días para el grupo de control, 23 días para el grupo con IgG y PBS y cisplatino, 25 días para el grupo con FLp26-8.2 y 27 días para el grupo con FLp26-8.2 y cisplatino. Para los tumores LNM-R, el tamaño de los tumores se expresa en función del en la figura 6A. Como los tumores R-SI NTSR1 no pudieron ser aleatorizados, el resultado se presenta como la razón de crecimiento con respecto a D1 (Figura 6B).

Las tasas de crecimiento tumoral de LNM-R no se alteraron por el tratamiento con cisplatino o el tratamiento con IgG purificada, en comparación con los ratones tratados con PBS (Figura 6A). Como se mostró anteriormente, cuando los animales se tratan con FLp26-8.2, el tamaño del tumor LNM-R es más pequeño. El tamaño del tumor se estabiliza cuando los animales se tratan con FLp26-8.2 y cisplatino (Figura 6A).

- 5 El tamaño del tumor R-SI NTSR1 disminuye cuando los animales se tratan con cisplatino, lo que indica que el complejo NTS/NTSR1 está implicado en la resistencia celular al cisplatino (Figura 6B). Como se esperaba, el tratamiento combinado con FLp26-8.2 no cambió la tasa de crecimiento tumoral.

En conclusión, el tratamiento con FLp26-8.2 restaura la sensibilidad al cisplatino de las células que expresan NTS y NTSR1, y se puede proponer a pacientes con NSLCL que expresa altos niveles de NTSR1.

10 Referencias:

A lo largo de toda esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

1. Carraway, R. & Leeman, S. E. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 6854-6861.
2. Rosell, S. (1980) *Soc. Gen. Physiol Ser.* 35, 147-162.
3. Rosell, S., Al-Saffar, A., & Thor, K. (1984) *Scand. J. Gastroenterol. Supl* 96, 69-75.
4. Vincent, J. P., Mazella, J., & Kitabgi, P. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 302-309.
5. Thomas, R. P., Hellmich, M. R., Townsend, C. M., Jr., & Evers, B. M. (2003) *Endocr. Rev.* 24, 571-599.
6. Wu, Z., Martinez-Fong, D., Tredaniel, J., & Forgez, P. (2012) *Front Endocrinol. (Lausanne)* 3, 184.
7. Dupouy, S., Mourra, N., Doan, V. K., Gompel, A., Alifano, M., & Forgez, P. (2011) *Biochimie* 93, 1369-1378.
8. Alifano, M., Souaze, F., Dupouy, S., Camilleri-Broet, S., Younes, M., hmed-Zaid, S. M., Takahashi, T., Cancellieri, A., Damiani, S., Boaron, M. et al. (2010) *Clin. Cancer Res.* 16, 4401-4410.
9. Dupouy, S., Viardot-Foucault, V., Alifano, M., Souaze, F., Plu-Bureau, Chaouat, M., Lavour, A., Hugol, D., Gespach, C., Gompel, A. et al. (2009) *PLoS. One.* 4, e4223.
10. Shimizu, S., Tsukada, J., Sugimoto, T., Kikkawa, N., Sasaki, K., Chazono, H., Hanazawa, T., Okamoto, Y., & Seki, N. (2008) *Int. J. Cancer* 123, 1816-1823.
11. Guha, S., Rey, O., & Rozengurt, E. (2002) *Cancer Res.* 62, 1632-1640.
12. Heakal, Y., Woll, M. P., Fox, T., Seaton, K., Levenson, R., & Kester, M. (2011) *Cancer Biol. Ther.* 12, 427-435.
13. Ishizuka, J., Townsend, C. M., Jr., & Thompson, J. C. (1993) *Ann. Surg.* 217, 439-445.
14. Somai, S., Gompel, A., Rostene, W., & Forgez, P. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 482-488.
15. Souaze, F., Dupouy, S., Viardot-Foucault, V., Bruyneel, E., Attoub, S., Gespach, C., Gompel, A., & Forgez, P. (2006) *Cancer Res.* 66, 6243-6249.
16. Iwase, K., Evers, B. M., Hellmich, M. R., Kim, H. J., Higashide, S., Gully, D., & Townsend, C. M., Jr. (1996) *Surg. Oncol.* 5, 245-251.
17. Yoshinaga, K., Evers, B. M., Izukura, M., Parekh, D., Uchida, T., Townsend, C. M., Jr., & Thompson, J. C. (1992) *Surg. Oncol.* 1, 127-134.
18. Nakaizumi, A., Uehara, H., Baba, M., Iishi, H., & Tatsuta, M. (1996) *Cancer Lett.* 110, 57-61.
19. Tatsuta, M., Iishi, H., Baba, M., & Nakaizumi, A. (1991) *Int. J. Cancer* 47, 408-412.
20. Servotte, S., Camby, I., Debeir, O., Deroanne, C., Lambert, C. A., Lapiere, C. M., Kiss, R., Nusgens, B., & Decaestecker, C. (2006) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 32, 575-584.
21. Wu, Z., Martinez-Fong, D., Tredaniel, J., & Forgez, P. (2012) *Front Endocrinol. (Lausanne)* 3, 184.
22. Ehlers, R. A., Zhang, Y., Hellmich, M. R., & Evers, B. M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 704-708.
23. Gully, D., Labeeuw, B., Boigegrain, R., Oury-Donat, F., Bachy, A., Poncelet, M., Steinberg, R., Suaud-Chagny, M. F., Santucci, V., Vita, N. et al. (1997) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 802-812.
24. Hassan, S. & Carraway, R. E. (2006) *Regul. Pept.* 133, 105-114.
25. Hassan, S., Dobner, P. R., & Carraway, R. E. (2004) *Regul. Pept.* 120, 155-166.
26. Kisfalvi, K., Guha, S., & Rozengurt, E. (2005) *J. Cell Physiol* 202, 880-890.
27. Servotte, S., Camby, I., Debeir, O., Deroanne, C., Lambert, C. A., Lapiere, C. M., Kiss, R., Nusgens, B., & Decaestecker, C. (2006) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 32, 575-584.
28. Zhao, D., Kuhnt-Moore, S., Zeng, H., Wu, J. S., Moyer, M. P., & Pothoulakis, C. (2003) *Am. J. Physiol Cell Physiol* 284, C1397-C1404.
29. Leyton, J., Garcia-Marin, L., Jensen, R. T., & Moody, T. W. (2002) *Eur. J. Pharmacol.* 442, 179-186.
30. Lee, L. F., Guan, J., Qiu, Y., & Kung, H. J. (2001) *Mol. Cell Biol.* 21, 8385-8397.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> INSERM
- 5 <120> ANTICUERPOS ANTI-NEUROTENSINA DE FRAGMENTO LARGO Y USOS DE LOS MISMOS
- <130> BIO14016 FORGEZ / MC
- <160> 10
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 116
- 15 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Secuencia VH
- 20 <400> 1
- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ile | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Pro | Glu | Leu | Lys | Lys | Pro | Gly | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asn | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Met | Asn | Trp | Val | Lys | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Lys | Trp | Met |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Trp | Ile | Thr | Thr | Asn | Thr | Gly | Glu | Pro | Thr | Tyr | Ala | Glu | Glu | Phe |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Gly | Arg | Phe | Ala | Phe | Ser | Leu | Glu | Thr | Ser | Ala | Ser | Thr | Ala | Tyr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Gln | Ile | Asn | Asn | Leu | Lys | Asn | Glu | Asp | Thr | Ala | Thr | Tyr | Phe | Cys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Arg | Arg | Ala | Phe | Ala | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Ser | Val |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Val | Ser | Ser |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 115 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asn | Tyr | Gly | Met | Asn |     |     |     |     |     |     |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     |     |

ES 2 747 731 T3

<220>  
<223> H-CDR2

<400> 3  
Trp Ile Thr Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys  
1 5 10 15

5 Gly

<210> 4  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> H-CDR3

15 <400> 4  
Arg Ala Phe Ala Met Asp Tyr  
1 5

<210> 5  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Artificial

20

<220>  
<223> Secuencia VL

25

<400> 5  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

30

<210> 6  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial

35

<220>  
<223> L-CDR1

<400> 6  
Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr  
1 5 10 15

40

ES 2 747 731 T3

<210> 7  
<211> 7  
<212> PRT  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> L-CDR2

10 <400> 7  
Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

<210> 8  
<211> 9  
15 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> L-CDR3

20 <400> 8  
Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 9  
<211> 170  
25 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 9  
30 Met Met Ala Gly Met Lys Ile Gln Leu Val Cys Met Leu Leu Leu Ala  
1 5 10 15

ES 2 747 731 T3

Phe Ser Ser Trp Ser Leu Cys Ser Asp Ser Glu Glu Glu Met Lys Ala  
 20 25 30

Leu Glu Ala Asp Phe Leu Thr Asn Met His Thr Ser Lys Ile Ser Lys  
 35 40 45

Ala His Val Pro Ser Trp Lys Met Thr Leu Leu Asn Val Cys Ser Leu  
 50 55 60

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

Glu Glu Leu Val Ala Arg Arg Lys Leu Pro Thr Ala Leu Asp Gly Phe  
 85 90 95

Ser Leu Glu Ala Met Leu Thr Ile Tyr Gln Leu His Lys Ile Cys His  
 100 105 110

Ser Arg Ala Phe Gln His Trp Glu Leu Ile Gln Glu Asp Ile Leu Asp  
 115 120 125

Thr Gly Asn Asp Lys Asn Gly Lys Glu Glu Val Ile Lys Arg Lys Ile  
 130 135 140

Pro Tyr Ile Leu Lys Arg Gln Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro  
 145 150 155 160

Tyr Ile Leu Lys Arg Asp Ser Tyr Tyr Tyr  
 165 170

<210> 10  
 <211> 16  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> péptido antigénico

10 <400> 10

Cys Gln Glu Asp Ile Leu Asp Thr Gly Asn Asp Lys Asn Gly Lys Glu  
 1 5 10 15

15

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo neutralizador que se une al fragmento largo de la neurotensina humana como se expone en SEQ ID NO:9, y que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende una región H-CDR1 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 2, una región H-CDR2 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 3 y una región H-CDR3 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 4; y una región variable de la cadena ligera que comprende una región L-CDR1 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 6, una L-CDR2 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 7 y una región L-CDR3 que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 8.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 para H-CDR1, SEQ ID NO: 3 para H-CDR2 y SEQ ID NO: 4 para H-CDR3.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena ligera en donde el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 para L-CDR1, SEQ ID NO: 7 para L-CDR2 y SEQ ID NO: 8 para L-CDR3.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 para H-CDR1, SEQ ID NO: 3 para H-CDR2 y SEQ ID NO: 4 para H-CDR3 y una cadena ligera en donde el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 para L-CDR1, SEQ ID NO: 7 para L-CDR2 y SEQ ID NO: 8 para L-CDR3.
5. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 2 en la región H-CDR1, SEQ ID NO: 3 en la región H-CDR2 y SEQ ID NO: 4 en la región H-CDR3; y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 6 en la región L-CDR1, SEQ ID NO: 7 en la región L-CDR2 y SEQ ID NO: 8 en la región L-CDR3.
6. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos 70% de identidad con SEQ ID NO: 5 o que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 1 y/o una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 5.
7. Anticuerpo según la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo quimérico, tal como un anticuerpo quimérico de ratón/ser humano, un anticuerpo humanizado, Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', dsFv, sc(Fv)<sub>2</sub> y diacuerpos.
8. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada y/o una cadena ligera de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 8.
10. Una célula anfitriona que ha sido transfectada, infectada o transformada por la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 8 o el vector de la reivindicación 9.
11. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.
12. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 11, en donde cáncer se selecciona del grupo que consiste en neoplasia maligna; carcinoma; carcinoma indiferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiformes; carcinoma de células pequeñas; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma epitelial linfóide; carcinoma de células basales; carcinoma de pilomatriz; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células de transición; adenocarcinoma; gastrinoma maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; poliposis adenomatosa familiar de colon; carcinoma sólido; tumor carcinoide maligno; adenocarcinoma bronquioloalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma cortical suprarrenal; carcinoma endometrioide; carcinoma de apéndice de la piel; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma de conducto infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, de mama; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma maligno; tumor maligno del estroma ovárico; tecoma maligno; tumor maligno de células granulosas; y roblastoma maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor maligno de células de Leydig; tumor maligno de células lipídicas; paraganglioma maligno;

- paraganglioma extramamario maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma maligno en nevo gigante pigmentado; melanoma de células epitelioides; nevo azul maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rhabdomyosarcoma; rhabdomyosarcoma embrionario; rhabdomyosarcoma alveolar;
- 5 sarcoma del estroma; tumor mixto maligno; tumor mixto mulleriano; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma maligno; tumor de Brenner maligno; tumor filodes maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma maligno; struma ovarii maligno; coriocarcinoma; mesonefoma maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma;
- 10 condroblastoma maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor de células gigantes de hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma maligno; cordoma; glioma maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplasmático; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo; meningioma maligno;
- 15 neurofibrosarcoma; neurilemmoma maligno; tumor maligno de células granulares; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, de células grandes, difuso; linfoma maligno folicular; micosis fungoide; otros linfomas no Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia con células de linfosarcoma; leucemia mieloide; leucemia basófila; leucemia eosinofílica; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide; y leucemia de células pilosas.
- 20
13. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 11, en donde el anticuerpo se utiliza combinado con un agente quimioterapéutico.
14. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 11, en donde el agente quimioterapéutico es cisplatino.
- 25
15. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 11, en donde el anticuerpo se utiliza combinado con un inhibidor de HER, tal como un anticuerpo contra HER seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos contra EGFR, anticuerpos contra HER2, anticuerpos contra HER3 y anticuerpos contra HER4, antagonistas de HER de molécula orgánica pequeña; inhibidores de tirosina quinasa de HER; inhibidores duales de tirosina quinasa de HER2 y EGFR, inhibidores de la dimerización de HER, cetuximab, panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab, erlotinib, gefitinib, lapatinib, neratinib, canertinib, vandetanib, afatinib, TAK-285, ARRY334543, Dacomitinib, OSI-420, AZD8931, AEE788, Pelitinib, CUDC-101, XL647, BMS-599626, PKC412, BIBX1382, AP261 13 e inhibidor de pan-HER.
- 30
16. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

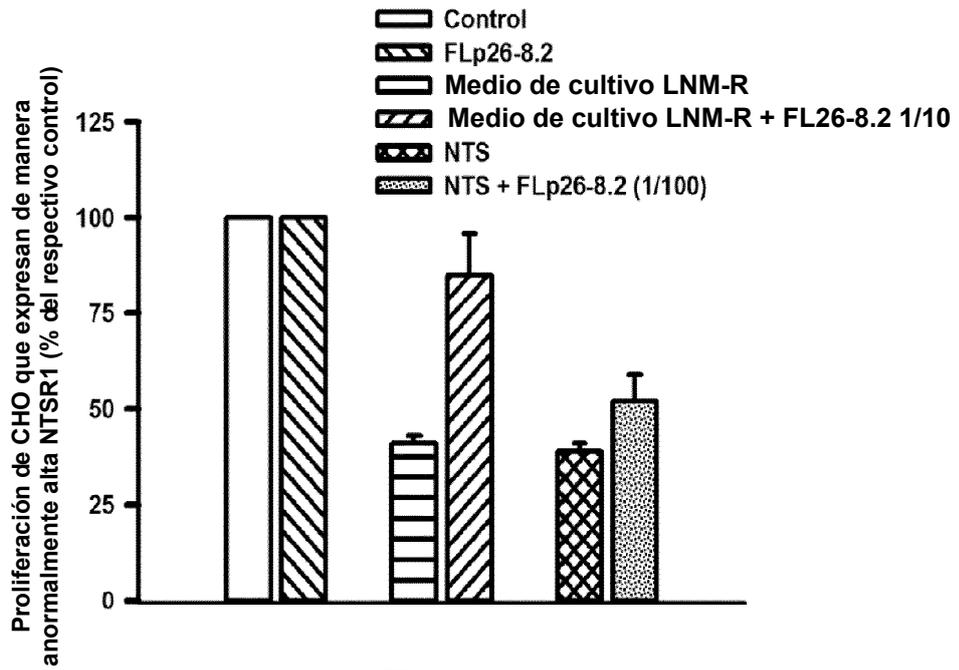


Figura 1

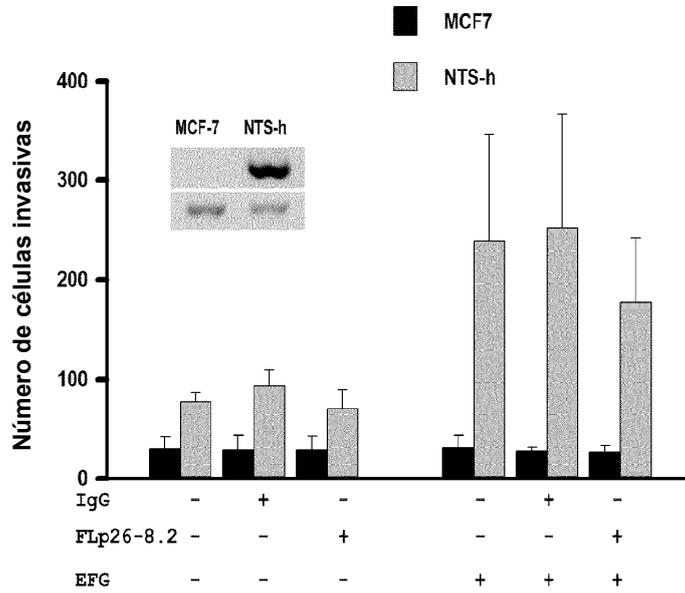


Figura 2

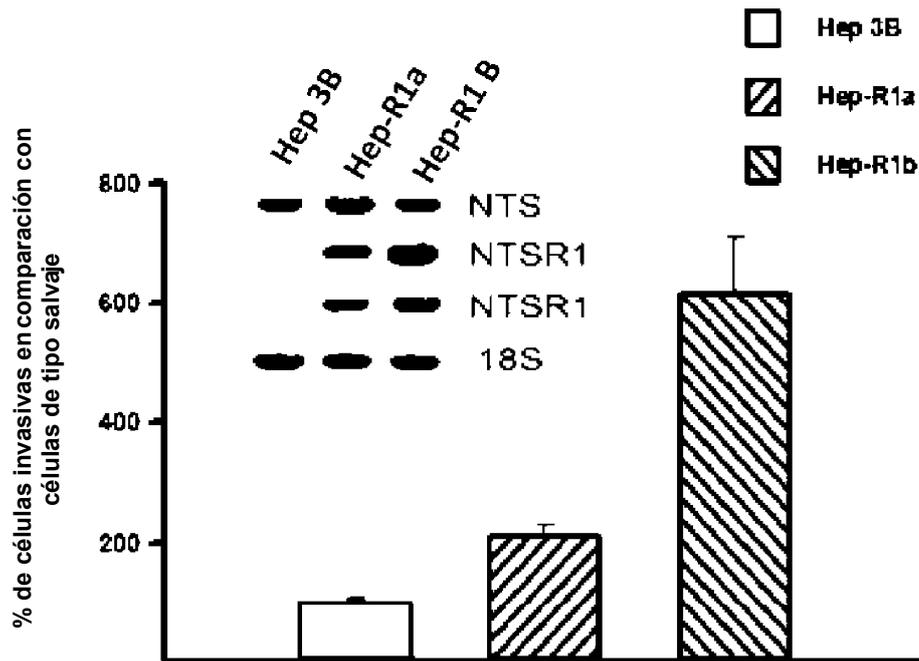


Figura 3A

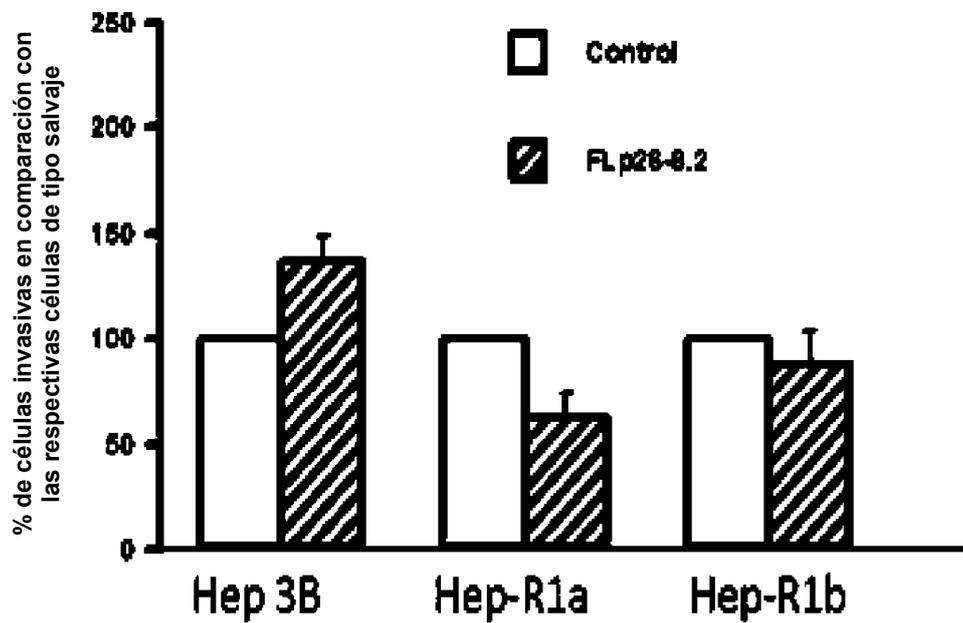


Figura 3B

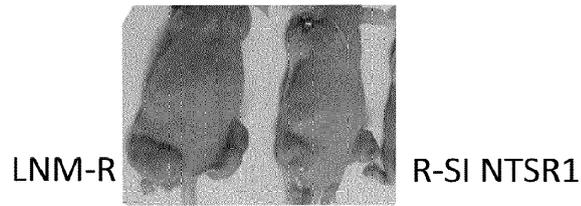


Figura 4A

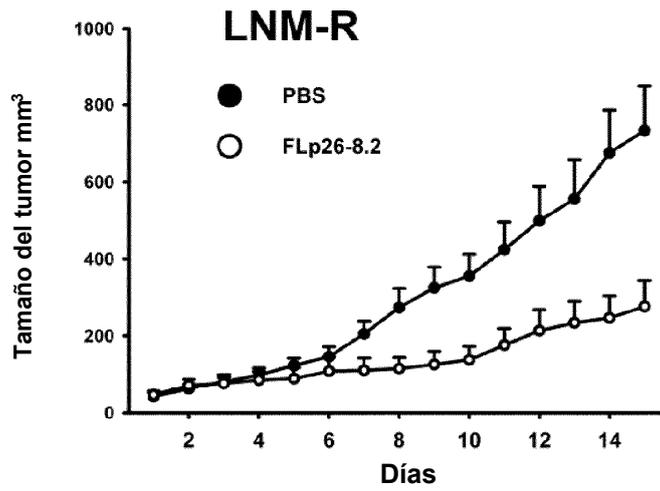


Figura 4B

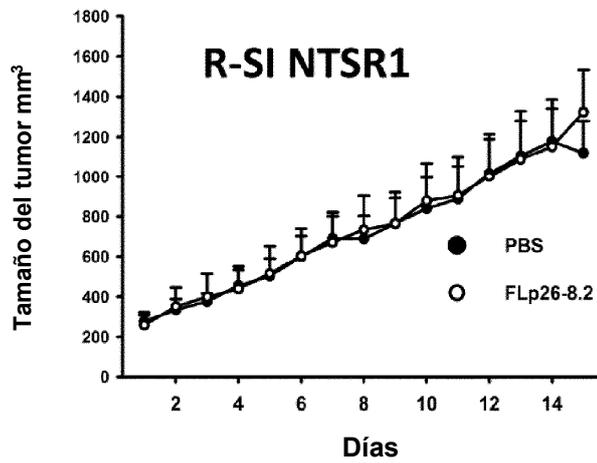


Figura 4C

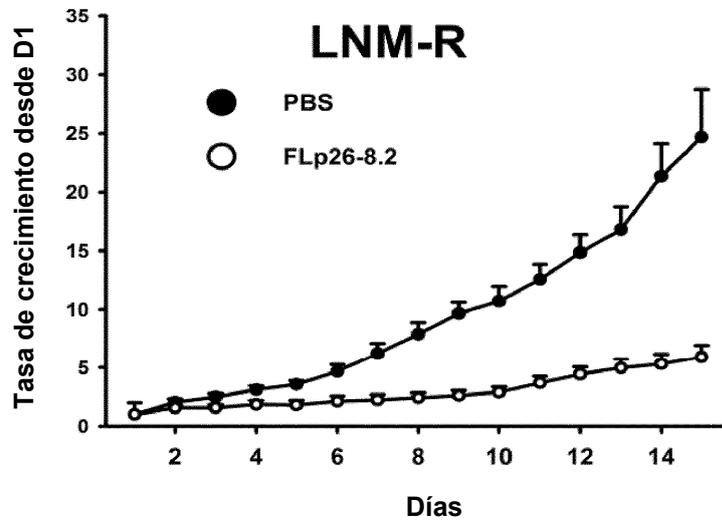


Figura 4D

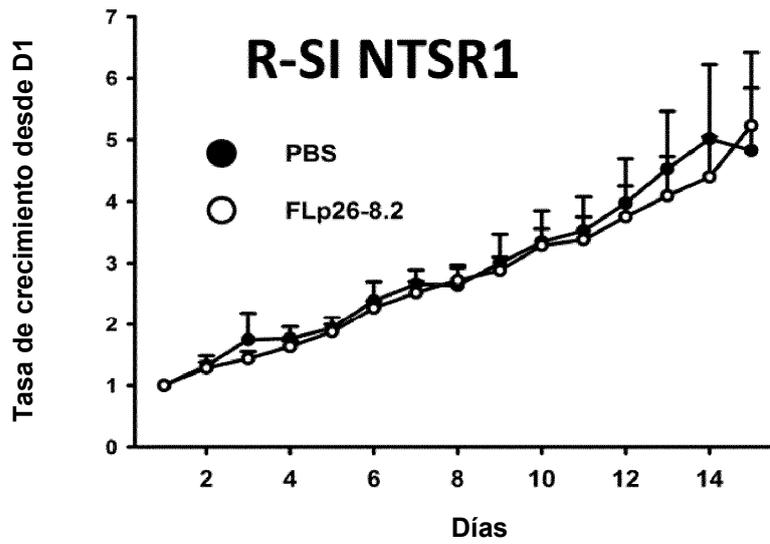


Figura 4E

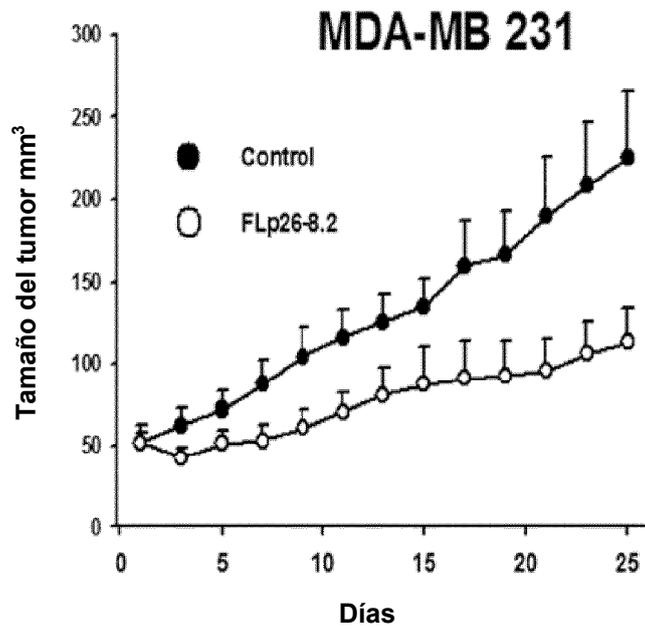


Figura 5A

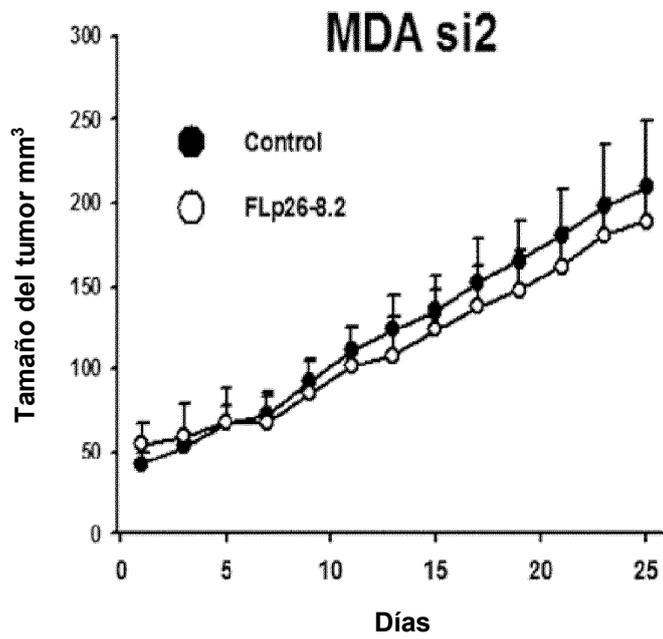


Figura 5B

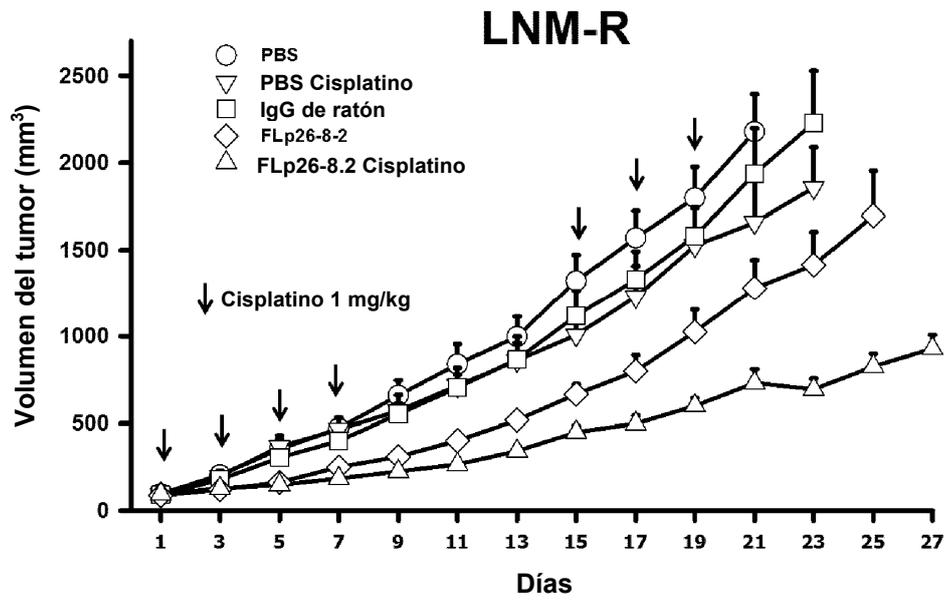


Figura 6A

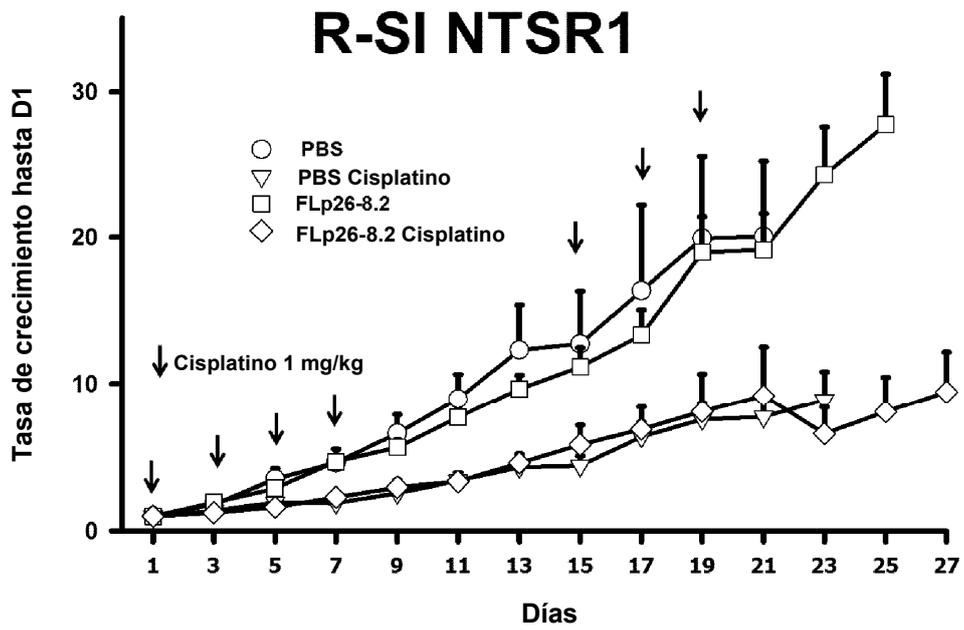


Figura 6B