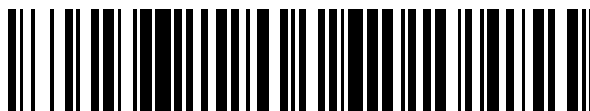


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 329**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 33/243 (2009.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2016** **PCT/IL2016/050299**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016** **WO16147194**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2016** **E 16715905 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019** **EP 3271726**

54 Título: **Anticuerpos contra la anfirregulina, composiciones que los comprenden y usos de los mismos**

30 Prioridad:

19.03.2015 IL 23785215

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

08.05.2020

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD. (100.0%)
at the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
7610002 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**YARDEN, YOSEF;
CARVALHO, SILVIA y
LINDZEN, MOSHIT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 759 329 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 contra la anfirregulina, composiciones que los comprenden y usos de los mismos

La presente invención se refiere a un método para determinar la idoneidad de un sujeto para un tratamiento con un anticuerpo contra la anfirregulina, y a un agente que hace descender una actividad o expresión de la anfirregulina para ser usado en el tratamiento contra el cáncer.

Campo y antecedentes de la invención

La presente invención, en algunas de sus realizaciones, se refiere a anticuerpos contra la anfirregulina, a las composiciones que los comprenden y a los usos de los mismos.

La invención en su forma más amplia está definida por las reivindicaciones 1 a 6 independientes.

Los factores de crecimiento y sus receptores afines intervienen en la respuesta rápida a las señales extracelulares en un proceso estrechamente regulado por bucles de retroalimentación positiva y negativa. La alteración de este delicado equilibrio a menudo está implicada en el desarrollo de una enfermedad. Un ejemplo de esta situación lo proporciona la familia de receptores de los factores de crecimiento epidérmico (EGFR, por su nombre en inglés) que son receptores con actividad tirosina cinasa (RTK, por su nombre en inglés) y sus ligandos similares al EGF. La familia está comprendida por cuatro RTK (EGFR/ERBB1/HER1, ERBB2/HER2, ERBB3/HER3 y ERBB4/HER4) y 11 ligandos, polipéptidos de la familia de EGF/neurregulina (NRG). Estos ligandos se pueden clasificar de acuerdo con su afinidad por el EGFR, por ejemplo, el EGF, el factor α de crecimiento transformante (TGF- α , por su nombre en inglés), el factor de crecimiento epidérmico con afinidad por la heparina (HB-EGF, por su nombre en inglés), y la β -celulina (BTC) se consideran ligandos de alta afinidad. En cambio, la anfirregulina (AREG), epirregulina (EREG) y epígeno (EPG) se consideran ligandos de baja afinidad.

Está muy consolidado que la fijación del ligando a la región extracelular del EGFR favorece la dimerización del receptor e incrementa la actividad de su dominio cinasa intracelular, lo que conduce a la activación de las siguientes etapas de las vías de señalización. Después de la fijación del ligando, el EGFR se internaliza rápidamente desde la superficie celular, lo que da lugar a la atenuación de la señal, bien a través de la degradación del receptor y del ligando, o bien solo del ligando. Es interesante que, aunque los ligandos de alta afinidad estimulan una respuesta fuerte y robusta, la ráfaga de activación dura poco tiempo debido a los potentes bucles de retroalimentación negativa. Sin embargo, en determinadas condiciones, los ligandos de baja afinidad, que incluyen un ligando artificial, muestran una potencia mitógena relativamente alta debido a mecanismos que no se conocen del todo. Este fenómeno también se observa con los muchos ligandos del EGFR codificados por el virus de la viruela. Estos ligandos víricos a menudo muestran una afinidad de fijación por el receptor más baja que sus homólogos de mamífero, pero su actividad biológica a veces es más potente.

De los ligandos de baja afinidad, cada vez se conocen más funciones clave que la AREG desempeña en las situaciones normales y patológicas. El AREG de humano está localizado en la banda cromosómica 4q14.3 que abarca aproximadamente 10 kb del ADN genómico. El AREG está flanqueado en la región en 5' por los miembros de su familia EREG y EPG, y en la región 3' por otro pariente, BTC. El gen está compuesto por 6 exones que codifican un ARNm de 1,4 kb. La proteína correspondiente se sintetiza como un precursor transmembranario de 252 aminoácidos (pro-AREG), que sufre una escisión proteolítica dentro de su ectodominio, gracias a lo cual se libera una proteína soluble con actividad biológica. En este proceso interviene la enzima convertidora del factor α de la necrosis tumoral (TACE, por su nombre en inglés), un miembro de la familia de la desintegrina y de la metaloproteínasa (también conocida como ADAM 17).

El EGFR se puede activar mediante la AREG de diferentes maneras: activación autocrina o paracrina mediante la forma soluble de la AREG, un modo yuxtacrino que permite que la forma transmembranaria no escindida active el EGFR, o mediante un modo recién descrito de señalización en el que están vinculados los exosomas que contienen la AREG, que refuerzan mejor la invasión de las células destinatarias en comparación con los exosomas que contienen ligandos de alta afinidad.

La AREG desempeña funciones clave en el desarrollo de la glándula mamaria, en la maduración de los ovocitos, así como en la ramificación y la morfogénesis que se produce dentro de los tejidos epiteliales, tales como pulmón, próstata y riñón. A la inversa, la AREG también ha sido relacionada con el proceso oncogénico. La expresión de la AREG ha sido relacionada con un peor pronóstico de los tumores de próstata, hepatocelular, de páncreas, de mama, de pulmón, de colon y de cabeza y cuello.

Otras técnicas ya conocidas incluyen:

La solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2004/0210040 se refiere a anticuerpos contra la anfirregulina (AR) y su uso para tratar el cáncer y la psoriasis. En particular, la patente de los EE. UU. 2004/0210040 da a conocer anticuerpos anti-AR, así como composiciones farmacéuticas que los comprenden y el uso de los mismos para inhibir el crecimiento de las células cancerosas (p. ej., cáncer de ovario) o la psoriasis. El anticuerpo de la patente

de los EE. UU. 2004/0210040 puede estar conjugado a un resto efector, tal como un agente citotóxico, o se puede administrar junto con una sustancia citotóxica (p. ej., un antineoplásico).

La solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2006/0246448 se refiere a la inhibición de la TACE o de la anfirregulina para la modulación de la transactivación de la señal del EGFR. En particular, en la patente de los EE. UU. 2006/0246448 se dan a conocer anticuerpos o fragmentos de anticuerpo dirigidos contra la anfirregulina o la TACE, y el uso de los mismos para el tratamiento del trastorno hiperproliferativo, tal como el cáncer o la psoriasis.

En So et al. *Febs Lett.* 2014, 588 (21): 3998-4007 se da a conocer que el incremento de la AREG induce la metástasis del cáncer de ovario. En particular, So et al. ilustran que la AREG induce la invasión de las células del cáncer de ovario al hacer descender la expresión de la cadherina E.

En Fusanori Yotsumoto et al.: «Amphiregulin regulates the activation of ERK and Akt through epidermal growth factor receptor and HER3 signals involved in the progression of pancreatic cancer» (XP055226799) se describen anticuerpos que se fijan a la anfirregulina humana utilizados en el ELISA para valorar la validez de la anfirregulina como una diana del tratamiento del cáncer de páncreas.

En la patente europea 1 449 538 A1 se describe la modulación de la transactivación de los receptores con tirosina cinasa debido a la transducción de la señal mediada por el receptor acoplado a proteínas G o por la proteína G en una célula o en un organismo que comprende la inhibición de la actividad de la metaloproteasa TACE/ADAM17 y/o de la actividad de la anfirregulina, el ligando del receptor con actividad tirosina cinasa.

En la solicitud de patente internacional WO 2008/044068 A2 se describen anticuerpos monoclonales neutralizantes que se fijan a la anfirregulina humana capaces de inhibir el crecimiento tumoral, y el uso de los Acm que se fijan a la anfirregulina para hacer descender la viabilidad celular y el crecimiento celular de las líneas celulares de cáncer colorrectal y de carcinoma de pulmón.

Compendio de la invención

La presente invención se ha desarrollado en contra de los antecedentes y de las limitaciones y los problemas asociados que proceden de ellos.

Para conseguir esto, el método para determinar la idoneidad de un sujeto para un tratamiento con un anticuerpo de la invención contra la anfirregulina comprende las características reclamadas en la reivindicación 1, y la sustancia química que hace descender una actividad o expresión de la anfirregulina para ser usada en el tratamiento contra el cáncer de la invención comprende las características reclamadas en la reivindicación 6.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se da a conocer un método para determinar la idoneidad de un sujeto para un tratamiento con un anticuerpo contra la anfirregulina, en donde el sujeto tiene un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de páncreas, que presenta resistencia a la quimioterapia, en donde el método comprende analizar en una muestra biológica del sujeto el nivel de expresión de la anfirregulina, del factor α de crecimiento transformante (TGF- α) y del factor de crecimiento epidérmico con afinidad por la heparina (HB-EGF), en donde un nivel de expresión de la anfirregulina por encima de un umbral predeterminado y la ausencia de expresión del TGF- α y/o del HB-EGF, o una expresión por debajo de un nivel predeterminado de TGF- α y/o el HB-EGF, es indicativo de la idoneidad del sujeto para el tratamiento con el anticuerpo contra la anfirregulina.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la muestra biológica comprende una biopsia.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la biopsia comprende un líquido ascítico o un líquido pleural.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la muestra biológica comprende una muestra de sangre.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cáncer es cáncer de ovario, y en donde el antineoplásico es un derivado del platino.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de referencia, se da a conocer un método para tratar el cáncer, en donde el método comprende administrar a un sujeto, seleccionado de acuerdo con el método de algunas realizaciones de la invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que hace descender una actividad o expresión de la anfirregulina, gracias a lo cual se trata el cáncer.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se da a conocer un agente que hace descender una actividad o expresión de la anfirregulina para ser usado en el tratamiento del cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de páncreas, que presenta resistencia a la quimioterapia en un sujeto, en quien está indicado un nivel de expresión de la anfirregulina por encima de un umbral predeterminado y la ausencia de expresión del factor α de crecimiento transformante (TGF- α) y/o del factor de crecimiento epidérmico con afinidad por la heparina (HB-EGF), o una expresión por debajo de un nivel predeterminado de dicho TGF- α y/o dicho HB-EGF en una muestra biológica de dicho sujeto.

- De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de referencia, se da a conocer un método para producir un anticuerpo específico contra la anfirregulina humana, en donde el método comprende la inmunización de un animal con la anfirregulina genosuprimida con una proteína de tipo anfirregulina humana, o un péptido de la misma, para producir una respuesta de anticuerpos contra la proteína de tipo anfirregulina, o un péptido de la misma, gracias a lo cual se produce el anticuerpo específico contra la anfirregulina humana.
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el método comprende además la generación de anticuerpos monoclonales a partir de las células productoras de anticuerpos del animal genosuprimido después de la inmunización.
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
- De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de referencia, se da a conocer un anticuerpo producido de acuerdo con el método de algunas realizaciones de la invención.
- De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de referencia, se da a conocer un anticuerpo que comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se fija específicamente a la anfirregulina y que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por su nombre en inglés) como las que se presentan en las SEQ ID NOs. 4, 6, 8, 18, 20 y 22 (AR30).
- De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de referencia, se da a conocer un anticuerpo que comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se fija específicamente a la anfirregulina y que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) como las que se presentan en las SEQ ID NOs. 32, 34, 36, 48, 50 y 52 (AR558).
- De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de referencia, se da a conocer un anticuerpo que comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se fija específicamente a la anfirregulina y que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) como las que se presentan en las SEQ ID NOs. 64, 66 y 68 (AR37).
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, las CDR presentadas en las SEQ ID NOs. 18, 20 y 22 están dispuestas en orden secuencial de N a C en una cadena ligera del anticuerpo y las CDR presentadas en las SEQ ID NOs. 4, 6 y 8 están dispuestas en orden secuencial de N a C en una cadena pesada del anticuerpo.
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, las CDR presentadas en las SEQ ID NOs. 48, 50 y 52 están dispuestas en orden secuencial de N a C en una cadena ligera del anticuerpo y las CDR presentadas en las SEQ ID NOs. 32, 34 y 36 están dispuestas en orden secuencial de N a C en una cadena pesada del anticuerpo.
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, las CDR presentadas en las SEQ ID NOs. 64, 66 y 68 están dispuestas en orden secuencial de N a C en una cadena pesada del anticuerpo.
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el anticuerpo es capaz de sensibilizar las células de cáncer de ovario a un antineoplásico.
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el anticuerpo es capaz de reducir el tamaño del tumor de ovario de un tumor de ovario que secreta anfirregulina.
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el anticuerpo es un anticuerpo pananfirregulina.
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el anticuerpo no reacciona con una anfirregulina de ratón.
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el anticuerpo está humanizado.
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el anticuerpo está conjugado a un resto efector.
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el resto efector se selecciona del grupo que consiste en una radioterapia, una toxina, una quimioterapia y un marcador.
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el antineoplásico está compuesto de platino.
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el anticuerpo comprende un dominio de reconocimiento del antígeno que se fija específicamente a la anfirregulina con una K_D por debajo de 10 nM.
- De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de referencia, se da a conocer una combinación de anticuerpos que comprende al menos dos anticuerpos, en donde un primer anticuerpo de la combinación de anticuerpos es el anticuerpo de algunas realizaciones.
- De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, la combinación de anticuerpos comprende los anticuerpos de

algunas realizaciones.

De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el segundo anticuerpo de la combinación de anticuerpos se fija a un ligando del receptor de factores de crecimiento epidérmico (EGFR) distinto del primer anticuerpo.

- 5 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de referencia, se da a conocer una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo el anticuerpo de algunas realizaciones o la combinación de anticuerpos de algunas realizaciones, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 10 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de referencia, se da a conocer un método para tratar un cáncer en un sujeto que lo necesita, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de algunas realizaciones o la combinación de anticuerpos de algunas realizaciones, gracias a lo cual se trata el cáncer.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de referencia, se da a conocer un uso de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de algunas realizaciones o la combinación de anticuerpos de algunas realizaciones para la fabricación de un medicamento identificado por servir para el tratamiento de un cáncer en un sujeto que lo necesita.

- 15 De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer de ovario, un cáncer de pulmón, un cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas y un cáncer de mama.

De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el cáncer comprende un cáncer de ovario.

De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el sujeto es resistente a la quimioterapia.

- 20 De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el sujeto se caracteriza por un nivel de expresión de la anfirregulina por encima de un umbral predeterminado y, de manera optativa, por la ausencia de expresión del TGF- α y/o del HB-EGF, o una expresión por debajo de un nivel predeterminado del TGF- α y/o del HB-EGF en comparación con un sujeto sano.

- 25 De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el método comprende además analizar en el sujeto el nivel de expresión de la anfirregulina y, de manera optativa, del HB-EGF y del TGF- α antes de la administración.

De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el método comprende además administrar al sujeto un antineoplásico.

De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el antineoplásico es cisplatino o doxorubicina.

- 30 De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, la cantidad terapéuticamente eficaz da lugar a la sensibilización de las células cancerosas del sujeto a un antineoplásico después de la administración.

De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, la cantidad terapéuticamente eficaz da lugar a la reducción del tamaño del tumor en el sujeto después de la administración.

- 35 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de referencia, se da a conocer un artículo fabricado que comprende el anticuerpo de algunas realizaciones o la combinación de anticuerpos de algunas realizaciones y un antineoplásico que está envasado en un material de envase y que está identificado en una impresión, en o sobre el material del envase, para ser usado en el tratamiento del cáncer.

De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el anticuerpo o la combinación de anticuerpos y el antineoplásico están en contenedores separados.

De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el antineoplásico está compuesto de platino.

- 40 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de referencia, se da a conocer un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo de algunas realizaciones.

De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el polinucleótido aislado comprende las secuencias de ácido nucleico como las que se presentan en las SEQ ID NOs. 3, 5, 7, 17, 19 y 21.

- 45 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de referencia, se da a conocer un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo de algunas realizaciones.

De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el polinucleótido aislado comprende las secuencias de ácido nucleico como las que se presentan en las SEQ ID NOs. 31, 33, 35, 47, 49 y 51.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de referencia, se da a conocer un polinucleótido aislado que

codifica el anticuerpo de algunas realizaciones.

De acuerdo con algunas realizaciones de referencia, el polinucleótido aislado de algunas realizaciones comprende as secuencias de ácido nucleico como las que se presentan en las SEQ ID NOs. 63, 65 y 67.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y/o científicos que se utilizan en la presente memoria tienen el mismo significado que suele conocer el experto en la técnica a la cual pertenece la invención. Aunque se pueden utilizar métodos y material similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para la puesta en práctica o la comprobación de las realizaciones, se describen a continuación los métodos y/o el material de ejemplo. En caso de conflicto, la especificación de la patente, que incluye las definiciones, será el control. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

Breve descripción de las diferentes vistas de los dibujos

Algunas realizaciones de la invención están descritas en la presente memoria, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos acompañantes. Al hacer ahora referencia específica a los dibujos con detalle, se pretende resaltar que los pormenores mostrados lo son a modo de ejemplo y con el propósito de ilustrar la explicación de las realizaciones de la invención. En este sentido, la descripción hecha con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo se pueden llevar a la práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

En las figuras 1A-D se ilustra la gran abundancia de AREG en los líquidos de pacientes con cáncer de ovario y de pulmón y en los medios acondicionados por las células de cáncer de ovario. La figura 1A es una representación de tipo matriz cromática de la abundancia de los ligandos indicados de la familia del EGF según se determina mediante ELISA y 43 líquidos ascíticos recogidos de pacientes con cáncer de ovario. Se representa el margen de colores (columna derecha); la figura 1B es una representación de tipo matriz cromática de líquidos de derrame pleural recogidos de pacientes con cáncer de pulmón analizados como en la figura 1A; la figura 1C es un gráfico en el que se ilustra la expresión de ligandos de la familia de EGF en las células de cáncer de ovario. Las 13 líneas celulares de ovario indicadas se inocularon en placas de 10 cm, se cubrieron con el medio (6 ml) y se incubaron durante 4 días. Se les recogió el medio y se cuantificaron por ELISA los ligandos especificados; y la figura 1D es un gráfico que ilustra la expresión de los ligandos de la familia de EGF en las líneas celulares de cáncer de pulmón. Se analizó un panel de siete líneas celulares de cáncer de pulmón como en la figura 1C.

En las figuras 1E-F se ilustra que AREG se suele detectar en los líquidos de pacientes con cáncer de ovario y de pulmón. La figura 1E es una representación gráfica de dispersión de las determinaciones por ELISA de los factores de crecimiento indicados en el líquido ascítico de los pacientes con cáncer de ovario ($n = 43$); y la figura 1F es una representación gráfica de dispersión, como en la figura 1E, de los factores de crecimiento indicados en el líquido de derrame pleural de 18 pacientes con cáncer de pulmón. Cada punto representa un paciente (véanse las figuras 1A-B y la tabla 1, que aparecerá más adelante).

En las figuras 2A-F se ilustra que la AREG es un ligando de baja afinidad que induce un escaso descenso del receptor, así como poca ubiquitinación y poca degradación del EGFR. La figura 2A es un gráfico en el que se muestran los resultados de células de cáncer de ovario MCAS sembradas en placas de 12 pocillos e incubadas durante 3 horas en hielo con un EGF radiomarcado (^{125}I -EGF; 50 ng/ml) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes del ligando competidor (sin marcar) indicado. Las células se lavaron luego y se lisaron, y se determinó la radioactividad asociada. La magnitud del desplazamiento de ligando (media $\pm$ margen de triplicados) se representó gráficamente en función de la fijación en ausencia de un ligando sin marcar; la figura 2B es un gráfico en el que muestran los resultados de las células de ovario MCAS incubadas en una placa de 12 pocillos y que estuvieron con ayuno de factores séricos durante una noche. Al día siguiente, las células se estimularon (o no se estimularon) con EGF (10 ng/ml), TGF- α (10 ng/ml) o AREG (50 ng/ml) durante 30, 60, 90 y 120 min. Después, las células se transfirieron a 4 °C y el descenso del EGFR se ensayó tras la exposición a un EGF radiactivo (^{125}I -EGF; 50 ng/ml) durante 60 min. A continuación, se lavaron las células y se lisaron en NaOH a 1 N. Se determinó la radiactividad asociada a las células. Se presenta el promedio de los triplicados y los valores de la desviación estándar (barras); y las figuras 2C-F son fotografías que muestran los resultados de extractos completos de las líneas celulares de cáncer de ovario MCAS y MLS, así como las líneas celulares de cáncer de pulmón H358 y A549, que se habían estimulado con anterioridad durante 10 min con EGF (100 ng/ml), TGF- α (100 ng/ml) o AREG (100 ng/ml o 1 $\mu\text{g/ml}$), y se sometieron a la inmunoprecipitación (IP) del EGFR. Los inmunocomplejos lavados, junto con los extractos completos, se inmunotransfirieron (IT) con los anticuerpos indicados.

En las figuras 2G-H se ilustra que la AREG es un ligando de baja afinidad capaz de inducir solo un escaso descenso del receptor en las células epiteliales normales. La figura 2G es un gráfico en el que se ilustran los resultados de la línea celular inmortalizada de mamífero humano MCF10A utilizada para los ensayos de desplazamiento de ligando. Las células se sembraron en placas de 12 pocillos y se incubaron durante 3 h en hielo con un EGF radiomarcado (^{125}I -EGF; 50 ng/ml) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de un ligando

competidor sin marcar, tal y como está indicado. Luego se lavaron las células y se lisaron, y se determinó la radiactividad asociada. Se representa la magnitud del desplazamiento de ligando (media $\pm$ margen de triplicados); y la figura 2H es un gráfico en el que se ilustran los resultados de las células de MCF10A que crecieron en placas de 12 pocillos y que se mantuvieron con ayuno de factores séricos durante una noche. Al día siguiente, las células se mantuvieron en el medio de ayuno (control) o se estimularon durante los intervalos de tiempo indicados con EGF (1 ng/ml), TGF- α (1 ng/ml) o AREG (1 ng/ml o 100 ng/ml; marcado como *Alfa*). A continuación, se ensayó el descenso del EGFR, en hielo, con el uso de una incubación de 60 min con un EGF radiactivo (125 I-EGF; 50 ng/ml). Más tarde se lavaron las células, se lisaron en NaOH a 1 N y se les determinó la radiactividad. Se presenta el promedio de los triplicados y el valor de su desviación estándar (barras).

En las figuras 3A-F se ilustra que la anfirregulina actúa como un inductor débil de los bucles reguladores por retroalimentación, y mediados por la transcripción, de la señalización del EGFR. Las células MCF10A que estuvieron con ayuno de factores séricos durante una noche se trataron con EGF (10 ng/ml) o AREG (10 o 100 ng/ml) durante los intervalos de tiempo indicados. El análisis por qPCR se realizó con los cebadores que corresponden a los ARNm que codifican los componentes reguladores por retroalimentación negativa (*MIG6/RALT*, *DUSP1* y *DUSP6*) o bien positiva (*EREG*, *TGF- α* y *HB-EGF*) de las vías de señalización del EGFR. Los perfiles de ARNm que se muestran representan dos réplicas biológicas independientes.

En las figuras 4A-D se ilustra que el agotamiento de la expresión de AREG inhibe el crecimiento oncogénico de las células de cáncer de ovario humano. La figura 4A es un gráfico en el que se ilustran los resultados de las células de cáncer de ovario OVCAR5 tratadas con construcciones lentivíricas de expresión, tanto con un shRNA desordenado como con un shRNA específico de *AREG*. Los medios acondicionados se recogieron tres días después y la cantidad de AREG secretada se valoró por ELISA; la figura 4B es un gráfico en el que se ilustra la tasa de crecimiento de las células OVCAR5 con shAREG o con shControl medido con el ensayo con MTT. Se muestran los valores como media $\pm$ desviación estándar de los hexaplicados (* $P < 0,005$, prueba de la *t*); la figura 4C es una fotografía que ilustra la escisión de la caspasa 3 tal y como se valora con la inmunotransferencia y las sublíneas de OVCAR5 que expresan de manera estable tres shAREG o shControl diferentes. El ensayo se realizó bien en el medio completo o en ayuno de suero. El tratamiento durante una noche con cisplatino (5 μ g/ml) se utilizó como control positivo. Obsérvese que la proteína caspasa 3 de 35 kDa se escindió únicamente en las células incubadas durante 12 h en presencia de cisplatino, pero ningún shAREG imitó este efecto; y la figura 4D es un gráfico que ilustra el tamaño del tumor. A las ratonas atímicas (6 semanas de edad; 10 por grupo) se les inocularon por vía subcutánea células de ovario OVCAR5 (3×10^6 por animal) pretratadas con un shRNA desordenado o bien con el shRNA específico de *AREG*. El volumen tumoral se les midió como se indica. Los puntos de los datos se presentan como valores de volumen medio $\pm$ desviación estándar (* $P < 0,005$, prueba de la *t*).

En las figuras 4E-H se ilustra que los ARN ahorquillados específicos de AREG inhiben el crecimiento de las células de cáncer de ovario *in vitro* y en los animales. La figura 4E es un gráfico en el que se ilustran las células de cáncer de ovario OVCAR5 tratadas con construcciones lentivíricas de la expresión, bien un shRNA desordenado (shControl) o como shRNA específicos de *AREG*. El análisis de la eficacia de la genosupresión se realizó por PCR en tiempo real. Asimismo, el correspondiente efecto sobre la cantidad de proteína se valoró por la aplicación de un ELISA al medio acondicionado recogido durante un intervalo de tres días. Cada resultado representa una determinación por triplicado; la figura 4F es un gráfico en el que se ilustra la tasa de crecimiento de tres diferentes sublíneas de OVCAR5 con la expresión estable de shAREG o shControl, medidas gracias al ensayo con MTT. Se muestra los valores como media $\pm$ desviación estándar de hexaplicados; la figura 4G es un gráfico en el que se ilustran los resultados de ratonas atímicas (6 semanas de edad; 5 animales por grupo) a las que se inocularon por vía subcutánea células de cáncer de ovario OVCAR5 (3×10^6 por animal), tratadas previamente con shRNA desordenado (shControl) o bien uno de tres shRNA específicos de *AREG*. Se midió el volumen de los tumores en los intervalos de tiempo indicados. Los puntos de datos se presentan como valores de volumen medio $\pm$ desviación estándar; y la figura 4H es un gráfico en el que se ilustran los resultados de células de cáncer de ovario OVCAR5 tratadas con construcciones lentivíricas de expresión con un shRNA desordenado (shControl) o bien con los shRNA específicos de *AREG*. A continuación, cada línea celular se inoculó en el costado del ratón inmunodeprimido. Se retiraron los tumores que se formaron, se fijaron en parafina y se les extrajo el ARN. El análisis de la eficacia de la genosupresión se llevó a cabo por PCR en tiempo real y tumores palpables. Obsérvese que en los xenoinjertos se mantuvieron las diferencias de expresión de la AREG.

En las figuras 5A-B se ilustra la activación transcripcional del promotor de *AREG* mediante cisplatino. La figura 5A es un gráfico en el que se ilustran los resultados de las células MLS transfectadas con un indicador de tipo luciferasa que contiene la región promotora de *AREG*. Se determinó la actividad luciferasa procedente de la luciferasa de *Renilla* y se normalizó por la procedente del indicador de tipo luciferasa de luciérnaga. Transcurridas 24 h desde la transfección, se añadieron concentraciones crecientes de cisplatino y 48 h después se sometieron las células al ensayo de la luciferasa; y en la figura 5B se ilustran los resultados de las células de cáncer de pulmón A549 tratadas como en la figura 5A. Se presentan las medias de los triplicados y los valores de la desviación estándar (barras) (* $P < 0,03$, ** $P < 0,01$, prueba de la *t*).

En las figuras 5C-F se ilustra que AREG, a diferencia de HB-EGF y TGF- α , se induce en respuesta a un antineoplásico. La figura 5C es un gráfico en el que se ilustran los resultados de las células MLS transfectadas con

un indicador de tipo luciferasa que contiene la región del promotor del TGF- α . La actividad de la luciferasa procedente de la luciferasa de *Renilla* se normalizó por la procedente de la luciferasa de luciérnaga (control de cotransfección). Al cabo de 24 h de la transfección, se añadieron concentraciones crecientes de cisplatino y, 24 h después, las células se sometieron a los ensayos de la luciferasa; la figura 5D es un gráfico en el que se ilustra la valoración de la actividad del promotor de *GAPDH* tal y como se describe en la figura 5C; la figura 5E es un gráfico en el que se ilustran los resultados de las células de cáncer de ovario MLS expuestas a concentraciones crecientes de cisplatino. A las células se les valoró la secreción de los ligandos indicados mediante ELISA; y la figura 5F es un gráfico que ilustra la valoración de la línea celular de cáncer de pulmón A549 analizada como en la figura 5E.

En las figuras 6A-F se ilustra AR30, un anticuerpo monoclonal anti-AREG, que inhibe la autofosforilación del EGFR. La figura 6A es una fotografía de una tinción con azul de Coomassie de un gel de acrilamida en el que se muestra una fracción purificada de AREG aislada de bacterias y purificada en una columna NiNTA. El carril del marcador de masa molecular (MM) indica que la banda es de 15 kDa; en la figura 6B, las células se inoculaban en una placa de 24 pocillos, se lavaron y se incubaron con concentraciones crecientes de la proteína de fusión TRX-AREG purificada (8,5, 85, 850, 8500 ng/ml). Se utilizó el EGF (10 ng/ml) como control positivo. Después de la incubación que duró 10 min, se lisaron las células y los extractos hechos transparentes se inmunotransfirieron (IT) con un anticuerpo antifosfotirosina (PY-99); en la figura 6C, las placas de 96 pocillos se revistieron con los ligandos indicados (0,1 μ g/ml) y luego se incubaron durante 3 h con tres Acm diferentes específicos contra la AREG. Después, los pocillos se incubaron durante 2 h con un anticuerpo antirrátón conjugado a HRP, seguido de una incubación de 30 min con ATBS. Las señales se determinaron con un lector de ELISA (ajustado a 420 nm); en la figura 6D, EGF, HB-EGF y AREG, de humanos, así como la AREG murina, se inmunotransfirieron (IT) con el Acm AR30, bien directamente (panel superior) o después de la inmunoprecipitación (IP) con el mismo anticuerpo (panel inferior). El suero de los ratones sin inmunizar se utilizó como control negativo; en la figura 6E, las células HeLa se incubaron previamente con (o sin) el Acm AR30 (20 μ g/ml) y concentraciones crecientes de AREG. Después, los lisados de células completas se inmunotransfirieron (IT) con un anticuerpo específico contra la forma fosforilada del EGFR (tirosina 1068) o un anticuerpo contra el EGFR; y en la figura 6F, las células HeLa se incubaron con (o sin) AREG (100 ng/ml) en presencia de concentraciones crecientes del Acm AR30 (5, 10, 20 y 50 μ g/ml). A continuación, se lisaron las células y los extractos hechos transparentes se inmunotransfirieron (IT) con los anticuerpos indicados.

En las figuras 7A-C se ilustra que el AR30, un anticuerpo monoclonal anti-AREG, inhibe el crecimiento oncogénico de las células de cáncer de ovario de humano en los ratones. En la figura 7A, las ratonas atímicas (6 semanas de edad) se inoculaban por vía subcutánea con células de cáncer de ovario MLS (2×10^6 por animal). Una vez que los tumores eran palpables, las ratonas se distribuyeron al azar en dos grupos. A once ratonas se les inyectó por vía intraperitoneal un Acm anti-AREG (AR30; 200 μ g/ratón; dos veces a la semana, los días: 8, 11, 14, 17 y 21). El grupo de control también incluía 11 ratonas. Se muestra el valor de la media $\pm$ desviación estándar; en la figura 7B, a las ratonas atímicas (6 semanas de edad) se les inoculaban por vía subcutánea células de cáncer de ovario MLS (2×10^6 por animal). Una vez que se podían palpar los tumores, las ratonas se distribuyeron al azar en cuatro grupos. A un grupo (8 ratonas) se le inyectó por vía intraperitoneal el Acm AR30 (100 μ g/ratón, dos veces a la semana, los días: 8, 14, 17, 21, 24 y 28). Otro grupo (8 ratonas) se trató con cisplatino (5 mg/kg; en los días 8 y 21). El cuarto grupo se trató con una politerapia de Acm AR30 y cisplatino. El grupo de control estaba formado por 12 ratonas; y en la figura 7C, se escindieron los tumores MLS indicados y se les determinó la masa media. Se fotografiaron los tumores representativos.

En la figura 8 se ilustran las pruebas de especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-AREG. Se revistieron placas de 96 pocillos con la AREG humana a las concentraciones indicadas y, a continuación, se incubaron durante 2 h con 4 Acm diferentes específicos contra la AREG (tal y como está indicado). Después, los pocillos se incubaron durante 2 h con un anticuerpo antirrátón conjugado a la HRP, seguido de una incubación de 30 min con ATBS. Las señales se determinaron con un lector de ELISA (ajustado a 415 nm).

En las figuras 9A-C se ilustra la especificidad de los Acm anti-AREG.

En las figuras 9A, las placas de 96 pocillos se revistieron con los ligandos indicados (400 ng/ml), que incluyen un HB-EGF murino fusionado a la tiorredoxina. Las placas se incubaron durante 2 h con 3 Acm diferentes específicos contra la AREG (tal y como está indicado). Después, los pocillos se incubaron durante 2 h con un anticuerpo antirrátón conjugado a HRP, seguido de una incubación de 30 min con ATBS. Las señales se determinaron con un lector de ELISA (ajustado a 415 nm). En la figura 9B se muestran las pruebas de especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-AREG: las placas de 96 pocillos se revistieron con la AREG de humano a las concentraciones indicadas y luego se incubaron durante 2 h con 4 Acm diferentes específicos contra la AREG. A continuación, los pocillos se incubaron durante 2 h con un anticuerpo antirrátón conjugado a HRP, seguido de una incubación de 30 min con ATBS. Las señales se determinaron con un lector de ELISA (ajustado a 415 nm). En la figura 9C se muestra la especificidad de especie de los Acm anti-AREG. Las placas de 96 pocillos se revistieron con concentraciones decrecientes (400, 200, 100, 50, 25 y 10 ng/ml) de los 3 ligandos indicados y entonces se incubaron durante 2 h con tres Acm diferentes que son específicos contra la AREG (AR30, AR37 y AR558) a 1 μ g/ml. Luego, los pocillos se incubaron durante 2 h con un anticuerpo antirrátón conjugado a HRP, seguido de una incubación de 20 min con ATBS. Las señales se determinaron con un lector de ELISA (ajustado a 420 nm).

En la figura 10A se ilustra que los Acm anti-AREG inhiben la activación del EGFR inducida por el ligando. Las células HeLa se incubaron con (o sin) la AREG (100 ng/ml) en presencia de concentraciones crecientes de Acm AR30, Acm AR37 o el Acm AR558 (0,1, 0,2, 0,5, 0,75, 1,5, 3,5, 6,25, 12,5, 25 y 50 µg/ml). Después, se lisaron las células y los extractos hechos transparentes se inmunotransfirieron (IT) con los anticuerpos indicados, entre ellos un anticuerpo específico contra la forma fosforilada (activa) del EGFR (pEGFR).

En la figura 10B los anticuerpos monoclonales anti-AREG inhiben moderadamente la proliferación de las células MCF10A. Se realizaron ensayos de la proliferación con MTS en las células MCF10A (1 000 de células por pocillo). Las células se sembraron el día anterior y se trataron durante 72 h con los Acm indicados (1, 5, 10, 20 o 50 µg/ml). Se utilizaron concentraciones crecientes de los Acm indicados (solos o en combinación con la AREG) en el medio complementado con suero al 1 % y AREG (a 10 o bien a 100 ng/ml).

En la figura 11 se ilustra que los anticuerpos anti-AREG inhiben con eficacia el crecimiento tumoral en los ratones. Las ratonas atímicas se inocularon por vía subcutánea con células de cáncer de cabeza y cuello de humano Cal-27 (2×10^6). Una vez que los tumores eran palpables (de 5 a 7 días), las ratonas se distribuyeron al azar y se les inyectó por vía intraperitoneal una solución salina (control) o Acm anti-AR: AR30, AR37 o AR558 (cada uno a 300 µg por inyección). Las ratonas se trataron con los Acm dos veces a la semana y se determinó el volumen tumoral. Se muestran las medias y los valores de la desviación estándar de al menos 5 ratonas por grupo.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a anticuerpos contra la anfirregulina, composiciones que los comprenden y sus usos (siempre y cuando estas realizaciones caigan dentro del alcance de la reivindicación 6).

Los principios y la operación de la presente invención se pueden comprender mejor con referencia a los dibujos y a las descripciones que la acompañan.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, se ha de saber que la invención no está limitada necesariamente en su aplicación a los detalles presentados en la siguiente descripción ni a las ejemplificaciones de los ejemplos. La invención tiene capacidad para otras realizaciones o para ponerse en práctica o llevarse a cabo de diferentes maneras. De igual forma, se ha de saber que la fraseología y la terminología empleada en la presente memoria es para el propósito de la descripción y no se debe considerar como limitante.

La anfirregulina (AREG), un ligando de la familia del EGF, desempeña funciones importantes en muchos procesos celulares, entre ellos en el desarrollo de las glándulas mamarias, en la maduración de los ovocitos, en la ramificación y la morfogénesis que se produce dentro de los tejidos epiteliales, tales como pulmón, próstata y riñón. A la inversa, la AREG también se ha relacionado con el proceso oncogénico en diferentes cánceres, entre ellos los tumores de próstata, hepatocelular, de páncreas, de mama, de pulmón, de colon y de cabeza y cuello, en los que la expresión de la AREG se ha asociado a un peor pronóstico.

Al reducir la presente invención a la práctica, los presentes inventores han descubierto que la expresión de AREG es alta en el líquido ascítico y el derrame pleural de los pacientes con cáncer de ovario y de pulmón avanzados, respectivamente, con respecto a otros ligandos de la familia del EGF (ejemplo 1 del apartado de ejemplos que viene a continuación). Los resultados ilustran que la gran cantidad de AREG se debe a dos procesos: primero, inducción de la transcripción de la AREG después del tratamiento del paciente con fármacos genotóxicos (ejemplo 6 del apartado de ejemplos que viene a continuación) y, segundo, la eliminación ineficaz de la AREG por medio de la endocitosis del receptor (ejemplo 2 del apartado de ejemplos que viene a continuación). Los presentes inventores han demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que el silenciamiento de la AREG forma tumores significativamente más pequeños que las células de control (ejemplo 5 del apartado de ejemplos que viene a continuación). Los presentes inventores han generado ahora nuevos anticuerpos monoclonales anti-AREG (denominados AR30, AR37 y AR558). Los presentes inventores han ilustrado el efecto antitumoral de AR30, AR37 y AR558 (ejemplos 7 y 10 del apartado de ejemplos que viene a continuación). Además, el uso de un anticuerpo anti-AREG sensibiliza enormemente las células de cáncer de ovario a un antineoplásico. En concreto, la combinación de cisplatino, un fármaco genotóxico utilizado corrientemente en el tratamiento de las pacientes con cáncer de ovario, y de AR30 inhibió casi por completo el crecimiento del tumor de ovario (ejemplo 7 del apartado de ejemplos que viene a continuación). Los nuevos anticuerpos AR37 y AR558 se generaron en un único modelo de animal con genosupresión de la anfirregulina. Al utilizar este modelo de animal, los presentes inventores fueron capaces de generar anticuerpos que actúan selectivamente sobre la AREG (AR558) y pananticuerpos (AR37) que reconocen la AREG tanto de humano como de ratón. Estos últimos anticuerpos son específicamente útiles para comprobar la eficacia y la toxicidad en los modelos animales de ratón. En conjunto, estas enseñanzas ilustran la generación y el potencial terapéutico antitumoral de los anticuerpos anti-AREG, tales como AR30, AR37 y AR558.

Así pues, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se da a conocer un método para determinar la idoneidad de un sujeto para recibir un tratamiento con un anticuerpo contra la anfirregulina, en donde el sujeto tiene un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de páncreas que muestra resistencia a la quimioterapia, en donde el método comprende: analizar en una muestra

- biológica del sujeto el nivel de expresión de la anfirregulina, del factor α de crecimiento transformante (TGF- α) y del factor de crecimiento epidérmico con afinidad por la heparina (HB-EGF), en donde un nivel de expresión de la anfirregulina por encima de un umbral predeterminado y la ausencia de expresión del TGF- α y/o del HB-EGF, o una expresión por debajo de un nivel predeterminado del TGF- α y/o del HB-EGF, es indicativo de la idoneidad del sujeto para el tratamiento con el anticuerpo contra la anfirregulina.
- Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «sujeto» se refiere a un mamífero, p. ej., sujeto humano, de cualquier edad o sexo al que se le ha diagnosticado un cáncer. El sujeto es típicamente uno al que se le ha diagnosticado un cáncer, con o sin metástasis, en cualquier estadio de la enfermedad.
- De acuerdo con la invención reivindicada, al sujeto se le diagnostica cáncer de ovario, de páncreas o de cabeza y cuello, y muestra resistencia a la quimioterapia.
- Tal y como se utiliza en la presente memoria, los términos «resistente» o «resistencia» con respecto a un antineoplásico hace referencia a un sujeto que sufre un cáncer que no responde al tratamiento con un uno o varios antineoplásicos durante un tiempo de más de 6 meses o más, o cuyo tumor o tumores progresan en menos de 6 meses desde la terminación del tratamiento con uno o varios antineoplásicos.
- De acuerdo con las realizaciones específicas, la resistencia es una resistencia adquirida.
- Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «resistencia adquirida» se refiere a la progresión de la resistencia después de la respuesta positiva inicial al tratamiento (p. ej., quimioterapia).
- Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «cáncer» se refiere a cualquier enfermedad cancerosa. De acuerdo con una realización específica, el cáncer depende de la anfirregulina (actividad y/o expresión) para el comienzo y/o la progresión. Las células cancerosas pueden estar asociadas a fenotipos tales como la proliferación incontrolada, la pérdida de funciones especializadas, inmortalidad, potencial metastásico significativo, incremento significativo de la actividad antiapoptótica, tasas de crecimiento y proliferación rápidas, y determinados marcadores morfológicos y celulares característicos. En algunas circunstancias, las células cancerosas serán en forma de un tumor, de tal modo que las células puedan existir localmente dentro de un animal (p. ej., tumor sólido), o como alternativa, las células cancerosas pueden circular por el torrente sanguíneo como células independientes, por ejemplo las células leucémicas (tumor que no es sólido), o se pueden dispersar por el cuerpo (p. ej., metástasis). Se apreciará que el término cáncer, tal y como se utiliza en la presente memoria, abarca todos los tipos de cáncer, en cualquier estadio y en cualquier forma.
- Los tipos de enfermedades cancerosas que se prestan al tratamiento por los métodos descritos incluyen tumores benignos, verrugas, pólipos, precánceres y tumores/cánceres malignos.
- Los ejemplos específicos de enfermedades cancerosas que se pueden tratar con los métodos descritos incluyen pero sin limitarse a ellos, tumores del tubo digestivo (carcinoma de colon, carcinoma rectal, carcinoma colorrectal, cáncer colorrectal, adenoma colorrectal, no polipósico hereditario de tipo 1, no polipósico hereditario de tipo 2, no polipósico hereditario de tipo 3, no polipósico hereditario de tipo 6; cáncer colorrectal, no polipósico hereditario de tipo 7, carcinoma de intestino delgado y/o grueso, carcinoma de esófago, tilosis con cáncer de esófago, carcinoma de estómago, carcinoma de páncreas, tumores endocrinos de páncreas), carcinoma de endometrio, dermatofibrosarcoma protuberante, carcinoma de la vejiga urinaria, tumores de las vías biliares, cáncer de próstata, adenocarcinoma de próstata, cáncer de riñón (p. ej., tumor de Wilms de tipo 1 o de tipo 2), cáncer de hígado (p. ej., hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular, cáncer hepatocelular), cáncer de vejiga, rhabdomyosarcoma embrionario, tumor de las células germinales, tumor trofoblástico, tumor de las células germinales testiculares, teratoma inmaduro de ovario, tumor de útero, de epitelio de ovario, sacrocoxígeo, coriocarcinoma, tumor trofoblástico del sitio placentario, tumor epitelial del adulto, carcinoma de ovario, cáncer de ovario seroso, tumores de los cordones sexuales del ovario, carcinoma cervical, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de pulmón microcítico y no microcítico, nasofaríngeo, carcinoma de mama (p. ej., cáncer de mama canalicular, cáncer de mama intracanalicular invasivo, esporádico; cáncer de mama, susceptibilidad al cáncer de mama, cáncer de mama de tipo 4, cáncer de mama de tipo 1, cáncer de mama de tipo 3, cáncer de mama y ovario), carcinoma de células escamosas (p. ej., en la cabeza y el cuello), tumor neurógeno, astrocitoma, ganglioblastoma, neuroblastoma, linfomas (p. ej., enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, de linfocitos B, de Burkitt, de linfocitos T cutáneos, histiocítico, linfoblástico, de linfocitos T, tímico), gliomas, adenocarcinoma, tumor suprarrenal, carcinoma suprarrenocortical hereditario, neoplasia cerebral (tumor), otros carcinomas diferentes (p. ej., de células grandes broncogénicas, canalicular, ascitis de Ehrlich-Lette, epidermoide, de células grandes, pulmón de Lewis, medular, mucoepidermoide, microcítico, de células pequeñas, de células fusiformes, espinocelular, de células transitorias, indiferenciado, carcinosarcoma, coriocarcinoma, quistadenocarcinoma), ependimoblastoma, epitelioma, eritroleucemia (p. ej., de Friend, de linfoblastos), fibrosarcoma, tumor de células gigantes, tumor glial, glioblastoma (p. ej., multiforme, astrocitoma), hepatoma, glioma, heterohibridoma, heteromieloma, histiocitoma, hibridoma (p. ej., de linfocitos B), hipernefoma, insulinooma, tumores de islotes, queratoma, leiomioblastoma, leiomyosarcoma, leucemia (p. ej., linfática aguda, linfoblástica aguda, de pre-linfocitos B linfoblásticos aguda, leucemia de linfocitos T linfoblástica aguda, aguda, megacarioblástica, monocítica, mielógena aguda, mielóide aguda, mielóide aguda con

eosinofilia, de linfocitos B, basófila, mieloide crónica, crónica, de linfocitos B, eosinófila, de Friend, granulocítica o mielocítica, tricoleucocítica, linfocítica, megacarioblástica, monocítica, macrófago-monocítica, mieloblástica, mieloide, mielomonocítica, de células plasmáticas, de pre-linfocitos B, promeiloicítica, subaguda, de linfocitos T, neoplasia linfoide, predisposición a neoplasia mieloide, leucemia no linfocítica aguda), linfossarcoma, melanoma, tumor de mama, mastocitoma, meduloblastoma, mesotelioma, tumor metastásico, tumor de monocitos, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, mieloma, nefroblastoma, tumor glial del tejido nervioso, tumor neuronal del tejido nervioso, neurinoma, neuroblastoma, oligodendroglioma, osteocondroma, osteomioma, osteosarcoma (p. ej., de Ewing), papiloma, célula transitoria, feocromocitoma, tumor hipofisario (invasivo), plasmacitoma, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma (p. ej., de Ewing, de histiocito, de Jensen, osteogénico, de célula del retículo), schwannoma, tumor subcutáneo, teratocarcinoma (p. ej., pluripotente), teratoma, tumor testicular, timoma y tricoepitelioma, cáncer gástrico, fibrosarcoma, glioblastoma multiforme; tumores glómicos múltiples, síndrome de Li-Fraumeni, liposarcoma, síndrome II de la familia del cáncer de Lynch, tumor de las células germinales del varón, leucemia de mastocitos, tiroide medular, meningioma múltiple, mixosarcoma de neoplasia endocrina, paraganglioma, no cromafín familiar, pilomatricoma, papilar, familiar y esporádico, síndrome de predisposición rabdoide, familiar, tumores rabdoides, sarcoma de partes blandas y síndrome de Turcot con glioblastoma.

Los precánceres están bien caracterizados y se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Berman J. J. y Henson D. E., 2003. «Classifying the precancers: a metadata approach». *BMC Med Inform Decis Mak.* 3:8). Las clases de precánceres que se prestan al tratamiento a través del método de la invención incluyen precánceres pequeños o microscópicos adquiridos, lesiones grandes adquiridas con atipia nuclear, lesiones precursoras que se producen con síndromes hiperplásicos heredados que progresan a cáncer, e hiperplasias difusas adquiridas y metaplasias difusas. Los ejemplos de precánceres pequeños o microscópicos incluyen HGSIL (lesión intraepitelial escamosa de grado alto del cuello uterino), AIN (neoplasia intraepitelial anal), displasia de las cuerdas vocales, criptas aberrantes (de colon), PIN (neoplasia intraepitelial prostática). Los ejemplos de lesiones grandes adquiridas con atipia nuclear incluyen adenoma tubular, AILD (linfadenopatía angioinmunoblástica con disproteinemia), meningioma atípico, pólipo gástrico, parapsoriasis de placas grandes, mielodisplasia, carcinoma papilar de células transitorias *in-situ*, anemia insensible con exceso de blastos, y papiloma de Schneiderian. Los ejemplos de lesiones precursoras que se producen con los síndromes hiperplásicos heredados que progresan a cáncer incluyen el síndrome de mola atípico, adenomatosis de células C y MEA. Los ejemplos de hiperplasias difusas adquiridas y metaplasias difusas incluyen sida, hiperplasia linfoide atípica, enfermedad de Paget de los huesos, enfermedad linfoproliferativa posterior al trasplante y colitis ulcerosa.

De acuerdo con la presente invención, el cáncer comprende un cáncer de ovario, un cáncer de cabeza y cuello, o un cáncer de páncreas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la frase «cáncer de ovario» se refiere a cualquier crecimiento canceroso que surge en un ovario, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, tumores epiteliales, tumores de las células germinales y tumores de cordones sexuales estromáticos. El cáncer de ovario incluye tumores confinados en los ovarios (clasificados como estadio I); tumores que afectan a uno o ambos ovarios con extensión pélvica (clasificado como estadio II); tumores que afectan a uno o ambos ovarios con metástasis peritoneales confirmadas al microscopio fuera de la pelvis y/o metástasis en los ganglios linfáticos regionales (clasificados como estadio III); metástasis distante más allá de la cavidad peritoneal (clasificado como estadio IV); metástasis de la cápsula del hígado (considerado como estadio III) y metástasis del parénquima del hígado (considerado como estadio IV).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la frase «cáncer de cabeza y cuello» se refiere a cualquier crecimiento incontrolado de células en las células de la cabeza y del cuello, p. ej., en el labio, en la cavidad bucal, en la cavidad nasal, en los senos paranasales, en la faringe y en la laringe. Los cánceres de cabeza y de cuello de ejemplo incluyen, pero sin limitarse a ellos, carcinomas de las células escamosas de la cabeza y del cuello, cáncer hipofaríngeo, cáncer laríngeo, cáncer de labio y de la cavidad bucal, cáncer de cuello escamoso metastásico con primario oculto, cáncer nasofaríngeo, cáncer bucofaríngeo, cáncer de la cavidad nasal y de los senos paranasales, cáncer de las glándulas salivales.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la frase «cáncer de páncreas» se refiere a una neoplasia maligna del páncreas, que incluye, pero sin limitarse a ellos, adenocarcinomas, carcinomas adenoescamosos, carcinomas de las células del anillo de Signet, carcinomas hepatoides, carcinomas coloides, carcinomas indiferenciados, carcinomas indiferenciados con células gigantes de tipo osteoclastos y carcinomas de las células de los islotes.

Tal y como se mencionó, el cáncer de algunas realizaciones de la invención muestra resistencia a la quimioterapia.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, los términos «quimioterapia» o «quimioterápico» o «antineoplásico» se refieren a un agente que reduce, previene, mitiga, limita y/o retrasa el crecimiento de neoplasias malignas o metástasis, o mata las células neoplásicas directamente por necrosis o apoptosis de neoplasias malignas, o cualquier otro mecanismo, o que si no se pueden utilizar, en una cantidad farmacéuticamente eficaz, para reducir, prevenir, mitigar, limitar y/o retrasar el crecimiento de las neoplasias malignas o de las metástasis en un sujeto con una enfermedad neoplásica (p. ej., cáncer).

Los antineoplásicos incluyen, pero sin limitarse a ellos, fluoropirimidinas; nucleósidos de pirimidina; nucleósidos de purina; antifolatos, derivados de platino; antraciclinas/antracenodionas; epipodofilotoxinas; camptotecinas (p. ej., karenitecina); hormonas; complejos hormonales; antihormonas; enzimas, proteínas, péptidos y anticuerpos monoclonales y/o policlonales; agentes inmunitarios; alcaloides de vinca; taxanos; epotilonas; antimicrotúbulos; alquilantes; antimetabolitos; inhibidores de las topoisomerasas; antivíricos; y otros muchos agentes citotóxicos y citostáticos.

De acuerdo con una realización específica, el antineoplásico incluye, pero sin limitarse a ellos, abarelix, aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, trióxido de arsénico, asparaginasa, azacitidina, bevacuzimab, bexaroteno, bleomicina, bortezomib, busulfano, calusterona, capecitabina, carboplatino, carmustina, celecoxib, cetuximab, cisplatino, cladribina, clofarabina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, actinomicina D, darbepoetina α , daunorubicina liposómica, daunorubicina, decitabina, denileucina diftitox, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina, propionato de dromostanolona, solución B de Elliott, epirubicina, epoetina α , erlotinib, estramustina, etopósido, exemestano, filgrastim, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo 5-FU, fulvestrant, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, acetato de goserelina, acetato de histrelin, hidroxiurea, ibritumomab tiuxetano, idarubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, interferón α 2a, interferón α 2b, irinotecán, lenalidomida, letrozol, leucovorina, leuprorelina, levamisol, lomustina, CCNU, mecloretamina, mecloretamina, acetato de megestrol, melfalán, L-PAM, mercaptopurina 6-MP, mesna, metotrexato, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, fenpropionato de nandrolona, nelarabina, nofetumomab, oprelvekin, oxaliplatino, paclitaxel, palifermina, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pemetrexed disódico, pentostatina, pipobromano, plicamicina mitramicina, porfímero de sodio, procarbazona, quinacrina, rasburicase, rituximab, sargramostim, sorafenib, estreptozocina, maleato de sunitinib, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido VM-26, testolactona, tioguanina 6-TG, tiotepa, topotecán, toremifeno, tositumomab, trastuzumab, tretinoína ATRA, uramustina, valrubicina, vinblastina, vinorelbina, zoledronato y ácido zoledrónico.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, los términos «derivado de platino», «medicamento de platino» o «compuesto de platino» incluyen todos los compuestos, composiciones y formulaciones que contienen un ligando de platino en la estructura de la molécula. De acuerdo con una realización, la valencia del ligando de platino contenida en este puede ser platino II o platino IV. Los derivados, medicamentos o compuestos de platino descritos en la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, satraplatino y análogos y derivados de los mismos.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «medicamento de taxano» incluye, pero sin limitarse a ellos, docetaxel o paclitaxel (que incluye los derivados de paclitaxel disponibles en el mercado Taxol^{RTM} y Abraxane^{RTM}), formas poliglutamiladas del paclitaxel (p. ej., Xiotax^{RTM}), paclitaxel liposómico (p. ej., TocoSol^{RTM}) y análogos y derivados de los mismos.

Los antineoplásicos de la invención pueden comprender antineoplásicos estándares y también experimentales. Los antineoplásicos pueden también comprender una combinación de más de un antineoplásico.

El término quimioterapia también puede hacer referencia a otros tratamientos contra el cáncer, tales como radioterapia, fototerapia e inmunoterapia.

De acuerdo con una realización específica, el cáncer es cáncer de ovario. De acuerdo con otra realización específica, el cáncer de ovario es resistente a la quimioterapia, p. ej., a una quimioterapia con platino y/o a una quimioterapia con taxanos. Tales pacientes tienen típicamente un mal pronóstico.

De acuerdo con una realización específica, al sujeto se le ha diagnosticado un cáncer de ovario, de páncreas o de cabeza y cuello, y muestra una resistencia adquirida a la quimioterapia.

Tal y como se mencionó, la determinación de la idoneidad de un sujeto para un tratamiento con un anticuerpo contra la anfirregulina se lleva a cabo mediante el análisis, en una muestra biológica del sujeto, del nivel de expresión de la anfirregulina y, de manera optativa, del factor α de crecimiento transformante (TGF- α) y/o del factor de crecimiento epidérmico con afinidad por la heparina (HB-EGF) (p. ej., con el análisis de la cantidad de AREG, AREG y TGF- α , AREG y HB-EGF, o AREG y TGF- α y HB-EGF), en donde un nivel de expresión de la anfirregulina por encima de un umbral predeterminado y la ausencia de expresión del TGF- α y/o del HB-EGF o una expresión por debajo de un nivel predeterminado del TGF- α y/o del HB-EGF es indicativo de la idoneidad del sujeto para el tratamiento con el anticuerpo contra la anfirregulina.

El término «anfirregulina», tal y como se utiliza en la presente memoria (también conocido como AREG o AR), hace referencia al producto génico (es decir, el ARNm o la proteína), p. ej., AREG de humano, tal y como se presenta en los números de acceso de GenBank NM_001657 o NP_001648.

El término «TGF- α », tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia al producto génico (es decir, ARNm o proteína) del factor α del crecimiento transformante (TGF- α), p. ej., TGF- α de humano, tal y como se presenta en los números de acceso de GenBank NM_003236, NM_001099691, NP_003227 o NP_001093161.

El término «HB-EGF» hace referencia al producto génico (es decir, ARNm o proteína) del factor de crecimiento de tipo EGF con afinidad por la heparina (HB-EGF), p. ej., HB-EGF de humano, tal y como se presenta en los números de acceso de GenBank NM_001945 o NP_001936.

5 Tal y como se describe en el apartado de ejemplos que viene a continuación, los presentes inventores han descubierto que el nivel de expresión de AREG es alto en las muestras biológicas de pacientes con cáncer de ovario y de pulmón avanzados respecto a otras proteínas de la familia del EGF (ejemplo 1 del apartado de ejemplos que vienen a continuación) y que las células de cáncer de ovario secretan una gran cantidad de AREG después del tratamiento con antineoplásicos (ejemplo 6 del apartado de ejemplos que vienen a continuación).

10 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el «nivel de expresión», cuando se refiere a anfirregulina, TGF- α y HB-EGF, hace referencia a una cantidad de los mismos (p. ej., ARNm o polipéptido) intracelular, en la membrana celular, en la superficie celular y/o en la cercanía celular.

De acuerdo con una realización, el término nivel de expresión se refiere al nivel o cantidad secretado (p. ej., desde una célula) de anfirregulina, TGF- α y/o HB-EGF.

15 Para seleccionar un sujeto idóneo para el tratamiento, primero se analiza la anfirregulina de una muestra biológica y, de manera optativa, el nivel de expresión del TGF- α y/o del HB-EGF. En los casos en los que el análisis se realiza *in vitro*, la muestra biológica se obtiene del sujeto antes del análisis del mismo.

20 Tal muestra biológica incluye, pero sin limitarse a ellos, líquidos corporales, tales como sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, líquidos linfáticos, líquido ascítico o derrame pleural; y diferentes secreciones externas de las vías respiratorias, del tubo digestivo, de las vías genitourinarias, lágrimas, saliva, leche, así como glóbulos blancos, tejidos malignos, líquido amniótico y vello coriónico.

De acuerdo con una realización, la muestra comprende una muestra de biopsia. Una muestra de biopsia puede comprender una muestra de líquido (p. ej., líquido linfático, líquido ascítico o derrame pleural) o una muestra celular (p. ej., muestra de tejido).

25 Así pues, de acuerdo con una realización, la muestra puede comprender células que incluyen, pero sin limitarse a ellas, células de la sangre, células de la médula ósea, células del páncreas, células de pulmón, hepatocitos, esplenocitos, células de riñón, células del corazón, células de ovario, células del tejido mamario, células de la piel (p. ej., células epiteliales, fibroblastos, queratinocitos), células de los ganglios linfáticos. De acuerdo con una realización específica, las células comprenden células cancerosas. De acuerdo con una realización, las células son células cancerosas que circulan por la sangre (p. ej., células tumorales en circulación (CTC)).

30 De acuerdo con una realización específica, la muestra biológica es líquido ascítico, derrame pleural o sangre. De acuerdo con una realización específica, la muestra biológica es líquido ascítico o derrame pleural.

Las muestras biológicas se pueden obtener con los métodos conocidos en la técnica, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, análisis de sangre, biopsia con aguja fina, biopsia por punción, biopsia con aguja gruesa y biopsia quirúrgica (p. ej., biopsia de cerebro, de páncreas o de hígado), frotis yugal y lavado.

35 Se apreciará que los métodos de algunas realizaciones de la invención se pueden aplicar *in vivo* o *in situ* con los métodos de detección idóneos para el cuerpo humano (p. ej., con anticuerpos, tales como los anticuerpos descritos en detalle más adelante, p. ej., conjugados a un marcador o a un resto detectable).

40 El nivel de expresión de la anfirregulina, del TGF- α y/o del HB-EGF se puede detectar en la muestra biológica al hacer uso de cualquier método estructural, biológico o bioquímico que se conoce en la técnica para detectar el nivel de expresión del ARN que codifica la anfirregulina, el TGF- α y/o el HB-EGF (por ejemplo, con el uso del análisis de transferencia Northern, análisis por RT-PCR, tinción de hibridación *in situ* de ARN, tinción por RT-PCR *in situ*) o la propia proteína de la anfirregulina, del TGF- α y/o del HB-EGF (por ejemplo, con el uso de inmunotransferencia, inmunoensayo enzimático (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), análisis inmunohistoquímico). Como alternativa, el nivel de expresión de la anfirregulina, del TGF- α y/o del HB-EGF se puede detectar *in vivo* con el uso de técnicas de imagen óptica no invasiva (p. ej., con técnicas de toma de imágenes por SPECT y/o TAC).

45 De acuerdo con una realización, se da a conocer una composición de sustancia que comprende una muestra biológica de un sujeto que tiene un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de páncreas, que presenta resistencia a la quimioterapia, y un anticuerpo monoclonal contra la anfirregulina y, de manera optativa, un anticuerpo contra el TGF- α y/o un anticuerpo contra el HB-EGF. Tal muestra biológica se puede utilizar para el diagnóstico (p. ej., ensayo ELISA directo).

50 El nivel de expresión de la anfirregulina, del TGF- α y/o del HB-EGF se compara a continuación con el nivel de expresión en una muestra de control.

La muestra de control se obtiene típicamente de un sujeto sano (que se sabe que no tiene cáncer, cuyos valores

pueden estar presentes también en la bibliografía) o del mismo sujeto antes del comienzo de la enfermedad (es decir, sano). Ya que las características biológicas dependen, entre otras cosas, de la especie y de la edad, es preferible que la muestra de control se obtenga de un sujeto de la misma especie, edad, sexo y de la misma subpoblación (p. ej., fumador/no fumador). Como alternativa, los datos de control se pueden tomar de bases de datos y de la bibliografía.

Cuando el nivel de expresión de la anfirregulina en la muestra problema está por encima de la muestra de control (p. ej., hasta aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % 100 % o más) y no hay ningún nivel de expresión detectable del TGF- α y/o del HB-EGF, o el nivel de expresión del TGF- α y/o del HB-EGF es comparable o está por debajo de la muestra de control (p. ej., hasta aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o menos), se reconoce que el sujeto es idóneo para el tratamiento.

Una vez que se ha determinado la idoneidad del sujeto, se puede tratar al sujeto con un agente que hace descender el nivel de expresión y/o la actividad de la anfirregulina.

La «actividad» de la anfirregulina, tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la fijación de la misma a su receptor apropiado (p. ej., fijación de la anfirregulina a un receptor de EGF) y a la activación del mismo (p. ej., activación de las vías de transducción de señales intracelulares). La invención, en su alcance más amplio, está definida por las reivindicaciones 1 a 6 independientes.

De acuerdo con un aspecto de la descripción, se da a conocer un método para tratar el cáncer, en donde el método comprende la administración a un sujeto seleccionado de acuerdo con el método de algunas de las realizaciones de la invención (es decir, que tiene cáncer y presenta resistencia a la quimioterapia y gran cantidad de AREG y, de manera optativa, poca cantidad de HG-EGF y/o TGF- α , tal y como está descrito más arriba) una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que hace descender una actividad o expresión de la anfirregulina, gracias a lo cual se trata el cáncer.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «tratar» hace referencia a aliviar, atenuar, paliar o eliminar los síntomas de un cáncer, lo que enlentece, revierte o detiene la progresión del cáncer, o cura el cáncer.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «cantidad terapéuticamente eficaz» en referencia al tratamiento del cáncer hace referencia a una cantidad capaz de invocar uno o varios de los efectos siguientes: (1) sensibilización de las células cancerosas del sujeto a un antineoplásico; (2) inhibición, en cierta medida, del crecimiento tumoral, que incluye enlentece y completar la parada del crecimiento; (3) reducción del número de células tumorales; (4) reducción del tamaño tumoral; (5) inhibición (es decir, reducción, enlentecimiento o parada completa) de la infiltración de las células tumorales en los órganos periféricos; (6) inhibición (es decir, reducción, enlentecimiento o total detención) de la metástasis; y/o (7) alivio, en cierta medida, de uno o varios síntomas asociados al cáncer. Una «cantidad terapéuticamente eficaz» de un agente que hace descender la anfirregulina (p. ej., anticuerpo anti-AREG) para los propósitos del tratamiento contra el cáncer, se pueden determinar de una manera sistemática mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica (p. ej., ultrasonidos, rayos X, TAC, RMN, etc.).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, los términos «descender» o «que hace descender», cuando hace referencia al nivel de expresión y/o de actividad de la anfirregulina, se refiere a prevenir, reducir, inhibir, disminuir y/o eliminar el nivel de expresión y/o la actividad de la anfirregulina. De acuerdo con una realización, el descenso se efectúa para que los niveles no estén sustancialmente elevados en comparación con la muestra de control. De acuerdo con otra realización, los niveles descienden al máximo para que se elimine por completo la actividad de la anfirregulina.

Se pueden utilizar una serie de agentes de acuerdo con este aspecto de la presente invención para hacer descender el nivel de expresión y/o la actividad de la anfirregulina en la célula cancerosa.

Así pues, por ejemplo, el descenso de la anfirregulina se puede efectuar en el plano genómico y/o del transcrito mediante el uso de una serie de moléculas que interfieren con la transcripción y/o la traducción [p. ej., agentes de silenciamiento por ARN (p. ej., antisentido, siRNA, shRNA, micro-ARN), ribozima, ADNzima y un sistema CRISPR (p. ej., CRISPR/Cas)], o en el plano de la proteína mediante el uso de, p. ej., antagonistas, anticuerpos, enzimas que escinden el polipéptido o inhiben la funcionalidad del péptido, y similares.

Más adelante se enumera una lista de agentes capaces de hacer descender el nivel de expresión y/o de la actividad de la anfirregulina.

Un ejemplo de un agente capaz de hacer descender una anfirregulina es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de fijarse específicamente a la anfirregulina. Preferiblemente, el anticuerpo se fija específicamente al menos a un epítipo de una anfirregulina. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «epítipo» se refiere a un determinante antigénico de un antígeno al cual se fija el parátipo de un anticuerpo.

Los determinantes epitópicos suelen consistir en agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como cadenas laterales de aminoácidos o de glúcidos y que suelen tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

- 5 El término «anticuerpo», tal y como se utiliza en esta invención, incluye moléculas intactas, así como fragmentos funcionales de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, dsFv o moléculas de un único dominio, tales como VH y VL) que son capaces de fijarse a un epítipo de un antígeno.

De acuerdo con una realización, el anticuerpo está aislado, p. ej., al menos parcialmente separado del medio natural, p. ej. de una célula.

- 10 Los fragmentos de anticuerpo idóneos para poner en práctica algunas realizaciones de la invención incluyen una región determinante de la complementariedad (CDR) de una cadena ligera de inmunoglobulina (denominada en la presente memoria «cadena ligera»), una región determinante de la complementariedad de una cadena pesada de inmunoglobulina (denominada en la presente memoria «cadena pesada»), una región variable de una cadena ligera, una región variable de una cadena pesada, una cadena ligera, una cadena pesada, un fragmento Fc y fragmentos de anticuerpo que comprenden esencialmente toda la región variable tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, tales como un Fv, un Fv monocatenario (scFv), un Fv estabilizado por disulfuros (dsFv), un Fab, un Fab' y un F(ab')₂.

Los fragmentos de anticuerpos funcionales que comprenden regiones variables completas o esencialmente completas de las cadenas tanto ligera como pesada se definen de la manera siguiente:

- 20 (i) Fv, definido como un fragmento manipulado genéticamente que consiste en la región variable de la cadena ligera (VL) y la región variable de la cadena pesada (VH) expresadas como dos cadenas;

(ii) Fv monocatenaria («scFv»), una molécula monocatenaria manipulada genéticamente que incluye la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, conectadas mediante un conector polipeptídico idóneo, tal como una molécula monocatenaria fusionada genéticamente.

- 25 (iii) Fv estabilizado por disulfuros («dsFv»), un anticuerpo manipulado genéticamente que incluye la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, conectadas por un enlace disulfuro manipulado genéticamente.

- 30 (iv) Fab, un fragmento de una molécula de anticuerpo que contiene una porción monovalente de una molécula de anticuerpo que se fija a un antígeno y que se puede obtener mediante el tratamiento del anticuerpo completo con la enzima de tipo papaína para producir la cadena ligera intacta y el fragmento Fd de la cadena pesada que consiste en los dominios variable y CH1 de la misma;

(v) Fab', un fragmento de una molécula de anticuerpo que contiene una porción monovalente de fijación al antígeno de una molécula de anticuerpo que se puede obtener mediante el tratamiento del anticuerpo completo con la enzima de tipo pepsina, seguido de la reducción (se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo);

- 35 (vi) F(ab')₂, un fragmento de una molécula de anticuerpo que contiene una porción monovalente de fijación a antígeno de una molécula de anticuerpo que se puede obtener mediante el tratamiento del anticuerpo completo con la enzima de tipo pepsina (es decir, un dímero de fragmentos Fab' que se mantienen juntos por dos enlaces disulfuro); y

(vii) los anticuerpos con un solo dominio o nanocuerpos están compuestos por un único dominio VH o VL, que presentan una afinidad suficiente por el antígeno.

- 40 El término «anticuerpo monoclonal», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, cada uno de los anticuerpos que comprenden la población son idénticos, salvo por las posibles mutaciones que se producen de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y están dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de los anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en la superficie del antígeno. El modificador «monoclonal» indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no se debe considerar que requiera ninguna producción del anticuerpo mediante ningún método en concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizarán de acuerdo con la presente invención se pueden fabricar con el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al. (1975) *Nature* 256: 495, o se puede fabricar mediante métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 4 816 567). Los «anticuerpos monoclonales» se pueden aislar también de colecciones de anticuerpos en fagos, tal y como se conoce en la técnica, por ejemplo, con el uso de técnicas tales como las descritas en Clackson et al. (1991) *Nature* 352: 624-628 y Marks et al (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, y que se describen con más detalle en la presente memoria más adelante.

Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de los mismos, se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988).

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo de acuerdo con algunas realizaciones de la invención mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante la expresión en *E. coli* o en las células de mamífero (p. ej., cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) del ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener mediante la digestión con pepsina o con papaína de los anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden producir mediante la escisión enzimática de los anticuerpos con la pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede además escindirse mediante el uso de un agente reductor de tioles y, de manera optativa, un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo que son resultado de la escisión de los puentes disulfuro, para producir los fragmentos monovalentes 3.5S de Fab'. Como alternativa, una escisión enzimática que utiliza la pepsina produce directamente dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc. Estos métodos están descritos, por ejemplo, por Goldenberg, patentes de los EE. UU. NOs. 4 036 945 y 4 331 647 y las referencias contenidas en ellas. Véase también Porter R. R. [*Biochem. J.* 73: 119-126 (1959)]. También se pueden utilizar otros métodos de escisión de los anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena ligera-pesada, escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, con tal de que los fragmentos se fijen al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente, tal y como se describe en Inbar et al. [*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69: 2659-62 (1972)]. Como alternativa, las cadenas variables pueden estar conectadas mediante un puente disulfuro intermolecular o estar reticuladas mediante sustancias químicas, tal como el glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas VH y VL conectadas mediante un conector peptídico. Estas proteínas monocatenarias de fijación al antígeno (sFv) se preparan mediante la construcción de un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula hospedadora, tal como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un conector peptídico que hace de puente entre los dos dominios V. Los métodos para producir los sFv están descritos, por ejemplo, por [Whitlow y Filpula, *Methods* 2: 97-105 (1991); Bird et al., *Science* 242: 423-426 (1988); Pack et al., *Bio/Technology* 11: 1271-77 (1993); y la patente de los EE. UU. n.º 4 946 778.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de la complementariedad (CDR). Los péptidos de CDR («unidades de reconocimiento mínimo») se pueden obtener mediante la construcción de genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable del ARN de las células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry [*Methods*, 2, 106-10 (1991)].

De acuerdo con una realización de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de las CDR del anticuerpo anti-AREG son tal y como se presentan en las SEQ ID NOs. 4, 6, 8, 18, 20 y 22 (p. ej., AR30).

De acuerdo con una realización específica, el anticuerpo aislado comprende las SEQ ID NOs. 4 (CDR1), 6 (CDR2) y 8 (CDR3), distribuidas secuencialmente de N a C en una cadena pesada de la proteína, y 18 (CDR1), 20 (CDR2) y 22 (CDR3) distribuidas secuencialmente de N a C en una cadena ligera de la proteína (p. ej., AR30).

De acuerdo con otra realización de la invención, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo es tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 2 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo es tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 16 (es decir, AR30).

De acuerdo con una realización de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de las CDR son tal y como se presentan en las SEQ ID NOs. 32, 34, 36, 48, 50 y 52 (p. ej., AR558).

De acuerdo con una realización específica, el anticuerpo aislado comprende las SEQ ID NOs. 32 (CDR1), 34 (CDR2) y 36 (CDR3), distribuidas secuencialmente de N a C en una cadena pesada de la proteína, y 48 (CDR1), 50 (CDR2) y 52 (CDR3), distribuidas secuencialmente de N a C en una cadena ligera de la proteína (p. ej., AR558).

De acuerdo con otra realización de la invención, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo es tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 30 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo es tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 46 (es decir, AR558).

De acuerdo con una realización de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de las CDR son tal y como se presenta en las SEQ ID NOs. 64, 66 y 68 (p. ej., AR37).

De acuerdo con una realización específica, el anticuerpo aislado comprende las SEQ ID NOs. 64 (CDR1), 66 (CDR2) y 68 (CDR3), distribuidas secuencialmente de N a C en una cadena pesada de la proteína (p. ej., AR37).

De acuerdo con otra realización de la invención, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo es tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 62 (es decir, AR37).

Se apreciará que para el tratamiento o para el diagnóstico en los humanos, se utilizan preferiblemente anticuerpos humanizados, quiméricos, primatizados o humanos.

5 Los anticuerpos quiméricos son moléculas de inmunoglobulina en los que (a) la región constante, o una porción de la misma, está alterada, remplazada o cambiada para que el sitio de fijación al antígeno (región variable) esté conectado a una región constante de unas diferentes o alteradas clase, función efectora y/o especie, o una molécula totalmente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, p. ej., una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable o una porción de la misma está alterada, remplazada o cambiada con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos se conocen bien en la técnica. Véanse, p. ej., las patentes de los EE. UU. NOs. 5 807 715 y 4 816 667.

15 Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, de cadenas de inmunoglobulina o de fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de fijación al antígeno de los anticuerpos) que contienen lo mínimo de secuencia procedente de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen las inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor están remplazados por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos flanqueantes (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana están remplazados por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada ni en las secuencias flanqueantes. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a las de la inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de manera óptima también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)].

30 Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos se conocen bien en la técnica. Por lo general, un anticuerpo humanizado tiene uno o varios restos aminoacídicos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos restos aminoacídicos que no son humanos a menudo se denominan restos importados, que típicamente se toman de un dominio variable a importar. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], mediante la sustitución de las CDR de los roedores o las secuencias de las CDR por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de los EE. UU. n.º 4 816 567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia de una especie que no es humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de las CDR y posiblemente algunos restos de las FR están sustituidos por restos de sitios análogos en los anticuerpos de roedores.

45 Los anticuerpos humanos también se pueden producir mediante el uso de diferentes técnicas conocidas en la materia, entre ellas las genotecas de exposición en fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para preparar anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1): 86-95 (1991)]. De igual forma, los anticuerpos humanos se pueden fabricar mediante la introducción de los locus de inmunoglobulina humana en los animales transgénicos, p. ej., ratones, en los que los genes endógenos de las inmunoglobulinas se han inactivado parcialmente o por completo. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parecen mucho a los observados en los humanos en todos los sentidos, entre ellos la reorganización génica, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este método se describe, por ejemplo, en las patentes de los EE. UU. NOs. 5 545 807; 5 545 806; 5 569 825; 5 625 126; 5 633 425; 5 661 016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13, 65-93 (1995).

55 Los anticuerpos primatizados hacen referencia a anticuerpos que comprenden regiones variables de mono y regiones constantes de humano. Los métodos para producir los anticuerpos primatizados se conocen en la técnica. Véanse, p. ej., las patentes de los EE. UU. NOs. 5 658 570; 5 681 722; y 5 693 780.

Se apreciará que la acción selectiva sobre un compartimento en concreto dentro de la célula se puede conseguir con el uso de anticuerpos intracelulares (también conocidos como «intracuerpos»). Son esencialmente anticuerpos

monocatenarios (SCA, por su nombre en inglés) a los cuales se han añadido las señales de localización intracelular (p. ej., de RE, de mitocondria, de núcleo, de citoplasma). Esta tecnología se ha aplicado con éxito en la materia (para revisión, véase Richardson y Marasco, 1995, *TIBTECH*, vol. 13). Se ha demostrado que los intracuerpos eliminan virtualmente la expresión de receptores de la superficie celular que de otra forma serían abundantes y que inhiben una función proteica dentro de una célula (véanse, por ejemplo, Marasco et al., 1998, *Human Gene Ther.* 9: 1627-42; publicación de solicitud de patente internacional en el marco del PCT n.º WO 94/02610 de Marasco et al.; y publicación de solicitud de patente internacional en el marco del PCT n.º WO 95/03832 de Duan et al.).

Para preparar un vector de expresión de anticuerpos intracelulares, se aísla el ADNc que codifica las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos específicos contra la proteína diana de interés, típicamente a partir de un hibridoma que secreta un anticuerpo monoclonal específico contra el marcador. Los hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales antimarcadores, o los anticuerpos monoclonales recombinantes, se pueden preparar con los métodos conocidos en la técnica. Una vez que se identifica un anticuerpo monoclonal específico de la proteína marcadora (p. ej., un anticuerpo monoclonal procedente de hibridoma o bien un anticuerpo recombinante de una genoteca combinatoria), los ADN que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal se aíslan mediante técnicas estándares de biología molecular. Para los anticuerpos procedentes de hibridomas, se pueden obtener los ADNc de las cadenas ligera y pesada, por ejemplo, mediante amplificación por PCR o escrutinio de genotecas de ADNc. Para los anticuerpos recombinantes, tales como los de genotecas de presentación en fagos, el ADNc que codifica las cadenas ligera y pesada se puede recuperar a partir del envase presentado (p. ej., fagos) aislado durante el escrutinio de las genotecas y se determina la secuencia de nucleótidos de los genes de cadena ligera y pesada de los anticuerpos. Por ejemplo, muchas de tales secuencias se describen en Kabat, E. A. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación del NIH n.º 91-3242 y en la base de datos de secuencias de líneas germinales de humano «Vbase». Una vez obtenidas, la secuencia de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos se clonan en un vector de expresión recombinante mediante el uso de métodos estándares.

En la presente memoria se describe un método específico de generación de anticuerpos anti-AREG. En concreto, un animal con genosupresión de la anfirregulina (p. ej., ratón, rata, conejo, etc.) se inmuniza primero con una proteína de tipo anfirregulina de humano o péptido de la misma (p. ej., dominio de tipo EGF de AREG de SEQ ID n.º 91) para producir una respuesta de anticuerpos contra la proteína de tipo anfirregulina o el péptido de la misma. La inmunización se puede llevar a cabo mediante una administración única o mediante varias administraciones (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más administraciones) durante tanto tiempo como sea necesario para producir anticuerpos (p. ej., cada 2, 3, 4, 5, semanas o más durante un total de, p. ej., 2 a 10 administraciones).

De acuerdo con algunas realizaciones, los anticuerpos generados de acuerdo con este método (p. ej., anticuerpos monoclonales) son específicos de los humanos y pueden reaccionar de manera cruzada con el ligando del animal (p. ej., ratón) y, así pues, se pueden utilizar para el tratamiento de humanos, así como para los ensayos preclínicos de eficacia y toxicidad en los modelos de animales.

De acuerdo con una realización, los anticuerpos producidos son anticuerpos policlonales.

Los anticuerpos monoclonales se pueden generar además desde células productoras de anticuerpos del animal con la anfirregulina genosuprimida. Así pues, los hibridomas se pueden generar mediante la fusión de esplenocitos de los animales con la anfirregulina genosuprimida, lo que genera una titulación más alta de anticuerpos específicos contra la anfirregulina con las células de mieloma (p. ej., células de mieloma de NSO a una relación de 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1 o 2:1, respectivamente, en presencia de PEG). A continuación, los hibridomas se escrutan por la fijación específica a la anfirregulina humana.

Se apreciará que una vez que se identifican las CDR de un anticuerpo, se pueden utilizar técnicas convencionales de ingeniería genética para concebir polinucleótidos que se puedan expresar y que codifican alguna de las formas o fragmentos de los anticuerpos descritos en la presente memoria.

De acuerdo con una realización, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico como la presentada en las SEQ ID NOs. 3, 5, 7, 17, 19 y 21 (p. ej., AR30).

De acuerdo con otra realización de la invención, la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada del anticuerpo es tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 1 y la secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera del anticuerpo es tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 15 (es decir., AR30).

De acuerdo con una realización, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico tal y como se presenta en las SEQ ID NOs. 31, 33, 35, 47, 49 y 51 (p. ej., AR558).

De acuerdo con otra realización de la invención, la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada del anticuerpo es tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 29 y la secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera del anticuerpo es tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 45 (es decir., AR558).

De acuerdo con una realización, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico tal y como se presenta en las SEQ ID NOs. 63, 65 y 67 (p. ej., AR37).

De acuerdo con otra realización de la invención, la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada del anticuerpo es tal y como se presenta en la SEQ ID n.º 61 (es decir, AR37).

5 De acuerdo con una realización, el anticuerpo de la invención está conjugado a un resto o componente efector.

Un «efector» o «resto efector» o «componente efector» de acuerdo con las presentes enseñanzas puede ser una molécula que está unida (o conectada o conjugada), covalentemente a través de un conector o un enlace químico, o bien no covalentemente a través de enlaces iónicos, de van der Waals, electrostáticos o de puentes de hidrógeno, a un anticuerpo. El resto efector puede ser una serie de moléculas diferentes que incluyen, pero sin limitarse a ellas, restos de detección que incluyen compuestos radiactivos, compuestos fluorescentes, una enzima o sustrato, etiquetas tales como etiquetas de epítopos, una toxina, restos activables, un antineoplásico o citotóxico, una quimiotaxina, una lipasa; un antibiótico; o un radioisótopo que emite una radiación «fuerte», p. ej., radiación β .

10

El término «citotóxico» utilizado en la presente memoria hace referencia a una sustancia que inhibe o impide el funcionamiento de las células y/o ocasiona la destrucción de las células. El término pretende incluir los isótopos radioactivos (p. ej., ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y y ^{186}Re), antineoplásicos (tal y como se detalla en la presente memoria más arriba) y toxinas, tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas, entre ellas, pero sin limitarse a ellas, las exotoxinas de *Pseudomonas* PE35, PE38, PE40, exotoxina A (ETA') de *Pseudomonas aeruginosa* y toxina de la difteria (DT390).

15

De acuerdo con una realización específica, el resto efector es una quimioterapia a base de platino.

20 Los términos «marcador» o «resto detectable» se refieren a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen colorantes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (p. ej., como las que se suelen utilizar en un ELISA), biotina, digoxigenina, oro coloidal, nanocristales luminiscentes (p. ej., puntos cuánticos), haptenos y proteínas u otras entidades que se pueden hacer detectables, p. ej., mediante la incorporación de un radiomarcador en el péptido, o se pueden utilizar para detectar anticuerpos que reaccionan específicamente con el péptido. El radioisótopo puede ser, por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I . En algunas realizaciones, los radioisótopos se utilizan como restos tóxicos. Los marcadores se pueden incorporar en los anticuerpos en cualquier posición. Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo al marcador, entre ellos los métodos descritos por Hunter et al., *Nature*, 144: 945 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13: 1014 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, 40: 219 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407 (1982). La vida útil de las composiciones de anticuerpos radiomarcados se puede extender mediante la adición de sustancias que estabilizan el anticuerpo radiomarcado y lo protegen de la degradación. Se puede utilizar cualquier sustancia o combinación de sustancias que estabiliza el anticuerpo radiomarcado, entre ellas las sustancias descritas en la patente de los EE. UU. n.º 5 961 955.

25

35 La presente invención también contempla anticuerpos multiespecíficos, p. ej., anticuerpos biepítópicos, en donde un único anticuerpo es capaz de reconocer dos epítopos diferentes, bien en el mismo ligando (p. ej., sobre la anfirregulina) o bien en diferentes ligandos (p. ej., sobre la anfirregulina y sobre otro ligando del EGFR, o sobre la anfirregulina y sobre el EGFR).

40 Los anticuerpos (p. ej., anticuerpos monoclonales) de la presente invención se caracterizan por una de las características siguientes:

De acuerdo con una realización, se da a conocer un anticuerpo capaz de sensibilizar las células de cáncer de ovario a un antineoplásico.

De acuerdo con una realización, se da a conocer un anticuerpo capaz de reducir el tamaño del tumor de ovario de cualquier tumor de ovario que secreta anfirregulina.

45 La presente invención contempla además el uso de la combinación de anticuerpos, p. ej., cualquier combinación de los anticuerpos denominados AR30, AR37 y AR558.

La presente invención contempla anticuerpos capaces de reconocer solo la anfirregulina humana (p. ej., anticuerpos que no se fijan a las formas murinas de la anfirregulina), así como pananticuerpos capaces de reconocer tanto la anfirregulina humana como la murina (p. ej., ratón).

50 De acuerdo con una realización específica, los anticuerpos denominados AR30 y AR37 son pananticuerpos que reconocen tanto la anfirregulina humana como la murina.

De acuerdo con una realización específica, el anticuerpo denominado AR558 reconoce solo la anfirregulina humana.

De acuerdo con otra realización de este aspecto de la presente invención, los anticuerpos se fijan a la anfirregulina con una K_D por debajo de 10 nM. De acuerdo con una realización, los anticuerpos se fijan a la anfirregulina con una K_D de 0,5-2 nM, 0,5-5 nM, 0,5-10 nM, 1-2 nM, 1-5 nM, 1-10 nM o 5-10 nM.

El descenso de la anfirregulina también se puede conseguir mediante el silenciamiento por ARN. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la frase «silenciamiento por ARN» hace referencia a un grupo de mecanismos reguladores [p. ej., interferencia por ARN (iARN), silenciamiento génico transcripcional (TGS, por su nombre en inglés), silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, por su nombre en inglés), represión, cosupresión y represión traduccional] mediados por moléculas de ARN que dan lugar a la inhibición o «silenciamiento» de la expresión de un correspondiente gen que codifica la proteína. El silenciamiento por ARN se ha observado en muchos tipos de organismos, que incluyen plantas, animales y hongos.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «agente de silenciamiento por ARN» se refiere a un ARN que es capaz de inhibir o «silenciar» específicamente la expresión de un gen deseado. En determinadas realizaciones, el agente de silenciamiento por ARN es capaz de impedir el procesamiento completo (p. ej., la traducción completa y/o expresión) de una molécula de ARNm a través de un mecanismo de silenciamiento postranscripcional. Los agentes de silenciamiento por ARN incluyen moléculas de ARN no codificante, por ejemplo, ARN bicatenarios que comprenden hebras emparejadas, así como ARN precursores a partir de los cuales se pueden generar tales ARN no codificantes pequeños. Los agentes de silenciamiento por ARN de ejemplo incluyen ARN bicatenarios, tales como siRNA, miRNA y shRNA. En una realización, el agente de silenciamiento por ARN es capaz de inducir la interferencia por ARN. En otra realización, el agente de silenciamiento por ARN es capaz de mediar la represión de la traducción.

De acuerdo con una realización de la invención, el agente de silenciamiento por ARN es específico del ARN deseado (p. ej., anfirregulina) y no inhibe cruzadamente ni silencia un gen o una variante de ajuste que presenta el 99 % o menos de homología global con el gen deseado, p. ej., menos del 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 % de homología global con el gen deseado.

De acuerdo con una realización, el silenciamiento por ARN lo llevan a cabo los ARN pequeños interferentes (siRNA, por su nombre en inglés), tales como, por ejemplo, el siRNA de la anfirregulina (p. ej., sc-39412, Santa Cruz Biotechnology, Inc).

De acuerdo con una realización, el silenciamiento por ARN lo llevan a cabo los microARN (miRNA o miR), tales como, por ejemplo, el miRNA de la anfirregulina (p. ej., producto con ID HmiT009941, GeneCopoeia).

De acuerdo con una realización, el descenso de una anfirregulina se efectúa con el uso de un polinucleótido antisentido capaz de hibridarse de manera específica con un transcrito de tipo ARNm que codifica la anfirregulina. Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido idóneo de la anfirregulina puede ser como el que está disponible en Sigma (p. ej., producto con ID: A7080, Sigma).

El descenso de una anfirregulina puede además efectuarse, por ejemplo, con moléculas de tipo ribozima capaces de escindir específicamente los transcritos de tipo ARNm que codifican una anfirregulina, o utilizan una tecnología de endonucleasa guiada por ARN, p. ej., el sistema de CRISPR.

Otro agente capaz de hacer descender la anfirregulina sería cualquier molécula que se fije y/o que escinda la anfirregulina. Tales moléculas pueden ser antagonistas de la anfirregulina o péptidos inhibidores de la anfirregulina, e incluyen, por ejemplo, heparina, que se fija e inhibe la actividad de la AREG, glucosamina que induce la síntesis de los sulfatos de heparano, un antagonista fisiológico de la AREG, o un EGFR soluble (sEGFR).

Los presentes inventores han demostrado que el tratamiento *in vivo* de los ratones con anticuerpos contra la AREG reduce el volumen tumoral (véanse los ejemplos 7 y 10) y sensibiliza las células cancerosas a un antineoplásico (véase el ejemplo 7).

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se da a conocer un método para tratar el cáncer mediante la administración de un anticuerpo o una combinación de anticuerpos de algunas realizaciones de la invención.

De acuerdo con las presentes enseñanzas, se analiza un sujeto por el nivel de expresión o la actividad de la anfirregulina y, de manera optativa, de HB-EGF y de TGF- α antes de la administración del anticuerpo o de una combinación de anticuerpos de algunas realizaciones de la invención.

El sujeto tratado se caracteriza preferiblemente por un nivel de expresión de la anfirregulina por encima de un umbral predeterminado. De manera optativa, el sujeto se caracteriza por la ausencia de expresión del TGF- α y/o del HB-EGF, o una expresión por debajo de un nivel predeterminado del TGF- α y/o del HB-EGF en comparación con un sujeto sano.

Una «combinación de anticuerpos» o «politerapia de anticuerpos», tal y como se utiliza en la presente memoria,

hace referencia a al menos dos anticuerpos. De acuerdo con una realización, un primer anticuerpo de la combinación de anticuerpos es el anticuerpo que se describe en la presente memoria (p. ej., AR30, AR558, AR37).

De acuerdo con otra realización específica, la combinación de anticuerpos comprende cualquier combinación de anticuerpos denominados AR30, AR37 y AR558, p. ej., AR30 y AR558, AR30 y AR37, AR558 y AR37 o AR30 y AR558 y AR37.

De acuerdo con otra realización específica, el segundo anticuerpo de la combinación de anticuerpos se fija a un ligando receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por su nombre en inglés) distinto del primer anticuerpo (p. ej., se fija a β -celulina (BTC), epirregulina (EPR), epígeno (EPG) y/o neurregulina).

De acuerdo con otra realización específica, el segundo anticuerpo de la combinación de anticuerpos se fija a un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), tal como HER2 (presente en algunas formas de las células de cáncer de ovario). Los anticuerpos anti-EGFR de ejemplo que se pueden utilizar de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen cetuximab (p. ej., Erbitux®), trastuzumab (p. ej., Herceptin®) y pertuzumab (p. ej., Perjeta®).

De acuerdo con otra realización específica, el segundo anticuerpo de la combinación de anticuerpos comprende un anticuerpo que actúa selectivamente sobre un factor expresado (p. ej., sobreexpresado) en la superficie de las células cancerosas, p. ej., una proteína expresada en la célula cancerosa, tal como el receptor del ácido fólico (presente en la superficie de algunas células de cáncer de ovario) o un marcador presente en la superficie de la célula cancerosa (p. ej., antígeno 125 del cáncer (CA-125) o MUC1 presente en algunas formas de células de cáncer de ovario). En consecuencia, los anticuerpos de ejemplo que se pueden utilizar de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen oregovomab (un anticuerpo anti-CA-125) y HMFG1 (un anticuerpo anti-MUC1).

De acuerdo con otra realización específica, el segundo anticuerpo de la combinación de anticuerpos comprende un anticuerpo que actúa selectivamente sobre un factor asociado al desarrollo del cáncer o a la angiogénesis, p. ej., el VEGF. Un anticuerpo anti-VEGF de ejemplo que se puede utilizar de acuerdo con las presentes enseñanzas incluye bevacizumab (p. ej., Avastin®).

De acuerdo con otra realización específica, el segundo anticuerpo de la combinación de anticuerpos comprende un anticuerpo que actúa selectivamente sobre el TNF (es decir, anticuerpo anti-TNF). Un anticuerpo anti-TNF de ejemplo que se puede utilizar de acuerdo con las presentes enseñanzas incluye el infliximab (p. ej., Remicade®), adalimumab (p. ej., Humira®), certolizumab pegol (p. ej., Cimzia®) y golimumab (p. ej., Simponi®).

La actuación selectiva sobre más de una diana (es decir, AREG) tal y como se da a conocer en la presente invención se puede efectuar gracias al uso de dos anticuerpos diferentes o con el uso de una configuración de anticuerpos biespecíficos como se conoce bien en la técnica.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, se puede tratar un cáncer mediante la administración de uno o más anticuerpos y un antineoplásico.

De acuerdo con una realización específica, el antineoplásico se basa en el platino. De acuerdo con otra realización específica, el antineoplásico es cisplatino o doxorubicina.

Además, la presente invención se puede utilizar junto con agentes que hacen descender un EGFR, tal como inhibidores de cinasas pequeños y trampas/cebos del receptor del ligando soluble [descritos en detalle en Cardo-Vila et al. (2010) *PNAS* 107 (11) 5118-5123].

Además, la presente invención se puede utilizar junto con agentes que hacen descender la metaloproteinasas, p. ej., el dominio 17 de la metalopeptidasa (ADAM17)/TACE (enzima convertidora del factor α de la necrosis tumoral). Los ejemplos de inhibidores de TACE/ADAM17 incluyen, pero sin limitarse a ellos, derivados del ácido sulfónico o del ácido fosfínico, p. ej., sulfonamidas, ácidos hidroxámicos con sulfonamidas, ácidos hidroxámicos con amida de ácido fosfínico, p. ej., tal y como se describe en las solicitudes de patente internacional WO 98/16503, WO 98/16506, WO 98/16514, WO 98/16520.

La administración de los diferentes agentes (p. ej., anticuerpos, antineoplásicos, etc.) se pueden realizar todos a la vez o unos detrás de otros.

Se apreciará que los agentes de la presente invención (p. ej., anticuerpo) se pueden administrar al sujeto tal cual o en una composición farmacéutica, en donde se mezcla con vehículos o excipientes idóneos.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, una «composición farmacéutica» hace referencia a una preparación de uno o más ingredientes activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente idóneos. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En la presente memoria, el término «ingrediente activo» hace referencia al anticuerpo responsable del efecto biológico.

En adelante, las frases «vehículo fisiológicamente aceptable» y «vehículo farmacéuticamente aceptable», que se pueden utilizar indistintamente, hacen referencia a un vehículo o un diluyente que no provoca una irritación significativa en un organismo y que no anula la actividad biológica ni las propiedades del compuesto administrado. Se entiende que con estas frases quedan incluidos los adyuvantes.

5 En la presente memoria, el término «excipiente» hace referencia a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen el carbonato de calcio, el fosfato de calcio, diferentes azúcares y tipos de almidón, derivados de la celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

10 Las técnicas para formular y administrar los fármacos se pueden encontrar en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Las vías de administración idóneas pueden incluir, por ejemplo, la administración oral, rectal, transmucosa, sobre todo transnasal, intestinal o parenteral, entre ellas inyecciones intramuscular, subcutánea e intramedular, así como intratecal, intraventricular directa, intracardíaca, p. ej., en la cavidad ventricular derecha o izquierda, en la arteria coronaria común, inyecciones intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular.

15 Las estrategias convencionales para la introducción de fármacos en el sistema nervioso central (SNC) incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (p. ej., inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (p. ej., producción de una proteína de fusión quimérica que comprende un péptido de transporte que tiene afinidad por la molécula de la superficie de las células endoteliales en combinación con un agente que es por sí solo incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica) en un intento de explotar una de las
20 vías de transporte endógeno de la barrera hematoencefálica; estrategias farmacológicas diseñadas para incrementar la solubilidad de un agente en los lípidos (p. ej., conjugación de agentes hidrosolubles a vehículos lipídicos o de colesterol); y la ruptura transitoria de la integridad de la barrera hematoencefálica mediante la destrucción hiperosmótica (que es el resultado de la infusión de una solución de manitol en la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo, tal como un péptido de tipo angiotensina). Sin embargo, cada una de
25 estas estrategias tiene limitaciones, tales como los riesgos inherentes asociados a un procedimiento quirúrgico invasivo, una limitación del tamaño impuesto por una limitación inherente en los sistemas de transporte endógeno, efectos secundarios biológicos potencialmente indeseables asociados a la administración sistémica de una molécula quimérica que comprende un motivo de vehículo que podría ser activo fuera del SNC y el posible riesgo del daño cerebral dentro de regiones del cerebro donde se altera la barrera hematoencefálica, lo que lo convierte
30 en un método de administración subóptimo.

Como alternativa, se puede administrar la composición farmacéutica de una manera local en vez de sistémica, por ejemplo, mediante la inyección de una composición farmacéutica directamente en una región de un tejido de un paciente.

35 Las composiciones farmacéuticas de algunas realizaciones de la invención se pueden fabricar mediante los procedimientos bien conocidos en la técnica, p. ej., por medio de procedimientos convencionales de mezclado, disolución, granulación, fabricación de grageas, suspensión homogénea, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

40 Las composiciones farmacéuticas para ser usadas de acuerdo con algunas realizaciones de la invención se pueden formular, así pues, de la manera convencional con uno o varios vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que se pueden utilizar en el ámbito farmacéutico. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

45 Para la inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como la solución de Hank, la solución de Ringer o el tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa, en la formulación se utilizan los penetrantes adecuados para la barrera a permear. Tales penetrantes suelen ser los conocidos en la técnica.

50 Para la administración oral, la composición farmacéutica se puede formular con facilidad al combinar los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten formular la composición farmacéutica como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones viscosas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para el uso oral se pueden fabricar al hacer uso de un excipiente sólido, de manera optativa moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, añadiéndoles después auxiliares idóneos, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes idóneos son, en concreto, sustancia de relleno, tales como azúcares, entre ellos lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de
55 celulosa, tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables, tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico, o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

- Los núcleos de las grageas se proporcionan con los revestimientos idóneos. Con este propósito, se pueden utilizar soluciones concentradas de azúcar que de manera optativa pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de lacado y solventes orgánicos idóneos o mezclas de solventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los revestimientos de los comprimidos o de las grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.
- Las composiciones farmacéuticas que se pueden utilizar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste suave pueden contener los ingredientes activos en mezcla con la sustancia de relleno, tal como lactosa, aglutinantes, tales como almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, de manera optativa, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos idóneos, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se le pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para la administración oral deben ser en dosis idóneas para la vía de administración escogida.
- Para la administración yugal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de la manera convencional.
- Para la administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para ser usados de acuerdo con algunas realizaciones de la invención se administran de manera cómoda en forma de una presentación de aerosol para pulverización desde un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor idóneo, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar al proporcionarle una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina, para ser usadas en un dispensador, las cuales contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo idónea, tal como lactosa o almidón.
- La composición farmacéutica descrita en la presente memoria se puede formular para la administración parenteral, p. ej., mediante la inyección en embolada o la infusión continua. Las formulaciones para la inyección se pueden presentar en forma farmacéutica de dosis unitaria, p. ej., en ampollas o en contenedores de multidosis con, de manera optativa, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o disgregantes.
- Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en una forma hidrosoluble. Además, se pueden preparar suspensiones de los ingredientes activos como suspensiones adecuadas para la inyección con base de agua o aceite. Los solventes o vehículos lipófilos idóneos incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. De manera optativa, la suspensión puede también contener estabilizantes idóneos o agentes que incrementan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.
- Como alternativa, el ingrediente activo puede ser en forma de polvo para la constitución con un vehículo idóneo, p. ej., solución acuosa libre de pirógenos y estéril antes de ser usada.
- La composición farmacéutica de algunas realizaciones de la invención también se puede formular en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, mediante el uso de, p. ej., bases convencionales para supositorios, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.
- Las composiciones farmacéuticas idóneas para ser usadas en el contexto de algunas realizaciones de la invención incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el propósito pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de ingredientes activos (p. ej., anticuerpos) eficaces para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (p. ej., cáncer) o prolongar la supervivencia del sujeto que se trata.
- La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está también dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada dada a conocer en la presente memoria.
- Para cualquier preparación utilizada en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo *in vitro* y celulares. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos de animales para conseguir una concentración o titulación deseadas. Tal información se puede utilizar para determinar de manera más precisa las dosis útiles en los humanos.
- Los modelos de ejemplo del cáncer incluyen, pero sin limitarse a ellos, modelos de animales murinos, entre ellos ratones atímicos NCr inoculados con células de cáncer de páncreas de humano MiaPaCa (es decir, modelo de animal de cáncer de páncreas), con la línea celular de tumor de pulmón de humano H1437 (es decir, modelo de animal de cáncer de pulmón), con las células de cáncer de cabeza y cuello de humano Cal-27 (es decir, modelo

de animal de cáncer de cabeza y cuello), o con células de carcinoma de ovario de humano MLS (es decir, modelo de animal de cáncer de ovario).

Independientemente de lo dicho anteriormente, los agentes de la presente invención se administran en una cantidad seleccionada para evitar los efectos secundarios indeseados.

- 5 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en la presente memoria se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares *in vitro*, en cultivos de células o en animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo *in vitro* y de células y de estudios con animales se pueden utilizar para formular un margen de dosis para ser usadas en los humanos. La dosis puede variar según la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Cada médico puede elegir la formulación exacta, la vía de administración y la dosis a la vista de la situación del paciente (véase, p. ej., Fingl et al., 1975 en *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, cap. 1. pág. 1).

- 10 La cantidad de dosis y los intervalos de administración se pueden ajustar por separado para proporcionar suficiente plasma o cantidad de tejido del ingrediente activo para que induzca o suprima el efecto biológico (es decir, concentración mínimamente eficaz, CME). La CME variará para cada preparación, pero se puede estimar a partir de datos *in vitro*. Las dosis necesarias para conseguir la CME dependerán de las características individuales y la vía de administración. Se pueden utilizar ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.

Según la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una sola o numerosas administraciones, en donde el ciclo de tratamiento dura de varios días a varias semanas o hasta que se efectúa una curación o se consigue la disminución del estado patológico.

- 20 La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto a tratar, de la gravedad de la dolencia, de la manera de administración, del criterio del médico que la recete, etc.

- 25 Las composiciones de algunas realizaciones de la invención pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit autorizado por la FDA, que puede contener una o varias formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina metálica o de plástico, tal como un envase de blíster. En envase o dispositivo dispensador puede venir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o el dispensador puede también alojar una notificación asociada al envase en una forma prescrita por un organismo gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de la sustancia farmacéutica, en donde dicha notificación refleja la autorización por este organismo de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Tal notificación, por ejemplo, puede ser un etiquetado autorizado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. para los fármacos recetables o de un prospecto de producto autorizado. También se pueden preparar las composiciones, que comprenden una preparación de la invención formulada en un vehículo farmacéutico compatible, se pueden colocar en un contenedor idóneo y se pueden etiquetar para el tratamiento de una afección indicada, tal y como se detalla con más información más arriba.

- 35 Se apreciará que el artículo de fabricación puede comprender además otra composición terapéutica para el cáncer, p. ej. un antineoplásico. Así pues, por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden empaquetar en un envase, mientras que el antineoplásico se puede empaquetar en un segundo envase, ambos para el tratamiento terapéutico.

- 40 Para reforzar el tratamiento del cáncer, la presente invención contempla además administrar al sujeto un tratamiento adicional, tal como radioterapia, quimioterapia, fototerapia y terapia fotodinámica, cirugía, nutriterapia, terapia ablativa, radioterapia y quimioterapia combinadas, braquioterapia, tratamiento con haces de protones, inmunoterapia, tratamiento celular y tratamiento radioquirúrgico con haces de fotones. También se contemplan los analgésicos y otras pautas de tratamiento. Ejemplos de antineoplásicos se describen en detalle más arriba. De acuerdo con una realización específica, el antineoplásico es un derivado de platino.

- 45 Tal y como se mencionó, el antineoplásico (p. ej., derivado de platino) también puede estar conjugado al anticuerpo de la presente invención.

- Tal y como se mencionó, para incrementar la actividad biológica específica ejercida por el anticuerpo de la presente invención, tal como un anticuerpo, puede además incluir un citotóxico (es decir, un fármaco), tal como las exotoxinas de *Pseudomonas* PE35, PE38, PE40, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (ETA') y la toxina de la difteria (DT390) para formar una inmunotoxina específica. Tal citotóxico puede estar unido al anticuerpo.

- 50 Además, los anticuerpos que se dan a conocer en la presente invención se pueden utilizar también para detectar la anfirregulina en una célula o tejido canceroso, o para valorar su descenso. Para las aplicaciones diagnósticas, los anticuerpos se marcarán típicamente con un resto detectable. El resto detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, o una etiqueta (tal como la descrita más arriba y a la cual se puede fijar un anticuerpo marcado). Los anticuerpos de la presente invención se pueden emplear en

cualquier método de ensayo conocido, tales como ensayos de fijación competitivos, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación [Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, págs. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)].

- 5 Los anticuerpos de este aspecto de la presente invención se pueden incluir en un kit de diagnóstico, en el cual los anticuerpos y, de manera optativa, el soporte sólido y los reactivos para la toma de imagen (p. ej., anticuerpos, sustrato cromógeno, etc.), se pueden empaquetar en envases idóneos con los tampones y conservantes adecuados, y utilizarse para el diagnóstico.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «aproximadamente» se refiere a $\pm 10\%$.

- 10 Los términos «comprende», «que comprende», «incluye», «que incluye», «que tiene» y sus conjugados significan «entre ellos, pero sin limitarse a ellos».

El término «que consiste en» significa «que incluye y se limita a».

El término «que consiste esencialmente en» significa que la composición, método o estructura pueden incluir otros ingredientes, etapas y/o partes, pero solo si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición, método o estructura reivindicada.

- 15 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la forma singular «un», «una» y «el» incluyen las referencias plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Por ejemplo, el término «un compuesto» o «al menos un compuesto» pueden incluir numerosos compuestos, lo que incluye las mezclas de los mismos.

- 20 A lo largo de esta solicitud, se pueden presentar diferentes realizaciones de esta invención en un formato de márgenes. Se debe saber que la descripción en el formato de márgenes es simplemente por comodidad y brevedad, y no se debe considerar como una limitación inflexible del alcance de la invención. En consecuencia, la descripción de un margen se debe considerar que ha descrito específicamente todos los submárgenes posibles, así como cada uno de los valores numéricos dentro de ese margen. Por ejemplo, la descripción de un margen tal como de 1 a 6 se debe considerar que contiene submárgenes específicamente descritos, tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como cada uno de los números dentro de ese margen, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del margen.

- 25 Cuando se indica en la presente memoria un margen numérico, se quiere decir que incluye cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del margen indicado. Las frases «que oscila/oscila entre» un primer número indicado y un segundo número indicado y «que oscila/oscila desde» un primer número indicado «a» un segundo número indicado se utilizan en la presente memoria indistintamente y pretenden incluir el primer y el segundo número indicados y todos los números fraccionarios y enteros entre estos.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «método» se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para culminar una tarea dada, que incluye, pero sin limitarse a ellas, las maneras, medios, técnicas y procedimientos bien conocidos, o fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los expertos de la técnica química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

- 35 Se apreciará que determinadas características de la invención que se han descrito, por claridad, en el contexto de realizaciones independientes, también pueden darse a conocer en combinación con una única realización. A la inversa, diferentes características de la invención que se han descrito, por brevedad, en el contexto de una única realización también se pueden dar a conocer de manera independiente o en cualquier subcombinación idónea o como idónea en cualquier otra realización descrita de la invención. Determinadas características descritas en el contexto de diferentes realizaciones no se consideran características esenciales de estas realizaciones, a menos que la realización sea inoperativa sin esos elementos.

Las diferentes realizaciones y aspectos de la presente invención tal y como están delineados más arriba y tal y como se reivindican en el apartado de reivindicaciones que está más abajo encuentran soporte experimental en los ejemplos siguientes.

45 **Ejemplos**

Ahora se hace referencia a los ejemplos que vienen a continuación que, junto con las descripciones de más arriba, ilustran la invención de una manera no limitante.

- 50 En líneas generales, la nomenclatura utilizada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y del ADN recombinante. Tales técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», Sambrook et al., (1989); «Current Protocols in Molecular Biology», volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed., (1994); Ausubel et al., «Current Protocols in Molecular Biology», John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, «A Practical Guide to Molecular Cloning», John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., «Recombinant DNA», Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) «Genome

Analysis: A Laboratory Manual Series», vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías tal y como se presentan en las patentes de los EE. UU. NOs. 4 666 828; 4 683 202; 4 801 531; 5 192 659 y 5 272 057; «Cell Biology: A Laboratory Handbook», volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); «Current Protocols in Immunology», volúmenes I-III Coligan J. E. ed. (1994); Stites et al. (eds), «Basic and Clinical Immunology» (8.^a edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), «Selected Methods in Cellular Immunology», W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen con detalle en la patente y en la bibliografía científica, véanse, por ejemplo, patentes de los EE. UU. NOs. 3 791 932; 3 839 153; 3 850 752; 3 850 578; 3 853 987; 3 867 517; 3 879 262; 3 901 654; 3 935 074; 3 984 533; 3 996 345; 4 034 074; 4 098 876; 4 879 219; 5 011 711 y 5 281 521; «Oligonucleotide Synthesis» Gait, M. J., ed. (1984); «Nucleic Acid Hybridization» Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); «Transcription and Translation» Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds (1984); «Animal Cell Culture» Freshney, R. I., ed. (1986); «Immobilized Cells and Enzymes» IRL Press, (1986); «A Practical Guide to Molecular Cloning» Perbal, B., (1984) y «Methods in Enzymology», vol. 1-317, Academic Press; «PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications», Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., «Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual» CSHL Press (1996). Se dan a conocer otras referencias generales a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en este se conocen bien en la técnica y se dan a conocer para la comodidad del lector.

Material general y procedimientos experimentales

Material y líneas celulares

Se utilizaron los anticuerpos siguientes: anti-EGFR (clon 13G8) de Enzo Life Science, antifosfo-EGFR (pTyr1068, clon D7A5) de Cell Signaling Technologies, antifosfo-ERK1/2 (pThr185/pTyr187, clon MAPK-YT) de Sigma-Aldrich, anti-ERK2 (clon C14) y antiubiquitina (clon P4D1) de Santa Cruz Biotechnology. Todos los factores de crecimiento proceden de Peprotech.

Las líneas celulares de cáncer de ovario eran del servicio centralizado de líneas celulares del Instituto Weizmann de Ciencias. Las células MCF10A se adquirieron a la American Type Culture Collection (ATCC CRL-10317TM). Las líneas celulares de ovario y de pulmón se hicieron crecer en RPMI-1640 suplementado con suero de ternera fetal al 10 % (FCS) y PenStrep al 1 % (penicilina a 100 U/ml y estreptomycin a 100 µg/ml) con la excepción de las células OVCAR3, que se hicieron crecer en FCS al 20 %. Las células MCF10A se hicieron crecer tal y como está descrito previamente [Tarcic et al. (2012) *FASEB Journal*: publicación oficial de la Federación de las Sociedades Estadounidenses para Biología Experimental 26. 1582-1592].

Especímenes de pacientes

El líquido ascítico de los pacientes con cáncer de ovario y los derrames pleurales de pacientes con cáncer de pulmón se recogieron en el Sheba Medical Center en Tel Hashomer (Israel). El estudio fue autorizado por el Comité de Ética del Centro médico.

Ensayos de ELISA

Se inocularon líneas celulares de cáncer humano en placas de 10 cm, se cubrieron con el medio (6 ml) y se incubaron durante 4 días. Se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min. La concentración de los ligandos de la familia del EGF AREG, BTC, EGF, HB-EGF, NRG1 y TGF-α se analizaron utilizando un kit de ELISA (kit de ELISA DuoSet, R&D Systems).

Ensayos de desplazamiento del ligando y de descenso del receptor

Para los ensayos de desplazamiento del ligando, las células se hicieron crecer en placas de 12 pocillos y se dejaron en ayuno de suero durante 12 a 15 h. A continuación, las células se lavaron con el medio de fijación (medio RPMI que contiene 20 mM de HEPES, pH 7,5 y albúmina al 1 %) y se incubaron durante 3 h en hielo con un EGF radiomarcado (50 ng/ml; de Perkin-Elmer) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de un ligando competidor sin marcador. Las células se lavaron más tarde, se lisaron y se les midió la radioactividad.

Para los ensayos de descenso del receptor, las células se dejaron en ayuno de suero tal y como está descrito, y posteriormente se estimularon con EGF (10 ng/ml), TGF-α (10 ng/ml) o AREG (50 ng/ml) durante 30, 60, 90 o 120 min. Al final del periodo de incubación, las células se colocaron en hielo, se lavaron con el medio enfriado en hielo y se sometieron a lavado con ácido suave (0,2 M del tampón de acetato de sodio, pH 4,5, y NaCl a 0,5 M) durante 2 min, seguido de 2 lavados en el medio enfriado en hielo. A continuación, se incubaron las células durante 60 min a 4 °C con un EGF radiomarcado. Los pocillos de control se incubaron con un EGF radiomarcado y un exceso (50×) del EGF sin marcar. Finalmente, se lisaron las células en NaOH a 1 N y se les determinó la radioactividad.

Ensayos de ubiquitinación del receptor inducida por el ligando

Las células se dejaron en ayuno de suero durante una noche y a continuación se estimularon con EGF, TGF-α o AREG durante 10 min. Para la determinación de la ubiquitinación del receptor inducida por el ligando, se extrajeron

las células en el tampón de lisis (HEPES a 50 mM, pH 7,5, NaCl a 150 mM, glicerol al 10 %, Triton X-100 al 1 %, EDTA a 1 mM, EGTA a 1 mM, NaF a 10 mM y fosfato de β -glicerol a 30 mM) con Na_3VO_4 a 0,2 mM recién añadido, un coctel de inhibidores de proteasas y *N*-etilmaleimida (NEM) a 2 mM. A 500 μg del lisado con proteínas se le añadieron 20 μl de perlas de agarosa con proteína G y 1 μg del anticuerpo. Después de una incubación de 2 h a 4 °C, se recogieron los inmunoprecipitados mediante centrifugación a 14000 rpm a 4 °C durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento tres veces, antes de la electroforesis.

Aislamiento del ARN y qPCR

Se extrajo el ARN total mediante el uso del kit de ARN de células cultivadas PerfectPure™ (5Prime) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinó la cantidad y la calidad del ARN total con el uso del espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. El ADN complementario se sintetizó con el kit de transcripción inversa de alta capacidad (Applied Biosystems, Life Technologies). Los cebadores para los reguladores positivos (*EREG*, *TGF- α* y *HB-EGF*), los reguladores negativos (*MIG6/RALT*, *DUSP1* y *DUSP6*) y la β 2-microglobulina (*B2M*) eran como se describió anteriormente (Lauriola M. et al., (2014) *Nat Commun.* 5: 5073). Los cebadores KiCqStart de Sigma-Aldrich se utilizaron para detectar la cantidad de *AREG* de humano (H_AREG_3). Se realizó el análisis de qPCR en tiempo real con SYBR Green (Applied Biosystems) y los cebadores específicos en el sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems). Las señales de la qPCR (cT) se normalizaron por la *B2M*.

Tabla 4: Lista de cebadores utilizados para la amplificación por qPCR de los transcritos que codifican los reguladores negativos y positivos de la señalización del EGFR

Gen	Secuencia del cebador (5' -> 3')	SEQ ID n.º
DUSP1_Fw	ACTTCATAGACTCCATCAAGAA	77
DUSP1_Rev	CTCGTCCAGCTTGACTCGAT	78
EREG_Fw	TCCATCTTCTACAGGCAGTCCT	79
EREG_Rev	AGCCACACGTGGATTGTCTT	80
DUSP6_Fw	CACTGGAGCCAAAACCTGTC	81
DUSP6_Rev	AGTGACTGAGCGGCTAATGC	82
HBEGF_Fw	GCTGTGGTGCTGTCATCTGT	83
HBEGF_Rev	TCATGCCCAACTTCACTTTCT	84
TGFA_Fw	GTTTTTGGTGCAGGAGGACA	85
TGFA_Rev	CACCAACGTACCCAGAATGG	86
MIG6_Fw	GCCACTGCTTTGCAGAAAAT	87
MIG6_Rev	CCTCTTCATGTGGTCCCAAG	88
B2M_Fw	TGCCTGCCGTGTGAACCATGT	89
B2M_Rev	TGCGGCATCTTCAAACCTCCATGA	90

Construcciones lentivíricas

Los shRNA que actúan selectivamente sobre la AREG se obtuvieron de Sigma-Aldrich (TRCN0000414423, TRCN0000419935, TRCN0000420315, TRCN0000423298, TRCN0000426883). El vector para el shRNA desordenado se obtuvo de Addgene (plásmido 1864). Los lentivirus se empaquetaron mediante la cotransfección de las construcciones con la mezcla de empaquetamiento de lentivirus MISSION de Sigma-Aldrich. Brevemente, los lentivirus se produjeron por la transfección de las células HEK293FT con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células OVCAR5 se infectaron posteriormente y se seleccionaron con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puomicina para crear las líneas celulares estables con shControl y shAREG. La eficacia de la

genosupresión de la AREG se valoró en función de la cantidad de ARN por qPCR y la concentración de la proteína por medio de ELISA.

Ensayos para la luciferasa indicadora

Para los ensayos del promotor indicador, las células MLS y A549 se cotransfectaron con un plásmido con la luciferasa de *Renilla* que contiene la región del promotor de *AREG*, de *TGF- α* , un control positivo de la actividad del promotor, es decir, *GAPDH*, o un vector *R01* de control aleatorio utilizado como control negativo (SwitchGear Genomics). Además, el vector pGL3-Control que contiene la luciferasa de luciérnaga (Promega) se transfectó a modo de control para la eficacia de la transfección. Se determinó la actividad del promotor con el sistema de ensayo dual de la luciferasa indicadora de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega). Los valores de luminiscencia de la luciferasa de *Renilla* se normalizaron en función de la luminiscencia de luciérnaga y se cuantificaron con respecto al control.

Mediciones de la resonancia de plasmón superficial (RPS)

Se realizó la RPS en un instrumento BIAcore 3000 (BIAcore, Uppsala, Suiza). Se diluyeron las proteínas en acetato de sodio a 100 mM (pH 4,6) a 20 μ g/ml y se inmovilizaron en un chip sensor CM5 mediante un protocolo estándar de conjugación de aminas. La solución de proteínas se dejó fluir sobre el chip durante 5 min a una velocidad de 20 μ l/min. El ensayo de fijación se realizó mediante la inyección de las soluciones de analitos a 25 °C a 8 concentraciones diferentes (en función del ligando: hAREG a 1-30 nM, mAREG a 500-5000 nM, hHB-EGF a 1-100 nM y mHB-EGF a 1-20 μ M). Estas condiciones dieron lugar a una relación lineal entre la concentración de proteínas y la respuesta máxima (estado estacionario), lo que indica un régimen de pseudoprimer orden con respecto al ligando inmovilizado. La señal neta se obtuvo por sustracción de la señal del blanco (matriz de dextrano simple) a partir de la señal registrada desde la superficie inmovilizada. La fase de asociación para la fijación del analito a todos los ligandos duró 4 minutos y las fases de disociación se vigilaron durante 3 minutos. La regeneración de la superficie entre los ciclos de fijación consecutivos incluía una inyección de 1 min de NaOH a 2 mM. Se siguió la respuesta en función del tiempo (sensograma). Los datos de varias concentraciones se sometieron al ajuste mediante el programa informático BIAevaluation 3.2.

Generación de anticuerpos monoclonales

Un anticuerpo monoclonal que actúa selectivamente sobre la AREG de humano, denominado AR30, se generó tal y como está descrito anteriormente [Lindzen M. et al. (2010) «Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America» 107, 12559-12563]. Específicamente, como se sabe que los tres puentes disulfuro muy conservados son responsables del correcto plegamiento y de la actividad del dominio de tipo EGF de todos los ligandos de ErbB, el dominio de tipo EGF de la AREG se expresó en las bacterias como una proteína de fusión, unida a la proteína tiorredoxina (TRX). La proteína fusionada también contenía una repetición de histidinas. Después de la expresión en las bacterias, la AREG se purificó mediante el uso de una columna con metales y su actividad biológica se verificó al confirmar su capacidad para inducir la fosforilación del EGFR. Los resultados obtenidos aseguraban que el ligando recombinante representaba la correspondiente conformación funcionalmente activa. Así pues, los ratones se inmunizaron posteriormente con la AREG activa fusionada a la TRX.

Después de cuatro inyecciones de TRX-AREG, se obtuvieron sueros de los ratones y se les evaluó la respuesta contra el ligando. El antisuero de los ratones inmunizados se analizó por su capacidad para inhibir la fosforilación del EGFR inducida por el ligando. Posteriormente, el bazo de dos ratones se utilizó para establecer los hibridomas que se escrutaron mediante ELISA por su capacidad para reconocer la AREG.

Para caracterizar desde el punto de vista funcional un Acm anti-AREG seleccionado, se analizó su especificidad mediante el uso de un inmunoensayo enzimático (ELISA) cubierto con diferentes ligandos. Además, el Acm anti-AREG podía inmunoprecipitar una preparación comercial de AREG e inhibir específicamente la fosforilación del EGFR inducida por AREG. La afinidad del AR30 por diferentes ligandos se valoró por resonancia de plasmón superficial (RPS).

Modelos de ratón con alotrasplante

Todos los procedimientos con animales fueron autorizados por el comité de revisión del Instituto Weizmann de Ciencias. Las ratonas atímicas NCr (de 6 semanas de edad) se inocularon por vía subcutánea con 2×10^6 células MLS de cáncer de ovario de humano. Una vez que se podía palpar el tumor (al cabo de 5 a 7 días), las ratonas se distribuyeron al azar en grupos y se les inyectó por vía intraperitoneal en los puntos de tiempo indicados los anticuerpos monoclonales, la quimioterapia o la politerapia que se han indicado. El volumen de los tumores se vigiló dos veces a la semana y se les midió la masa corporal una vez a la semana.

Clonación y expresión en las bacterias del dominio de tipo EGF que tiene la anfirregulina (AREG)

Se clonó el dominio de tipo EGF de la AREG (SEQ ID n.º 91) en el vector pET32b y se expresó como proteína de fusión con tiorredoxina (TRX) en el extremo carboxilo con un sitio de escisión del factor Xa flanqueando el resto

del extremo amino del dominio de tipo EGF [como previamente estaba descrito en Lindzen M. et al. (2010), véase más arriba]. Las proteínas de fusión se expresaron en *Escherichia coli* (BL21) mediante los procedimientos estándares. Después del tratamiento con ultrasonidos, los extractos eliminados se transfirieron a perlas de NiNTA equilibradas previamente. Se lavaron las perlas y las proteínas fijadas se eluyeron con imidazol a 300 mM. La construcción de las proteínas de fusión que comprenden un motivo GPI se realizó en dos etapas. La primera reacción de PCR se realizó sobre la señal de GPI de la contactina-1 de rata. El cebador en 5' introdujo un sitio de escisión de NsiI, al que le seguía una etiqueta HA, y el cebador en 3' introdujo un sitio de NotI. Se clonó el producto en el vector pIRES-Hyg con el uso de las enzimas de restricción NsiI y NotI. La segunda etapa empleó la PCR solapante. La primera reacción utilizó el péptido señal de HER2 como molde y un cebador en 3' que incluía la secuencia en 5' del dominio de tipo EGF correspondiente. La segunda reacción de PCR utilizó el dominio de tipo EGF correspondiente como molde y un cebador en 5' que incluía el extremo en 3' del péptido señal de HER2. El producto de cada una de las reacciones sirvió de molde para otra reacción de PCR. El producto final de la PCR se clonó en el pIRES-Hyg-GPI, con el uso de los sitios de corte de BamHI y NsiI. Para establecer los clones de las células CHO, los correspondientes pIRES-Hyg se transfectaron con Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se seleccionaron los clones con higromicina (2 µg/ml).

Generación de anticuerpos en los ratones genosuprimidos y pruebas de especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-AREG

A 5 ratones AREG^{-/-} (3 meses de edad) se les inyectaron por vía subcutánea en la almohadilla de la pata 30 µg de la proteína AREG en el adyuvante completo de Freund (Tifco, Detroit, Michigan). Tres semanas después, se realizó una segunda inyección en el adyuvante incompleto de Freund. A esta inyección le siguieron de 3 a 5 inyecciones a intervalos de 3 semanas. Un mes después de la última estimulación, los dos ratones con la titulación más alta recibieron dos inyecciones más en dos días consecutivos. Cuatro días después de la última estimulación, las células de cada bazo se fusionaron con 20×10^6 células de la línea de mieloma NS0/1, tal y como se describió anteriormente [Eshhar Z. et al. (1980) *J Immunol.* 124, 775-780]. Después de la fusión, las células se distribuyeron en placas de 96 pocillos a una concentración de 2×10^4 células viables de mieloma por pocillo. Las células híbridas se seleccionaron por el crecimiento en presencia de HAT. Los cultivos de híbridos positivos se desacostumbraron gradualmente de la HAT, se clonaron y se volvieron a clonar por dilución límite.

Ejemplo 1

La anfirregulina y otros ligandos de la familia del EGF son detectables en los líquidos de pacientes con cáncer, así como en los medios acondicionados por las células cancerosas

Debido a las funciones establecidas para una serie de factores de crecimiento en la progresión del cáncer, se utilizó un ELISA para determinar el repertorio de ligandos de tipo EGF presentes en los líquidos recogidos de pacientes con cáncer de ovario y de pulmón en estadio avanzado. El líquido ascítico que se recogió de 43 pacientes con cáncer de ovario que ya habían sido tratadas con quimioterapia identificó que la AREG era uno de los dos factores que se secretaban con más frecuencia (figura 1A y tabla 1): 37 de las 43 pacientes (86 %) expresaban la AREG y su cantidad mostraba una amplia variación (de 10 a 1800 pg/ml). El análisis por ELISA identificó de igual manera el TGF-α en las muestras de líquido analizadas, pero HB-EGF (60 %), EGF (44 %), NRG1 (21 %) y BTC (6,9 %) no solo se detectaron en menos pacientes, sino que su cantidad raramente superaba los 200 pg/ml. Se observó un patrón algo parecido en los medios acondicionados por 13 líneas celulares de cáncer de ovario (figura 1C): se detectaban AREG (92 % de las líneas celulares analizadas), TGF-α, HB-EGF (54 %) y NRG1, aunque el último se observó en solo una de las líneas celulares. En especial, el EGF era indetectable en los medios acondicionados, pero se detectó en el 44 % del líquido de las pacientes, lo que incrementa la posibilidad de que su origen no sea tumoral. De igual modo, no se detectó BTC en ninguna de las líneas celulares de cáncer de ovario, pero muy pocos líquidos ascíticos de los pacientes contenían este factor de crecimiento.

Tabla 1: Determinación de los ligandos de tipo EGF en el líquido ascítico de 43 pacientes con cáncer de ovario. Los ligandos se cuantificaron con el kit de ELISA DuoSet (R&D Systems). La concentración de ligando se indica en pg/ml $\pm$ desviación estándar.

Ligandos (pg/ml)						
Paciente	AREG	BTC	EGF	HB-EGF	NRG- β 1	TGF- α
1	1 858 $\pm$ 0,0	-	13,6 $\pm$ 0,0	34,1 $\pm$ 2,4	-	12,3 $\pm$ 1,4
2	1 433,9 $\pm$ 24,8	-	-	80,2 $\pm$ 2,8	-	11,4 $\pm$ 2,5
3	1 373,6 $\pm$ 0,1	-	66,7 $\pm$ 0,0	330,8 $\pm$ 22,8	192,5 $\pm$ 63,6	64,0 $\pm$ 3,1
4	760,5 $\pm$ 0,0	-	-	3,6 $\pm$ 0,0	-	5,9 $\pm$ 0,0
5	634,8 $\pm$ 0,0	-	-	-	-	2,8 $\pm$ 0,0
6	529,8 $\pm$ 0,0	133,4 $\pm$ 6,4	190,9 $\pm$ 0,0	1 116,3 $\pm$ 2,3	232,5 $\pm$ 35,4	174,8 $\pm$ 1,9
7	379,9 $\pm$ 106,4	-	8,0 $\pm$ 0,0	104,1 $\pm$ 0,8	-	46,6 $\pm$ 4,2
8	307,4 $\pm$ 106,5	177,5 $\pm$ 30,1	60,4 $\pm$ 0,0	320,4 $\pm$ 114,2	-	95,3 $\pm$ 17,6
9	298,4 $\pm$ 0,0	-	-	-	-	9,6 $\pm$ 0,0
10	251,2 $\pm$ 0,0	-	-	-	-	-
11	208,0 $\pm$ 26,0	-	-	-	-	-
12	185,9 $\pm$ 3,3	-	-	-	-	4,3 $\pm$ 0,0
13	182,7 $\pm$ 46,0	-	198,8 $\pm$ 0,0	329,8 $\pm$ 1,8	.	49,2 $\pm$ 12,4
14	105,5 $\pm$ 3,5	-	-	264,3 $\pm$ 25,1	-	62,9 $\pm$ 9,6
15	102,9 $\pm$ 27,3	-	-	105,5 $\pm$ 1,6	-	27,5 $\pm$ 2,0
16	83,9 $\pm$ 9,7	-	-	15,2 $\pm$ 6,7	-	3,1 $\pm$ 0,0
17	79,8 $\pm$ 0,0	73,4 $\pm$ 5,7	20,1 $\pm$ 0,0	306,9 $\pm$ 3,1	222,5 $\pm$ 21,2	78,9 $\pm$ 7,6
18	53,2 $\pm$ 0,5	-	-	84,9 $\pm$ 3,9	-	32,7 $\pm$ 0,8
19	52,6 $\pm$ 0,0	-	15,7 $\pm$ 0,0	5,2 $\pm$ 0,0	242,5 $\pm$ 63,6	9,0 $\pm$ 1,9
20	52,5 $\pm$ 1,4	-	-	-	-	8,6 $\pm$ 0,0
21	45,5 $\pm$ 0,0	-	-	-	182,5 $\pm$ 21,2	-
22	44,6 $\pm$ 0,0	-	-	12,4 $\pm$ 5,5	-	6,2 $\pm$ 0,0
23	39,7 $\pm$ 0,0	-	9,3 $\pm$ 0,0	5,8 $\pm$ 0,0	-	4,7 $\pm$ 0,0
24	38,9 $\pm$ 0,0	-	10,4 $\pm$ 0,0	-	-	3,4 $\pm$ 0,0

25	35,8 ± 0,0	-	-	-	-	4,5 ± 0,0
26	30,8 ± 0,0	-	-	-	-	-
27	29,9 ± 0,0	-	12,2 ± 0,0	-	232,5 ± 91,9	2,3 ± 0,0
28	28,2 ± 0,1	-	-	93,0 ± 8,6	247,5 ± 0,0	27,9 ± 2,7
29	26,4 ± 0,0	-	10,7 ± 0,0	94,1 ± 3,9	-	18,0 ± 0,4
30	22,0 ± 0,0	-	8,0 ± 0,0	191,3 ± 0,0	-	42,5 ± 6,8
31	21,4 ± 0,1	-	9,6 ± 0,0	-	-	3,6 ± 0,0
32	20,8 ± 0,0	-	8,8 ± 0,0	14,7 ± 0,0	-	9,0 ± 0,0
33	20,2 ± 0,0	-	19,3 ± 0,0	25,2 ± 0,0	-	9,2 ± 0,0
34	16,2 ± 0,0	-	11,2 ± 0,0	66,3 ± 2,4	157,5 ± 42,4	16,6 ± 0,2
35	15,6 ± 0,0	-	-	-	-	5,7 ± 0,0
36	11,9 ± 0,0	-	-	11,3 ± 0,0	-	7,4 ± 0,0
37	9,7 ± 0,0	-	13,8 ± 0,0	-	-	6,1 ± 0,0
38	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	2,3 ± 0,0
40	-	-	-	-	-	3,7 ± 0,0
41	-	-	7,5 ± 0,0	4,1 ± 0,0	-	4,5 ± 0,0
42	-	-	-	235,8 ± 15,7	282,5 ± 49,5	55,1 ± 0,9
43	-	-	-	116,3 ± 2,4	-	28,7 ± 1,9

Se realizó un análisis paralelo con los derrames pleurales de pacientes con cáncer de pulmón (figura 1B y tabla 2). De manera semejante a los líquidos de las pacientes con cáncer de ovario, el principal factor de crecimiento detectado en los derrames pleurales de los pacientes con cáncer de pulmón fue la AREG; 16 de las 18 muestras contenían concentraciones relativamente altas de este factor de crecimiento. Además, al igual que la recogida de líquido ascítico de las pacientes con cáncer de ovario, aproximadamente el 50 % de los líquidos de cáncer de pulmón contenían el TGF- α y el HB-EGF. El análisis de los medios acondicionados de 7 líneas celulares de cáncer de pulmón identificó que la AREG era un rasgo común y casi exclusivo (figura 1D); no era detectable ningún otro ligando, con la excepción de HB-EGF (en las células H522). En conjunto, estos resultados proponen que la AREG autoproducida es el factor de crecimiento de tipo EGF más prevalente de los cánceres de ovario y de pulmón.

Tabla 2: Determinación de los ligandos de tipo EGF en las muestras de líquido de derrame pleural de 18 pacientes con cáncer de pulmón. Los ligandos se cuantificaron mediante el kit de ELISA DuoSet (R&D Systems). La concentración de los ligandos se indica en pg/ml $\pm$ desviación estándar.

Ligandos (pg/ml)						
Paciente	AREG	BTC	EGF	HB-EGF	NRG- β 1	TGF- α

ES 2 759 329 T3

1	631,0 ± 73,0	-	-	-	-	-
2	413,0 ± 42,0	-	13,8 ± 2,4	-	-	-
3	349,0 ± 19,0	-	-	78,3 ± 9,4	-	39,0 ± 1,7
4	291,0 ± 36,0	-	15,0 ± 0,6	98,0 ± 14,1	-	72,0 ± 8,3
5	287,4 ± 17,5	-	-	-	-	1,7 ± 0,0
6	285,0 ± 76,0	-	-	80,0 ± 7,1	-	67,0 ± 6,2
7	259,0 ± 52	-	-	-	-	-
8	236,0 ± 73	-	-	-	-	-
9	210,5 ± 6,4	-	-	-	-	20,9 ± 0,8
10	209,0 ± 2,8	-	-	167,0 ± 21,2	-	64,4 ± 3,3
11	190,0 ± 43,8	-	-	-	-	-
12	138,0 ± 12,0	-	-	-	-	-
13	109,0 ± 21,1	-	-	167,0 ± 11,8	-	191,0 ± 8,7
14	52,5 ± 25,5	-	-	-	-	-
15	46,5 ± 14	-	-	-	-	-
16	28,6 ± 7,1	-	-	50,0 ± 1,9	-	11,8 ± 6,3
17	12,9 ± 0,0	-	-	115,8 ± 3,1	-	25,5 ± 0,0
18	-	-	12,8 ± 0,0	49,7 ± 5,5	-	35,3 ± 2,1

Ejemplo 2

La AREG desaparece de manera ineficaz y provoca mucho menos descenso del receptor que el EGF o el TGF- α

- 5 La amplia distribución observada de la AREG y su elevada concentración en los líquidos de los pacientes incrementó la posibilidad de que este factor confiriera una ventaja selectiva, que puede no ser compartida por los otros siete ligandos de tipo EGF. Por lo tanto, la actividad biológica de la AREG se comparó con la de los miembros de la familia que mejor se conocen. Es notable que George Todaro y colaboradores, que descubrieron la AREG en 1989, describieran que se fijaba al EGFR, pero no lo hacía con tanta avidéz como el EGF, aunque, sin embargo,
- 10 suplantaba por completo el requisito de EGF o TGF- α para el crecimiento de los queratinocitos [Shoyab M et al (1989) *Science* 243, 1074-1076]. Estas primeras observaciones podrían estar relacionadas con la duración de la señalización inducible del EGFR, lo que está correlacionado directamente con la afinidad de fijación y el destino intracelular del EGFR fijado a la membrana: según la identidad del ligando, los EGFR ocupados se someterán a la degradación o bien se reciclarán de vuelta a la membrana plasmática, listos para la reactivación. Para tratar específicamente las relaciones entre la afinidad de fijación y la endocitosis del receptor, se utilizó la línea celular de cáncer de ovario MCAS. Tal y como se esperaba, el desplazamiento de un EGF radiomarcado por la AREG indicaba una afinidad de fijación más baja de aproximadamente 100 veces, en comparación con el EGF (figura 2A). Esta diferencia se observaba también en las células de mamífero inmortalizadas MCF10A (figura 2G), lo que sugiere la independencia del contexto celular. En línea con una afinidad relativamente baja, sólo se observaba un escaso efecto de la AREG sobre el descenso del EGFR mediado por la endocitosis, en comparación con unas
- 20 concentraciones similares o más bajas del EGF y del TGF- α (figura 2B): mientras que el EGF (10 ng/ml) inducía

aproximadamente el descenso del 80 % y el TGF- α (10 ng/ml) conseguía una reducción del 70 al 75 %, la AREG (50 ng/ml) inducía un descenso del receptor de tan solo aproximadamente el 30 %. De igual forma, mediante el uso de las células MCF10A y concentraciones equimolares de EGF, TGF- α y AREG, o bien una concentración 100 veces más alta del último ligando (figura 2H), se observó un descenso eficaz del EGFR solo cuando se analizaron concentraciones muy altas de la AREG. Estas observaciones están en consonancia con la menor afinidad aparente de la AREG, en comparación con EGF y TGF- α , por lo que se propuso que las concentraciones relativamente altas de AREG que se observaban en los líquidos de los pacientes se debían, en parte, a la retirada ineficaz de este ligando por medio de la endocitosis mediada por el receptor.

Ejemplo 3

La AREG induce una ubiquitinación relativamente escasa del EGFR

Las primeras observaciones demostraron que las señales del EGFR sufren una desensibilización rápida mediante la endocitosis, seguida de la degradación en los lisosomas [Carpenter, G y Cohen, S. (1976) *The Journal of Cell Biology* 71, 159-171] y los estudios posteriores relacionaron este proceso a la ubiquitinación del receptor [Levkowitz, G et al. (1999) *Molecular Cell* 4, 1029-1040]. Así pues, se comparó la capacidad que tienen EGF, TGF- α y AREG para inducir la ubiquitinación del EGFR en las células del cáncer de ovario de humano (MCAS y MLS), así como en las células del cáncer de pulmón (H358 y A549; figuras 2C-F). Con este fin, las células se incubaron durante 10 minutos con el correspondiente factor de crecimiento y, posteriormente, la ubiquitinación del EGFR se ensayó con los anticuerpos antiubiquitina. Aunque el EGF y el TGF- α eran ambos capaces de inducir una ubiquitinación importante e iniciar la degradación del receptor, las concentraciones similares de AREG no lo conseguían, en consonancia con los resultados anteriores que examinaban otros tipos de células [véase, p. ej., Baldys A. et al. (2009) *Biochemistry* 48, 1462-1473]. Es interesante que una concentración diez veces más alta de AREG fuera capaz de inducir niveles comparables de ubiquitinación del receptor que el EGF y el TGF- α , lo que sugiere que este efecto se debía a la afinidad de fijación más baja de AREG. Cabe destacar que se observó el mismo fenómeno en las líneas celulares de cáncer de ovario, así como de pulmón, lo que confirmaba un mecanismo general, y su independencia con respecto al tipo celular. En conclusión, a diferencia de otros ligandos del EGFR, la AREG podría hacer que el receptor eluda la ubiquitinación y que disminuya la desensibilización de la señal, lo que podría explicar el motivo por el que los tumores de ovario y de pulmón avanzados secretan con frecuencia este factor.

Ejemplo 4

La inducción de los programas de expresión génica requiere concentraciones relativamente altas de la AREG

La activación del EGFR y los acontecimientos citoplasmáticos que provoca posteriormente se traducen en la inducción de programas de expresión génica complejos que, entre otras funciones, impulsan los bucles regulatorios de retroalimentación positiva y negativa. Ya que los informes anteriores no han tratado la relación entre la concentración de la AREG y la inducción de los programas de expresión génica, se aplicaron concentraciones altas y bajas (10 y 100 ng/ml) del factor de crecimiento y se utilizó la qPCR para analizar diferentes componentes de los bucles regulatorios de retroalimentación positiva (es decir, los primeros ligandos que se inducen por el EGFR, es decir, EREG, TGF- α y HB-EGF) y negativa. Los últimos comprendían MIG6/RALT, un inhibidor inducible del EGFR, junto con dos miembros de las fosfatasa de especificidad dual del grupo DUSP/MKP. En consonancia con la baja afinidad y la poca actividad, la concentración más baja de la AREG indujo señales a penas detectables, pero la concentración 10 veces más alta dio lugar a una clara transcripción dependiente del tiempo de los seis genes analizados (figuras 3A-F). Es interesante que el efecto del EGF fuera incluso más alto y con ambos ligandos se observó un patrón oscilatorio en varios transcritos. En conclusión, a semejanza del EGF, la AREG es capaz de instigar los programas de expresión génica que provocan desenlaces biológicos. No obstante, esto requiere unas concentraciones relativamente altas del factor de crecimiento.

Ejemplo 5

El silenciamiento de la AREG en las células de cáncer de ovario de humano inhibe su crecimiento oncogénico en los animales

Para examinar la predicción de que la secreción de la AREG contribuye a la virulencia oncogénica del cáncer de ovario, se puso en marcha un sistema celular modelo que consistía en la línea celular del cáncer OVCAR5 que secretaba cantidades relativamente grandes de la AREG (véase la figura 1C). Las células se transdujeron con vectores víricos que codificaban un ARN pequeño ahorquillado desorganizado (shControl) o un shRNA específico del AREG (shAREG). Los análisis de la cantidad de ARNm (por qPCR) y de la secreción de la proteína (mediante ELISA) confirmaron la reducción eficaz de la expresión de la AREG mediante el ARN ahorquillado específico (figura 4A). Cuando se cultivaban, las correspondientes líneas celulares mostraban diferencias notables en su ritmo de proliferación (figura 4B). Así pues, en la siguiente etapa, las dos sublíneas derivadas se inocularon en el costado de los animales inmunocomprometidos (atímicos Balb/c; 10 ratones por grupo) y se vigiló el crecimiento tumoral durante un periodo de 4 semanas. Tal y como se muestra en la figura 4C, las células que expresaban el shAREG formaban tumores significativamente más pequeños que las células de control ($p < 0,005$), conforme a sus tasas de crecimiento *in vitro*. En conclusión, y en consonancia con los datos *in vitro*, la secreción de la AREG podría

desempeñar una función importante en el crecimiento de los tumores de ovario, al menos en un sistema de animal modelo.

Ejemplo 6

La expresión de la AREG se incrementa después del tratamiento de las células de cáncer de ovario con un antineoplásico.

Los antitumorales a base de platino han sido la piedra angular de la quimioterapia del cáncer de ovario durante las últimas tres décadas, pero diferentes mecanismos de resistencia, que incluyen defectos en el transporte de los fármacos, limitan la eficacia terapéutica. En este contexto, es interesante observar que un estudio anterior encontró que la resistencia de las células de cáncer de mama MCF7 al cisplatino venía acompañada tanto de una inactivación de la vía de p53 como de un aumento selectivo de la expresión de la AREG [Eckstein N. et al. (2008) *The Journal of Biological Chemistry* 283, 739-750]. Ya que la mayoría de los líquidos corporales que se analizaron procedían de pacientes tratados con quimioterapia, se evaluó la posibilidad de que la enorme secreción de AREG desde las células de cáncer de ovario y de pulmón se pudiera atribuir a una exposición del paciente a los antineoplásicos, tal como el cisplatino. Así pues, se introdujo una construcción de ADN con la luciferasa a modo de indicador que contenía la región promotora de AREG tanto en las células de cáncer de ovario MLS como en las células de cáncer de pulmón A549. Tras el tratamiento de las células con concentraciones crecientes de cisplatino, se observó un incremento de 2 veces y de 1,5 veces de la actividad del indicador en las células de ovario y de pulmón, respectivamente (figuras 5A y 5B). En un experimento similar que utilizó de indicador la luciferasa que corresponde al TGF- α (o GAPDH, como control) y células MLS no se detectaron cambios coherentes inducidos por el cisplatino en la inducción del TGF- α (figuras 5C-D). En las figuras 5E-F se presenta otro conjunto de resultados adicional que apoya la especificidad del efecto del cisplatino en el promotor de AREG: La exposición de las células de cáncer de ovario, así como las de pulmón, al antineoplásico vino seguida de un incremento de la secreción de la AREG, y no de EGF, TGF- α o HB-EGF al medio. En conjunto estos resultados proponen que la formación de aductos de ADN, en respuesta al tratamiento con genotóxicos, podría incrementar específicamente la expresión y la secreción de la AREG desde las células de cáncer de ovario y de pulmón.

Ejemplo 7

Un anticuerpo monoclonal específico contra la AREG inhibe los alotrasplantes de tumor de ovario en los animales y los sensibiliza para un antineoplásico

Los fármacos que actúan selectivamente sobre el EGFR o la proteína homóloga ERBB2/HER2 ya se utilizan en la clínica para tratar el cáncer de mama, de pulmón, de estómago, de páncreas, colorrectal y de cabeza y cuello [Yarden, Y. y Pines, G. (2012) *Nature Reviews Cancer* 12, 553-563]. En el cáncer de ovario, se ha propuesto que el EGFR es una posible diana farmacológica, pero los antagonistas del EGFR hasta la actualidad solo han mostrado escasos beneficios clínicos [Murphy M. y Stordal, B. (2011) *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 14, 177-190]. Sin embargo, se ha relacionado la expresión aberrante del EGFR con un mal desenlace de las pacientes con cáncer de ovario, lo que hace surgir la posibilidad de que pudiera ser eficaz la actuación selectiva sobre otros ligandos del EGFR. Con el objeto de comprobar esta predicción, se empleó una estrategia descrita anteriormente para generar anticuerpos monoclonales [Lindzen M. et al., (2010), véase más arriba], lo que generó un anticuerpo denominado AR30 que actuaba selectivamente sobre la AREG de humano. Mediante la resonancia de plasmón y la inmunotransferencia, se confirmó la fijación de alta afinidad de AR30 por la AREG de humano (tabla 3 y figura 6D). Es interesante que AR30 no reconociera ningún otro ligando del EGFR, excepto la forma humana de HB-EGF. En especial, se ha descrito anteriormente que un anticuerpo anti-HB-EGF puede fijarse a la AREG [Sato S. et al. (2012) *PloS One* 7, e51964], lo que apunta a que los dos factores de crecimiento comparten determinantes estructurales.

Tabla 3: Afinidad de fijación del Acm AR30 por los ligandos indicados de la familia del EGF. Las soluciones que contienen concentraciones crecientes de diferentes ligandos (de 1 a 20 000 nM) se pasaron sobre superficies revestidas con AR30, un Acm anti-AREG, para deducir las constantes de disociación indicadas mediante el uso de mediciones de resonancia de plasmón.

LIGANDO	Kd (nM)
hAREG	1,7
hHB-EGF	80
hTGF- α	>10 000
hEGF	>10 000

hBTC	>10 000
hNRG1	>10 000
hEPG	>10 000
mAREG	>10 000
mHB-EGF	6 650

A continuación, se analizaron la capacidad que tiene AR30 para interceptar la fosforilación del EGFR inducida por la AREG y la activación de las señales posteriores. Con este fin, se analizó la capacidad que tienen las concentraciones crecientes de AREG para aumentar la autofosforilación de la tirosina del EGFR, y se observó un patrón de respuesta a la dosis coherente que, como se esperaba, no alcanzaba la fuerte señal desencadenada por el EGF (no se muestran los datos). Es importante señalar que AR30 solo redujera parcialmente el efecto de la AREG sobre la fosforilación del receptor, y que esto era independiente de la concentración tanto de AREG como de AR30 (figuras 6E-F). En consecuencia, el efecto inhibitorio parcial de AR30 era insuficiente para bloquear la señalización posterior hasta ERK, tal y como se reveló con el uso de un anticuerpo específico contra la forma fosforilada (activa) de ERK (no se muestran los datos).

La inhibición parcial observada de la fosforilación del EGFR debida al AR30 motivó una investigación dirigida al impacto sobre el crecimiento tumorigénico de las células de ovario que secretan la AREG. En la primera tanda de experimentos, se compararon los efectos antitumorales del AR30 y el cetuximab, un anticuerpo anti-EGFR autorizado para el uso clínico. Se inocularon las células MLS por vía subcutánea en los costados de ratonas atímicas y, una vez que se podían palpar los tumores, las ratonas se aleatorizaron en grupos de 9 a 11 animales. Después, se les inyectaron los anticuerpos en el peritoneo y se vigiló el crecimiento tumoral durante un periodo de seis semanas (no se muestran los datos). Ambos anticuerpos inhibieron parcialmente el crecimiento tumoral y el AR30 era al menos tan eficaz como el cetuximab. La siguiente tanda de pruebas con animales suponía que la inducción de la secreción de AREG inducida por la quimioterapia (véanse las figuras 5A-F) concordaba con el crecimiento tumoral con un tratamiento a base de platino. Así pues, se evaluó en las ratonas portadoras de tumores MLS una combinación de cisplatino y el anticuerpo anti-AREG, AR30. Después de la aleatorización, las ratonas se trataron con o sin AR30, junto con el cisplatino (5 mg/kg de masa corporal). Los resultados presentados en la figura 7B demuestran que, como agentes únicos, tanto el cisplatino como el anticuerpo AR30 solo inhibían levemente los tumores MLS en las condiciones seleccionadas. No obstante, la combinación de cisplatino y AR30 casi inhibió por completo el crecimiento tumoral (figuras 7B y 7C).

En resumen, mediante el uso de líquido ascítico y derrame pleural se detectaron concentraciones relativamente altas de AREG en la mayoría de pacientes con cáncer de ovario y de pulmón avanzado. Los estudios *in vitro* proponen que la gran abundancia de la AREG en las muestras clínicas podría ser el reflejo dos procesos: primero, la inducción de la transcripción de la AREG después del tratamiento del paciente con genotóxicos y, segundo, la eliminación ineficaz de la AREG por medio de la endocitosis del receptor. Supuestamente, la gran abundancia de AREG con respecto a otros ligandos de la familia del EGF compensa las interacciones de baja afinidad de este factor de crecimiento con el EGFR. En consonancia, los presentes inventores demuestran que se necesitan concentraciones altas de AREG para reforzar la fosforilación de la tirosina y la inducción de los programas de expresión génica. En línea con las funciones críticas que tienen en la progresión del cáncer de ovario, la interceptación de la AREG mediante un anticuerpo anti-AREG recién generado (denominado AR30) sensibilizó enormemente las células del cáncer de ovario a un antineoplásico. Estas observaciones podrían abrir el camino al ensayo clínico de la versión humanizada de AR30.

Ejemplo 8

Se generaron anticuerpos monoclonales y policlonales específicos contra la AREG en los ratones con genosupresión de AREG

Se generaron anticuerpos anti-AREG monoclonales y policlonales en los ratones con genosupresión de la AREG. En la figura 8 se presentan los resultados obtenidos cuando se analizaron los anticuerpos monoclonales, así como los policlonales con la AREG de humano. Se seleccionaron los Acm AR37 y AR558 para analizarlos con más detalle. En la figura 9A se presentan los resultados obtenidos cuando se utilizó la AREG murina en la prueba de ELISA. Tal y como se puede observar, el Acm AR37 reconoció la molécula murina mejor que los otros dos Acm analizados.

En la figura 9B se presentan los resultados adicionales obtenidos cuando se analizan los anticuerpos policlonales

y los monoclonales AR37, AR65, AR324, AR558 con la AREG de humano. En la figura 9C se presentan los resultados obtenidos cuando se utilizó la AREG murina en la prueba de ELISA. Tal y como se puede observar, el Acm AR37 reconoció la molécula murina.

Ejemplo 9

5 Análisis *in vitro* de los anticuerpos monoclonales anti-AREG seleccionados

Después de la producción y purificación a gran escala de anticuerpos, los Acm AR30, AR37 y AR558 se aplicaron en los ensayos *in vitro*. Los resultados presentados en la figura 10A ilustran que una concentración baja de los anticuerpos era suficiente para bloquear la fosforilación del EGFR inducida por la AREG en células HeLa vivas. Además, se examinó el determinante antigénico que reconocen selectivamente los dos Acm y en comparación con el anticuerpo AR30 descrito anteriormente (no se muestran los datos). Los resultados obtenidos indicaban que cada uno de los tres anticuerpos se encaja en un determinante diferente de la AREG de humano. Después, la capacidad que tienen los anticuerpos para inhibir la proliferación de las células de mamífero MCF10A se analizó en ausencia o presencia de la AREG. Los resultados se presentan en la figura 10B. Se observó una inhibición moderada a concentraciones relativamente altas de cada uno de los tres Acm examinados.

15 Ejemplo 10

Análisis *in vivo* de los anticuerpos monoclonales anti-AREG seleccionados

Para analizar la capacidad que tienen los anticuerpos anti-AREG para reducir el crecimiento de las células tumorales humanas implantadas en los ratones inmunocomprometidos, se utilizaron las células tumorales Cal27, que se inocularon por vía subcutánea y se distribuyeron al azar para el tratamiento después de que los tumores se volvieran palpables. Los resultados presentados en la figura 11 demuestran que los nuevos Acm A30 y AR37 inhiben de modo similar el crecimiento tumoral, mientras que el AR558 superaba la actividad de cualquiera de los anticuerpos. Además, los estudios que analizan parejas de dos Acm ilustran la mejora de su actividad antitumoral (no se muestran los datos), lo que se puede atribuir al hecho de que los Acm se fijan a diferentes determinantes antigénicos de la anfirregulina.

25 Análisis adicionales

Aunque las células normales a menudo envían señales a las células circundantes, y estas últimas les responden con el suministro de diferentes factores de crecimiento, un distintivo compartido por las células cancerosas de diferentes tejidos de origen es su capacidad para sostener de manera autónoma la señalización proliferativa por una serie de vías alternativas: pueden sobreexpresar un receptor para un factor de crecimiento o presentar una mutación activadora en el receptor o en las etapas posteriores de las vías de señalización. Como alternativa, pueden producir ligandos de tipo factor de crecimiento a los que se puede responder mediante la expresión de receptores relacionados, lo que da lugar a una estimulación proliferativa autocrina. El EGFR ejemplifica bien este atributo de células transformadas: por otra parte, la morfogénesis canalicular de la glándula mamaria está regulada por un mecanismo paracrina que implica la emisión de AREG desde las células epiteliales y la posterior estimulación del EGFR de las células del estroma. Por otra parte, la coexpresión del EGFR y la AREG es característico de una amplia gama de carcinomas y tumores de piel. Esto se extiende a otros ligandos diferentes, que se coexpresan con el EGFR en una serie de tumores.

Desde hace casi diez años, la interceptación de la señalización del EGFR con inhibidores de cinasas o Acm se ha convertido en un protocolo clínico básico, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer de pulmón y del colorrectal, respectivamente. Sin embargo, las respuestas más bien débiles que se limitan a pequeños grupos de pacientes junto con la aparición temprana de la resistencia a los fármacos limitan las aplicaciones clínicas en la actualidad. No obstante, están en desarrollo varias estrategias más nuevas e incluyen aptámeros específicos y combinaciones de 2 o 3 anticuerpos, cada uno dirigido contra un epítipo diferente del receptor. La interceptación directa de los ligandos del EGFR representa otra estrategia que aún no ha recibido la autorización. Una proteína recombinante de fusión, que hace de cebo y que contiene porciones de EGFR y HER4, era capaz de inhibir los once ligandos de la familia del EGF, así como de inhibir varios aloinjertos tumorales [Lindzen M. et al. (2012) *Oncogene* 31, 3505-3515]. Para reducir la toxicidad, podría ser decisivo interceptar menos ligandos, dentro del contexto de los tumores específicos. Por ejemplo, los presentes inventores han demostrado anteriormente que la coinhibición de TGF- α y HB-EGF, con el uso de una mezcla de los Acm correspondientes, retrasó de manera eficaz el crecimiento oncogénico de varios aloinjertos tumorales [Lindzen M. et al. (2010), véase más arriba]. El conocimiento del repertorio de factores de crecimiento producidos por un tumor primario o secundario dado es un requisito previo y, así pues, se ofrece a tumores de muestras, p. ej., mediante biopsias líquidas, incluso en los que no resulta fácil tomarles imágenes ni localizarlos.

Los líquidos ascíticos y los derrames pleurales de los pacientes con cáncer están disponibles por norma, a menudo en volúmenes muy grandes. El denominador común de la mayoría de los 56 líquidos que se analizaron en la presente memoria (de pacientes con cáncer de ovario y de pulmón) han sido las concentraciones altas y la presencia casi ubicua de la AREG (figuras 1A-F). La expresión elevada de la AREG ya sirve de marcador de la

mejor respuesta de los pacientes con cáncer colorrectal a los Acm que actúan selectivamente sobre el EGFR. Del mismo modo, en los pacientes con cáncer de pulmón tratados con gefitinib o erlotinib, se asoció una AREG elevada a una enfermedad estable en vez de progresiva. Así pues, la AREG podría servir de predictor de la respuesta del paciente y, probablemente, también de diana para la politerapia, tal y como se elabora más adelante. La lógica que subyace en la aparición y la abundancia elevada habituales de la AREG en las biopsias líquidas se podría atribuir a varios aspectos de la biología de la AREG: la eliminación de la AREG de la circulación se podría retrasar por la fijación de los proteoglicanos de tipo sulfato de heparina, así como mediante una afinidad de fijación del EGFR relativamente baja por este ligando y su tendencia a incrementar el reciclaje del receptor en vez de la degradación del receptor (véanse las figuras 2A-H). El efecto de la eliminación lenta podría aumentarse por una mayor velocidad de síntesis de la AREG, sobre todo en los pacientes que se someten al tratamiento con fármacos citotóxicos o en los pacientes que presentan concentraciones altas de estrógenos: tanto los estrógenos como un antineoplásico, el cisplatino, refuerzan la expresión de la AREG. Además, varios atributos asociados a los tumores avanzados o con el tratamiento del cáncer se han relacionado con la inducción de la AREG. La lista incluye la inflamación crónica, concentración elevada del ácido lisofosfatídico (LPA) en el suero, pérdida del supresor tumoral BRCA1, expresión de una forma mutante de p53 y condiciones de hipoxia.

Las características biológicas y clínicas de la AREG, junto con la expresión frecuente en el líquido ascítico obtenido de las pacientes con cáncer de ovario avanzado tratado con quimioterapia, instó a los presentes inventores a generar un nuevo anticuerpo contra el factor humano y a ensayarlo en aloinjertos de células de cáncer de ovario. Cabe mencionar que se diagnostican sólo el 20 % de los cánceres de ovario mientras siguen limitados a los ovarios, y aunque al menos el 70 % de las pacientes inicialmente responderán a una politerapia que combina platino y taxanos, muchos desarrollarán resistencia y acabarán progresando. Es importante que, cuando se aplicó únicamente a los aloinjertos de ovario, el anticuerpo generado gracias a las presentes enseñanzas (AR30) indujo efectos tan solo moderados sobre el crecimiento tumoral, pero eran comparables o superiores al efecto de un anticuerpo autorizado para el bloqueo del EGFR en la práctica clínica. Aunque el efecto antitumoral parcial de AR30 se podría deber a una incapacidad para bloquear completamente la fosforilación del EGFR inducida por la AREG, la combinación con cisplatino inhibió de manera muy notable el crecimiento de los tumores de ovario en los animales. Esta observación plantea la posibilidad de que los anticuerpos anti-AREG, al igual que los anticuerpos anti-EGFR, podrían retrasar la aparición de la resistencia del paciente a la quimioterapia. Aunque esta predicción es un asunto a investigar en el futuro, merece la pena destacar que la expresión de la AREG se ha correlacionado no solo con la resistencia a los antineoplásicos convencionales, tales como la doxorubicina y el cisplatino, tanto en las células de cáncer de hígado como de mama [Chang C. J. et al. (2009) *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 66, 1755-1765]; de acuerdo con un estudio más reciente, la AREG está asociada también a una resistencia al tratamiento del carcinoma hepatocelular con sorafenib, un inhibidor de cinasas con varias dianas [Blivet-Van Eggelpoel M.-J. et al. (2012) *Journal of Hepatology* 57, 108-115]. Por lo tanto, el AR30 y las moléculas humanizadas derivadas pueden servir de tratamiento en los casos de tumores de ovario, de hígado y de otros orígenes que son resistentes al tratamiento y que expresan la AREG.

Listado de secuencias

<110> Yeda Research and Development Co. Ltd.
YARDEN, Yosef
CARVALHO, Silvia
LINDZEN, Moshit

<120> ANTICUERPOS CONTRA LA ANFIRREGULINA, COMPOSICIONES QUE LOS COMPRENDEN Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 65359

<150> IL 237852

<151> 19-03-2015

<160> 92

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 360

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia completa de codificación de nucleótidos de cadena pesada (IgG) de AR30

ES 2 759 329 T3

<400> 1
gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaggt caggggcctc agtcaagttg 60
tcctgcacag cttctggctt caacattaaa gactcctata tgcactgggt gaaacagagg 120
cctgaacagg gcctggagtg gattggatgg gttgatcctg ataatgggtga tactgaatat 180
gccccggagt tccagggcag ggccactctg actgcagaca cattctccag cacagcctac 240
ctgcagctca ccagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtaa tgccccatct 300
acctatggtc actacggttt tgcttactgg ggccaaggaa ctctggtcac tgtctctgca 360

5 <210> 2
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia completa de codificación de nucleótidos de cadena pesada (IgG) de AR30

<400> 2
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
15 Gly Trp Val Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Glu Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Phe Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Asn Ala Pro Ser Thr Tyr Gly His Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

20 <210> 3
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia de codificación de nucleótidos de CDR1 de cadena pesada de AR30

<400> 3
ggcttcaaca ttaaagactc ctat 24

30 <210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de AR30
 5 <400> 4
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser Tyr
 1 5
 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de CDR2 de cadena pesada de AR30
 15 <400> 5
 gttgatcctg ataatggtga tact 24
 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de AR30
 25 <400> 6
 Val Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr
 1 5
 <210> 7
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de CDR3 de cadena pesada de AR30
 35 <400> 7
 aatgccccat ctacctatgg tcactacggt ttgcttac 39
 40 <210> 8
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de AR30
 50 <400> 8
 Asn Ala Pro Ser Thr Tyr Gly His Tyr Gly Phe Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 75
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM1 de cadena pesada de AR30
 60 <400> 9

gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaggt caggggcctc agtcaagttg 60
 tcctgcacag cttct 75

5 <210> 10
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM1 de cadena pesada de AR30

<400> 10
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser
 20 25

15 <210> 11
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM2 de cadena pesada de AR30

25 <400> 11
 atgcactggg tgaacacag gcctgaacag ggcctggagt ggattgatg g 51

30 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM2 de cadena pesada de AR30

35 <400> 12
 Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10 15
 Trp

40 <210> 13
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM3 de cadena pesada de AR30

<400> 13

ES 2 759 329 T3

Gly Ala Ala Thr Ala Thr Gly Cys Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly Thr
1 5 10 15

Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Cys
20 25 30

Thr Cys Thr Gly Ala Cys Thr Gly Cys Ala Gly Ala Cys Ala Cys Ala
35 40 45

Thr Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr
50 55 60

Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Ala Cys Cys Ala Gly
65 70 75 80

Cys Cys Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys
85 90 95

Ala Cys Thr Gly Cys Cys Gly Thr Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr
100 105 110

Gly Thr

5 <210> 14
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM3 de cadena pesada de AR30

<400> 14
yagrattadt sstaytstd tavyyc 26

15 <210> 15
<211> 339
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia completa de codificación de nucleótidos de cadena ligera (kappa) de AR30

<400> 15
gatattgtga tgacccaggc tgcaccctct gtacctgtca ctctgggaga gtcagtatcc 60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctcctg catagtaatg gcaaagctta cttgtattgg 120
ttcctgcaga ggccgggcca gtctcctcag ctctaatat atcggatgtc caaccttgcc 180
tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggctcggaa ctgcttttac actgagaatc 240
agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgta tgcaacatct agaatatccg 300

25 ctcacgttcg gtgctggcac aaagctcgag ctaaaacgt 339

<210> 16
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia completa de codificación de nucleótidos de cadena ligera (kappa) de AR30

ES 2 759 329 T3

<400> 16

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 Lys Ala 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 Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

5 Arg

<210> 17

<211> 33

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de nucleótidos de CDR1 de cadena ligera de AR30

15 <400> 17

aagagtctcc tgcataagtaa tggcaaagct tac 33

<210> 18

<211> 11

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de AR30

25

<400> 18

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Lys Ala Tyr
1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia de codificación de nucleótidos de CDR2 de cadena ligera de AR30

<400> 19

cggatgtcc 9

40 <210> 20

<211> 3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de AR30

 <400> 20
 Arg Met Ser
 1

 10 <210> 21
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de CDR3 de cadena ligera de AR30

 <400> 21
 atgcaacatc tagaatatcc gctcacg 27
 20
 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de AR30

 <400> 22
 Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
 30 1 5

 <210> 23
 <211> 78
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM1 de cadena ligera de AR30

 40 <400> 23
 gatattgtga tgacccaggc tgcacctct gtacctgtca ctctggaga gtcagtatcc 60

 atctcctgca ggtctagt 78

 <210> 24
 <211> 26
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM1 de cadena ligera de AR30
 50
 <400> 24
 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
 20 25

 55 <210> 25
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 759 329 T3

<220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM2 de cadena ligera de AR30

5 <400> 25
 ttgtattggt tcctgcagag gccgggccag tctctcagc tctaatata t 51

<210> 26
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM2 de cadena ligera de AR30

15 <400> 26
 Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 1 5 10 15

Tyr

20 <210> 27
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM3 de cadena ligera de AR30

<400> 27
 aaccttgccct caggagtccc agacagggttc agtggcagtg ggtcgggaac tgcttttaca 60
 ctgagaatca gtagagtgga ggctgaggat gtgggtgttt attactgt 108

30 <210> 28
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM3 de cadena ligera de AR30

<400> 28
 Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
 35

40 <210> 29
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia completa de codificación de nucleótidos de cadena pesada (IgG) de AR558

50 <220>
 <221> característica_micelánea
 <222> (8)..(8)

<223> n e s a, c, g o t

<220>
 <221> característica_micelánea
 <222> (42)..(42)
 <223> n e s a, c, g o t

5

<400> 29
 caggtccngc tgcagcagtc tggggcagaa cttgtgaagc cnggggcctc agtcaagttg 60
 tcctgcacag cttctggctt caacattaaa gacacctata tgcactgggt gaaacagagg 120
 cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatcgtag tactaaatat 180
 gacccgaagt tccagggcaa ggccactata acagcagaca catcctccaa cacagccgac 240
 ctgcacctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tagactttat 300
 ggtgactccg tctggtactt cgatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctcctca 360
 gccaaaacg 369

10

<210> 30
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia completa de codificación de aminoácidos de cadena pesada de IgG de AR558

<400> 30
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

20

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Arg Ser Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Asp
 65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Gly Asp Ser Val Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 115 120

25

<210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 759 329 T3

<220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de CDR1 de cadena pesada de AR558
 <400> 31
 ggcttcaaca ttaaagacac ctat 24
 <210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de AR558
 <400> 32
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
 1 5
 <210> 33
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de CDR2 de cadena pesada de AR558
 <400> 33
 attgatcctg cgaatcgtag tact 24
 <210> 34
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de AR558
 <400> 34
 Ile Asp Pro Ala Asn Arg Ser Thr
 1 5
 <210> 35
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de CDR3 de cadena pesada de AR558
 <400> 35
 gctagacttt atgggtgactc cgtctggtac ttcgatgtc 39
 <210> 36
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de AR558
 <400> 36
 Ala Arg Leu Tyr Gly Asp Ser Val Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 <210> 37

ES 2 759 329 T3

<211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM1 de cadena pesada de AR558

<400> 37
 gaggtccagc tgcagcagtc tggggcagaa cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
 tcctgcacag cttct 75

10 <210> 38
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM1 de cadena pesada de AR558

<400> 38
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser
 20 25

20 <210> 39
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM2 de cadena pesada de AR558

30 <400> 39
 atgcactggg tgaacacag gcctgaacag ggcctggagt ggattggaag g 51

35 <210> 40
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM2 de cadena pesada de AR558

<400> 40
 Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10 15
 Arg

45 <210> 41
 <211> 114
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM3 de cadena pesada de AR558

<400> 41
 aaatattgacc cgaagttcca gggcaaggcc actataacag cagacacatc ctccaacaca 60
 gccgacctgc acctcagcag cctgacatct gaggacactg ccgtctatta ctgt 114

ES 2 759 329 T3

5 <210> 42
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM3 de cadena pesada de AR558

 10 <400> 42
 Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr
 1 5 10 15

 Ser Ser Asn Thr Ala Asp Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 20 25 30

 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35

 15 <210> 43
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM4 de cadena pesada de AR558

 20 <400> 43
 tggggcgag ggaccacggt caccgtctcc tcagccaaaa cg 42

 25 <210> 44
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM4 de cadena pesada de AR558

 30 <400> 44
 Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 1 5 10

 35 <210> 45
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Secuencia completa de codificación de nucleótidos de cadena ligera (kappa) de AR558

 <400> 45
 caaattgttc tctcccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca 60
 atgacttgca gggccggctc aagtgtaaat tacatacact ggtaccagca gaagccagga 120
 tcctcccca aacctggat ttatgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagcagagt ggaggctgaa 240
 gatgctgcc cttattactg ccagcagtg agtggttacc ccccatgct cacgttcggt 300
 gctggcaca agctcgagct aaaacgt 327

 45 <210> 46
 <211> 109

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia completa de codificación de aminoácidos de cadena ligera (kappa) de AR558

<400> 46
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Gly Ser Ser Val Asn Tyr Ile
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Pro Met
 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

10 <210> 47
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de CDR1 de cadena ligera de AR558

<400> 47
 tcaagtgtaa attac 15

20 <210> 48
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de AR558

<400> 48
 Ser Ser Val Asn Tyr
 1 5

30 <210> 49
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos CDR2 de cadena ligera de AR558

40 <400> 49
 gccacatcc 9

ES 2 759 329 T3

```

5      <210> 50
      <211> 3
      <212> PRT
      <213> Secuencia artificial

      <220>
      <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de AR558

10     <400> 50
      Ala Thr Ser
      1

      <210> 51
      <211> 33
15     <212> ADN
      <213> Secuencia artificial

      <220>
      <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de CDR3 de cadena ligera de AR558

20     <400> 51
      cagcagtggga gtggttacc cccatgctc acg 33

      <210> 52
      <211> 11
25     <212> PRT
      <213> Secuencia artificial

      <220>
      <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de AR558

30     <400> 52
      Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Pro Met Leu Thr
      1             5             10

35     <210> 53
      <211> 78
      <212> ADN
      <213> Secuencia artificial

40     <220>
      <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM1 de cadena ligera de AR558

      <400> 53
45     caaattgttc tctcccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca      60
      atgacttgca gggccggc      78

      <210> 54
      <211> 26
50     <212> PRT
      <213> Secuencia artificial

      <220>
      <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM1 de cadena ligera de AR558

55     <400> 54
      Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
      1             5             10             15

      Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Gly
      20             25

      <210> 55

```

<211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM2 de cadena ligera de AR558

<400> 55
 atacactggt accagcagaa gccaggatcc tcccccaaac cctggattta t 51

10

<210> 56
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM2 de cadena ligera de AR558

<400> 56
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile
 1 5 10 15

20

Tyr
 <210> 57
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM3 de cadena ligera de AR558

30

<400> 57
 aacctggctt ctggagtccc tgctcgcttc agtggcagtg ggtctgggac ctcttactct 60
 ctcaaatca gcagagtgga ggctgaagat gctgccactt attactgc 108

<210> 58
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM3 de cadena ligera de AR558

40

<400> 58
 Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala
 20 25 30
 Thr Tyr Tyr Cys
 35

45

<210> 59
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM4 de cadena ligera de AR558

ES 2 759 329 T3

<400> 59
ttcgggtgctg gcacaaagct cgagctaaaa cgt 33

5 <210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM4 de cadena ligera de AR558

<400> 60
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
1 5 10

15 <210> 61
<211> 351
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia de codificación completa de nucleótidos de cadena pesada (IgG) de AR37

<400> 61
gagggtgaagc tgggtggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactctggca tgtcttggtt tcgcctgact 120
ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtagtactta caccttctat 180
ccagacactg tgaaggggcg attcatcatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaataa gcagtcctgaa gtctgaggac acagccatat attactgtgt aagagaaata 300
tggcccgtct ggggcgagcagg gaccacgac accgtctcct cagccaaaac g 351

30 <210> 62
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> secuencia completa de codificación de aminoácidos de IgG de cadena pesada de AR37

<220>
<221> característica_micelánea
<222> (35)..(35)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

40 <220>
<221> característica_micelánea
<222> (73)..(73)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

45 <400> 62

ES 2 759 329 T3

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

Gly Met Xaa Trp Phe Arg Leu Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Glu Ile Trp Pro Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Ile Thr Val
100 105 110

Ser Ser Ala Lys Thr
115

<210> 63

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de nucleótidos de CDR1 de cadena pesada de AR37

<400> 63

ggattcactt tcagtaactc tggc 24

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de codificación de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de AR37

<400> 64

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ser Gly
1 5

<210> 65

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de nucleótidos de CDR2 de cadena pesada de AR37

<400> 65

attagtagtg gtagtactta cacc 24

<210> 66

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de codificación de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de AR37

5 <400> 66
Ile Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Thr
1 5

10 <210> 67
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Secuencia de codificación de nucleótidos de CDR3 de cadena pesada de AR37

<400> 67
gtaagagaaa tatggcccg c 21

20 <210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia de codificación de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de AR37

<400> 68
Val Arg Glu Ile Trp Pro Val
1 5

30 <210> 69
<211> 75
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM1 de cadena pesada de AR37

<400> 69
gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

40 tcctgtgcag cctct 75

<210> 70
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM1 de cadena pesada de AR37

50 <400> 70
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

55 <210> 71
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 759 329 T3

<220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM2 de cadena pesada de AR37

 <400> 71
 5 atgtcttggt ttcgctgac tccagacaag aggctggagt gggctgcaac c 51

 <210> 72
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM2 de cadena pesada de AR37

 15 <400> 72
 Met Ser Trp Phe Arg Leu Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10 15

 Thr

 <210> 73
 <211> 114
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM3 de cadena pesada de AR37

 25 <400> 73
 ttctatccag acactgtgaa ggggcgattc atcatctcca gagacaatgc caagaacacc 60

 ctgtacctgc aaatgagcag tctgaagtct gaggacacag ccatatatta ctgt 114

 <210> 74
 <211> 38
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM3 de cadena pesada de AR37

 <400> 74
 Phe Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn
 1 5 10 15

 Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp
 20 25 30

 Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 35

 40 <210> 75
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Secuencia de codificación de nucleótidos de FRM4 de cadena pesada de AR37

 <400> 75
 50 tggggcgag ggaccacgat caccgtctcc tcagcAAAA cg 42

 <210> 76

	<211> 14
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
5	<220>
	<223> Secuencia de codificación de aminoácidos de FRM4 de cadena pesada de AR37
	<400> 76
	Trp Gly Ala Gly Thr Thr Ile Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
	1 5 10
10	<210> 77
	<211> 22
	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
15	<220>
	<223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
	<400> 77
20	actcataga ctccatcaag aa 22
	<210> 78
	<211> 20
	<212> ADN
25	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
30	<400> 78
	ctcgccagc ttgactgat 20
	<210> 79
	<211> 22
35	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
40	<400> 79
	tccatctct acaggcagtc ct 22
	<210> 80
45	<211> 20
	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
	<220>
50	<223> oligonucleótido de ADN de cadena sencilla
	<400> 80
	agccacacgt ggattgtctt 20
55	<210> 81
	<211> 20
	<212> ADN

<213> :Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

<400> 81

cactggagcc aaaacctgtc

20

<210> 82

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

<400> 82

agtgactgag cggctaattgc

20

<210> 83

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

<400> 83

gctgtggtgc tgtcatctgt

20

<210> 84

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

<400> 84

tcatgcccaa cttcactttc t

21

<210> 85

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla

<400> 85

gtttttggtg caggaggaca

20

<210> 86

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla		
<400> 86		
caccaacgta cccagaatgg		20
<210> 87		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla		
<400> 87		
gccactgctt tgcagaaaat		20
<210> 88		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla		
<400> 88		
cctcttcacg tggccccag		20
<210> 89		
<211> 21		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla		
<400> 89		
tgccctgcgt gtgaaccatg t		21
<210> 90		
<211> 24		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido de ADN de cadena sencilla		
<400> 90		
tgccgcatct tcaaacctcc atga		24
<210> 91		
<211> 294		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Dominio de tipo EGF de AREG (humano)		
<400> 91		
tcagtcagag ttgaacaggt agttaagccc ccccaaaaca agacggaaag tgaaaatact		60
tcagataaac ccaaaagaaa gaaaaggga ggcaaaaatg gaaaaaatag aagaaacaga		120
aagaagaaaa atccatgtaa tgcagaattt caaaatttct gcattcacgg agaatgcaaa		180
tatatagagc acctggaagc agtaacatgc aaatgtcagc aagaatattt cggatgaacgg		240
tgtggggaaa agtccatgaa aactcacagc atgattgaca gtagtttatc aaaa		294

<210> 92
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Dominio de tipo EGF de AREG (humano)

<400> 92

Ser Val Arg Val Glu Gln Val Val Lys Pro Pro Gln Asn Lys Thr Glu
 1 5 10 15

Ser Glu Asn Thr Ser Asp Lys Pro Lys Arg Lys Lys Lys Gly Gly Lys
 20 25 30

Asn Gly Lys Asn Arg Arg Asn Arg Lys Lys Lys Asn Pro Cys Asn Ala
 35 40 45

Glu Phe Gln Asn Phe Cys Ile His Gly Glu Cys Lys Tyr Ile Glu His
 50 55 60

Leu Glu Ala Val Thr Cys Lys Cys Gln Gln Glu Tyr Phe Gly Glu Arg
 65 70 75 80

Cys Gly Glu Lys Ser Met Lys Thr His Ser Met Ile Asp Ser Ser Leu
 85 90 95

10

Ser Lys

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la idoneidad de un sujeto para un tratamiento con un anticuerpo contra la anfirregulina, en donde el sujeto tiene un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de páncreas que presenta resistencia a la quimioterapia, en donde el método comprende analizar en una muestra biológica del sujeto el nivel de expresión de la anfirregulina, del factor α de crecimiento transformante (TGF- α) y del factor de crecimiento epidérmico con afinidad por la heparina (HB-EGF), en donde un nivel de expresión de dicha anfirregulina por encima de un umbral predeterminado y la ausencia de expresión de dicho TGF- α y/o dicho HB-EGF o una expresión por debajo de un nivel predeterminado de dicho TGF- α y/o dicho HB-EGF es indicativo de la idoneidad del sujeto para el tratamiento con dicho anticuerpo contra la anfirregulina.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha muestra biológica comprende una biopsia.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha biopsia comprende un líquido ascítico o un derrame pleural.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha muestra biológica comprende una muestra de sangre.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho cáncer es cáncer de ovario y en donde dicho antineoplásico es un derivado de platino.
6. Un agente que hace descender una actividad o expresión de la anfirregulina para ser usado en el tratamiento del cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de páncreas, que presenta resistencia a la quimioterapia en un sujeto, en donde está indicado un nivel de expresión de la anfirregulina por encima de un umbral predeterminado y la ausencia de expresión del factor α de crecimiento transformante (TGF- α) y/o del factor de crecimiento epidérmico con afinidad por la heparina (HB-EGF), o una expresión por debajo de un nivel predeterminado de dicho TGF- α y/o dicho HB-EGF en una muestra biológica de dicho sujeto.

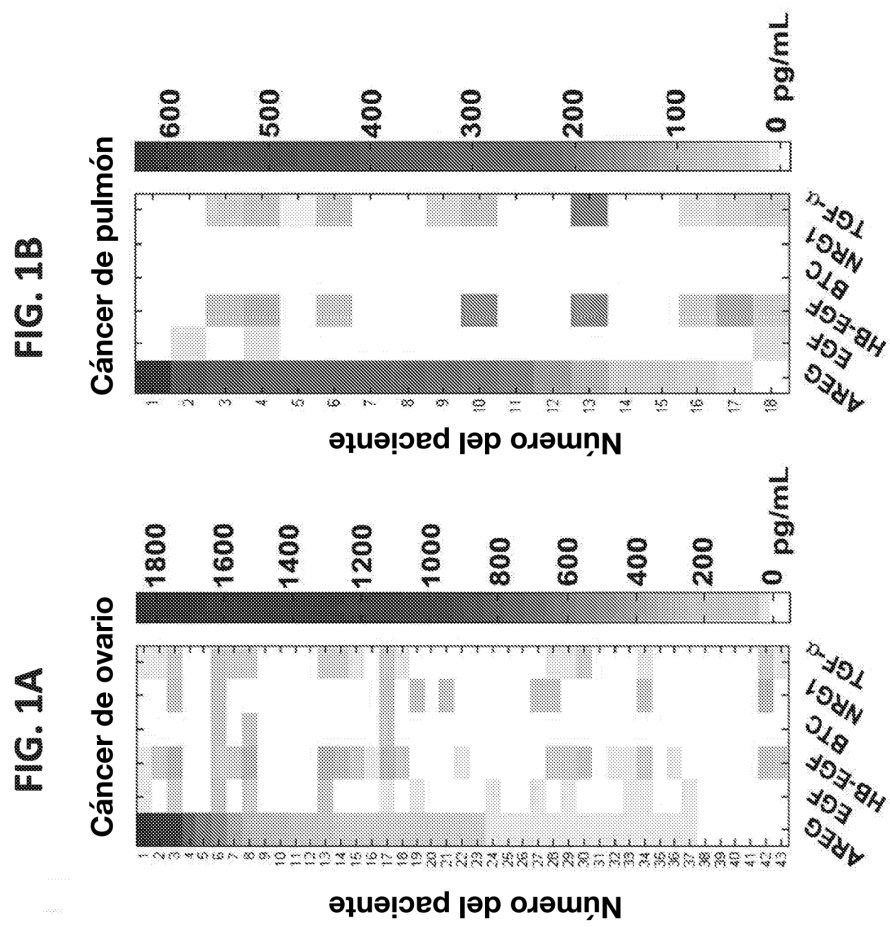


FIG. 1C

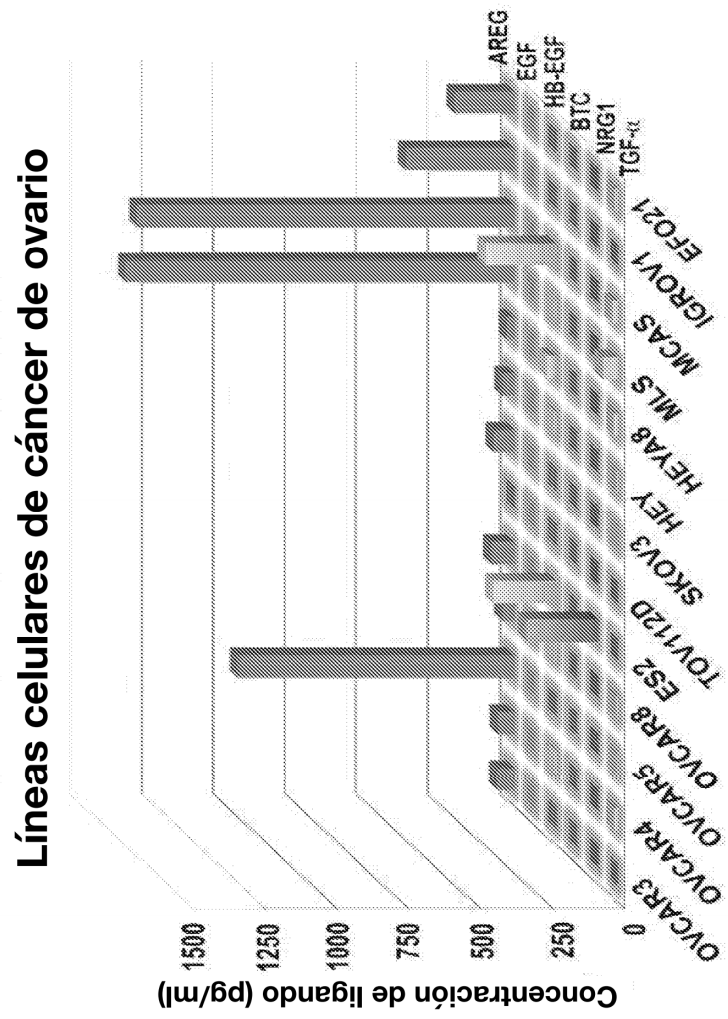


FIG. 1D

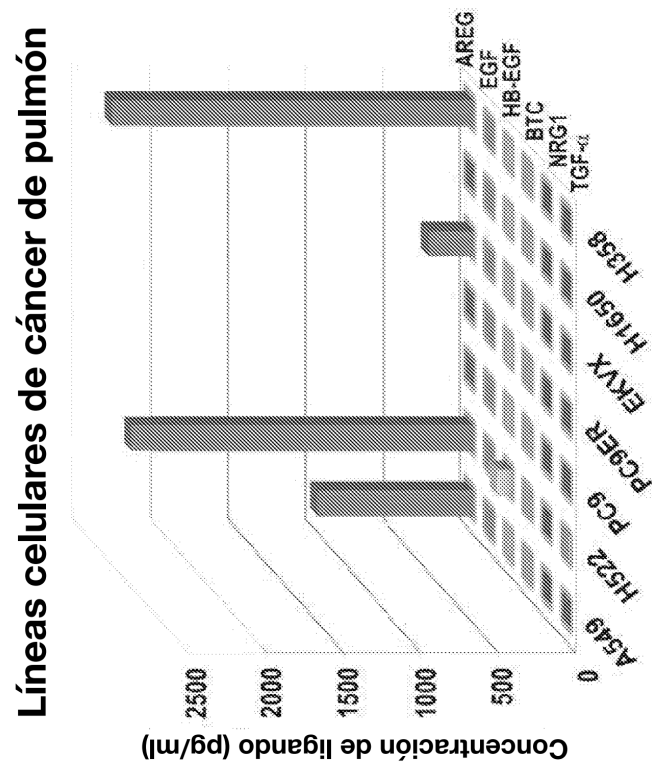


FIG. 1F

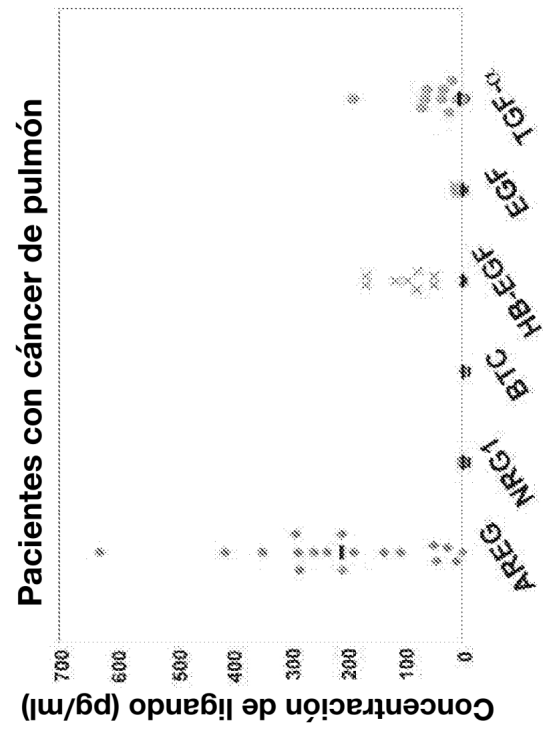
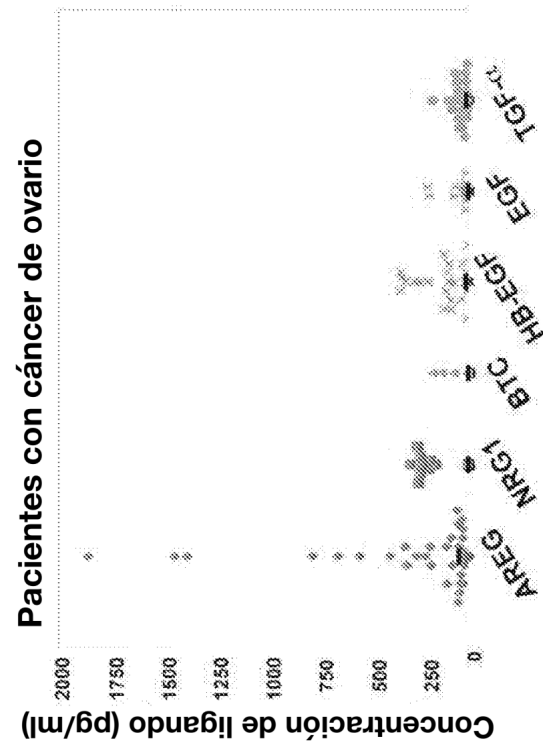


FIG. 1E



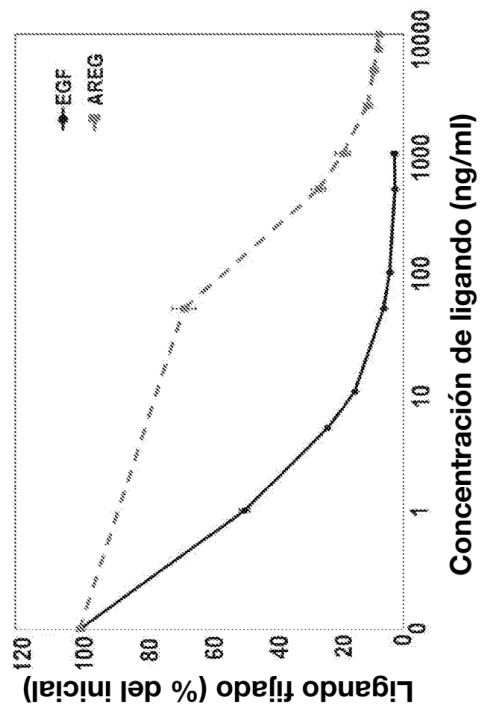


FIG. 2A

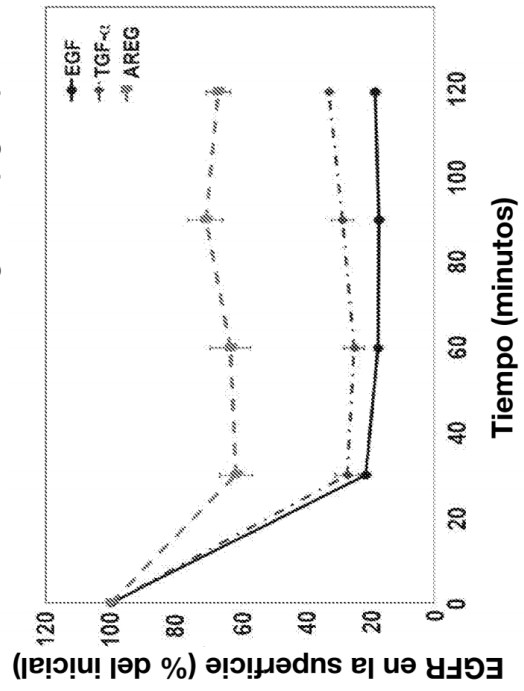


FIG. 2B

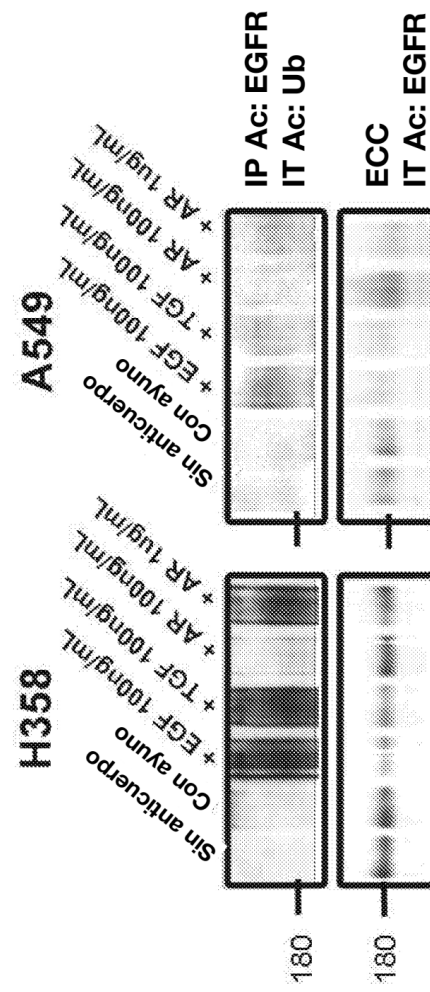
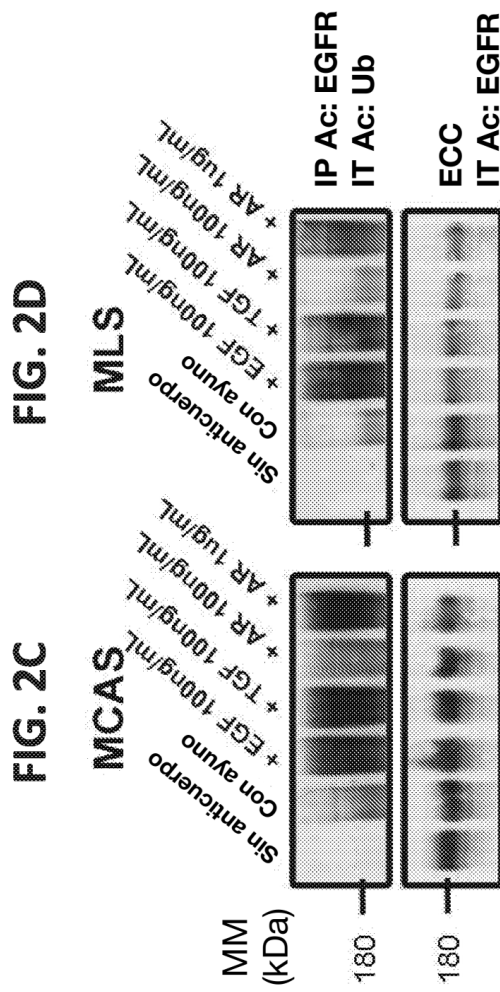


FIG. 2G

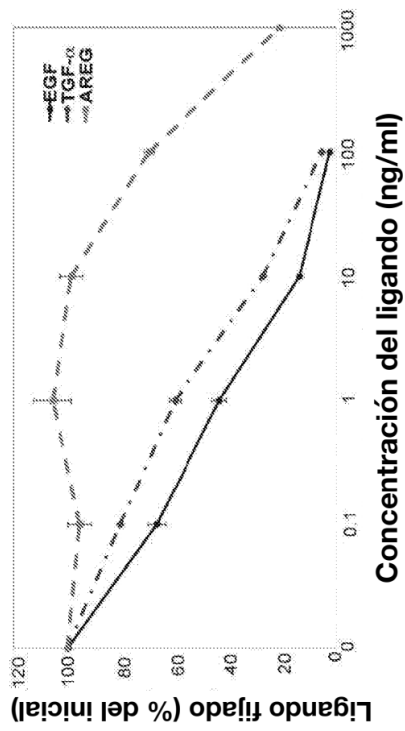
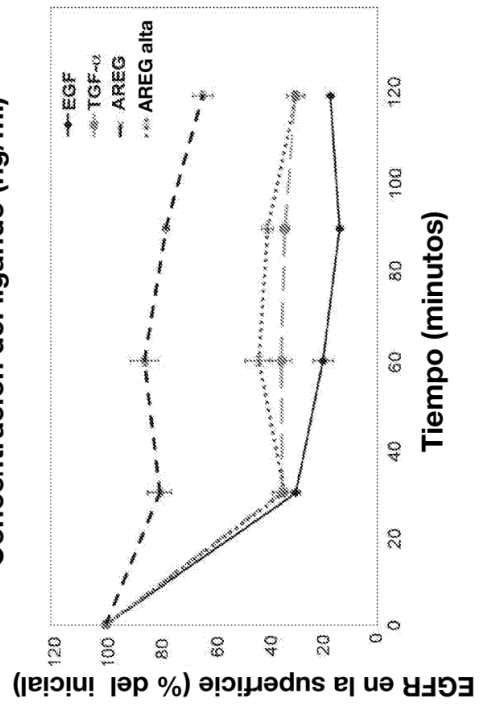


FIG. 2H



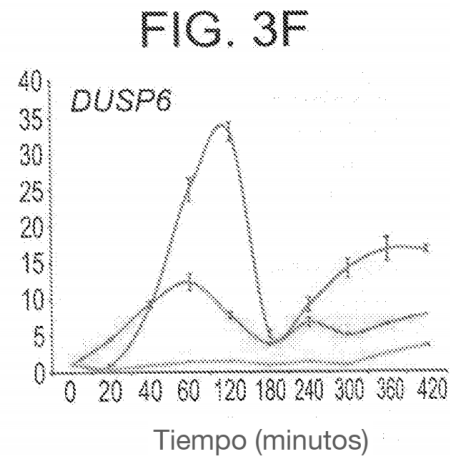
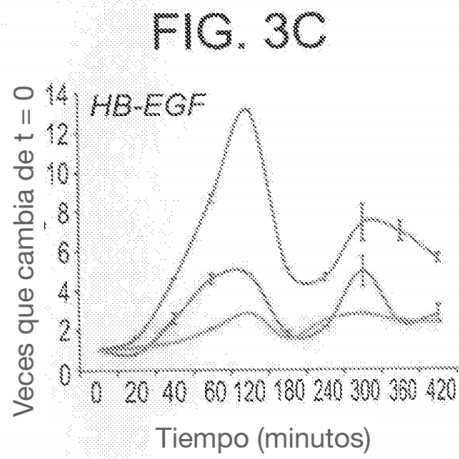
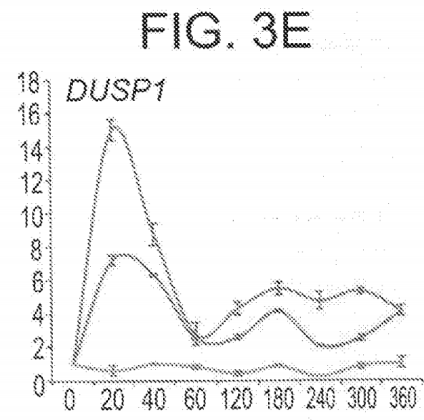
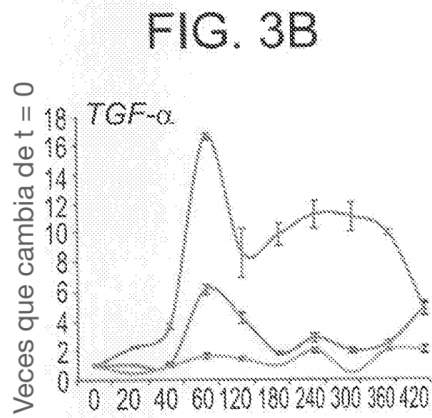
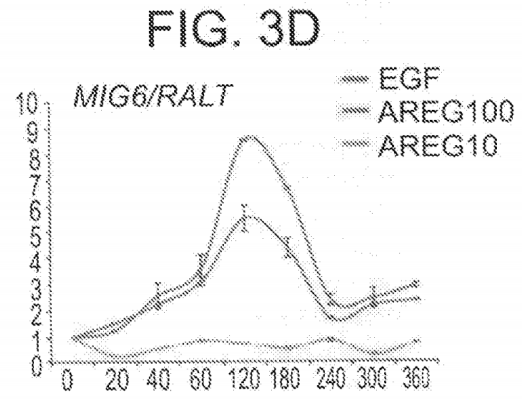
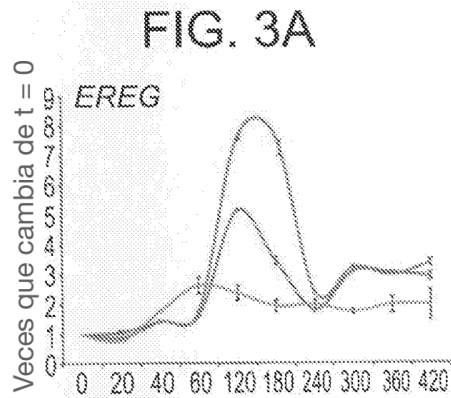


FIG. 4A

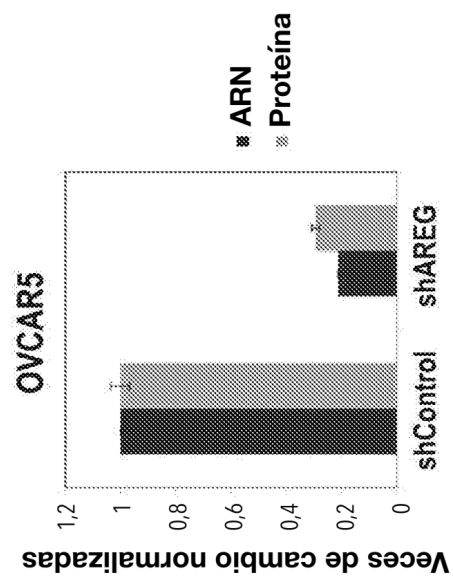


FIG. 4B

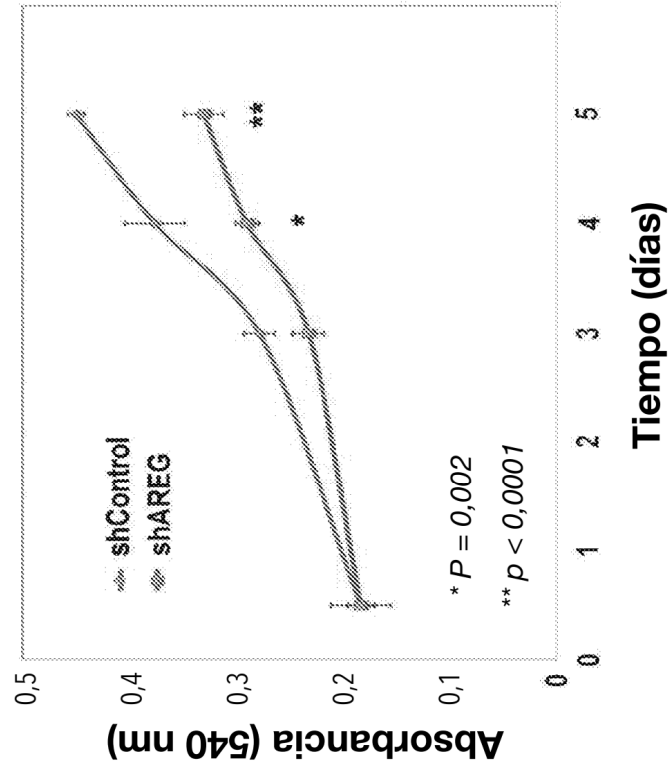


FIG. 4C

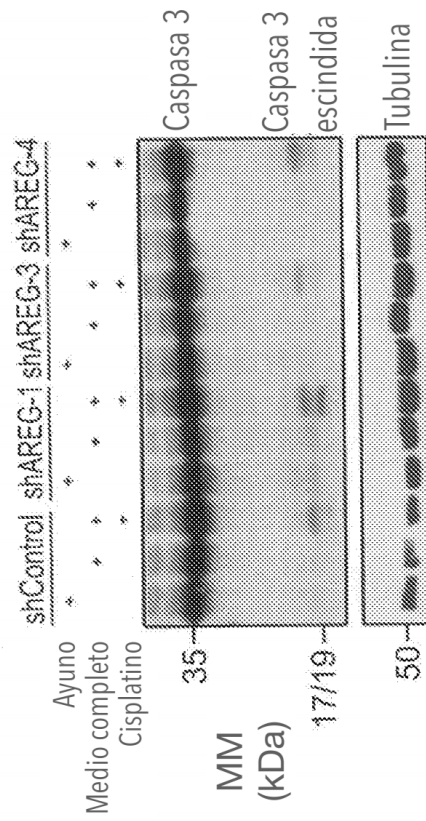


FIG. 4D

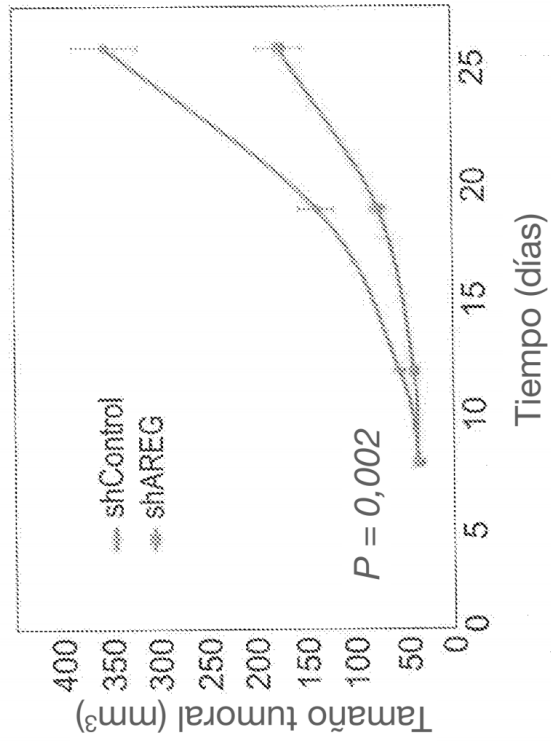


FIG. 4E

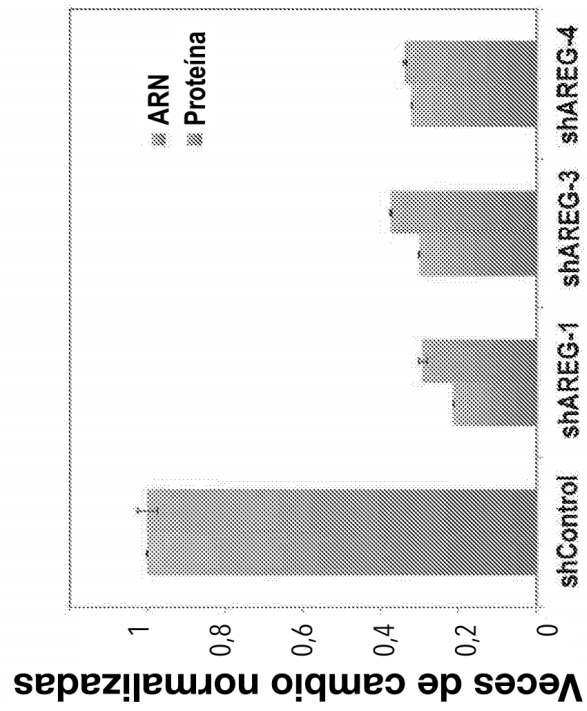


FIG. 4F

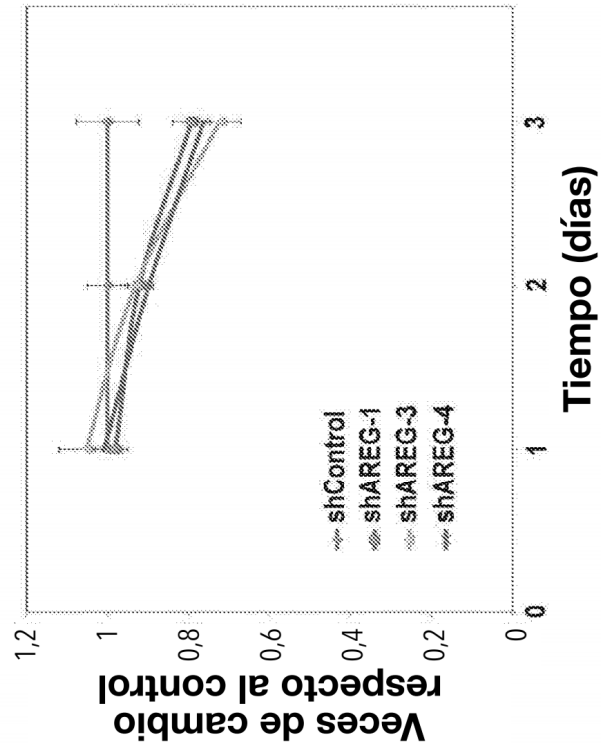


FIG. 4H

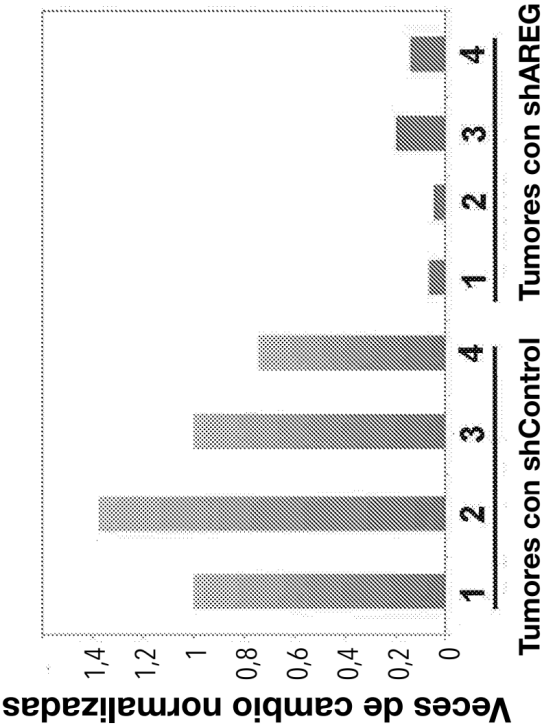


FIG. 4G

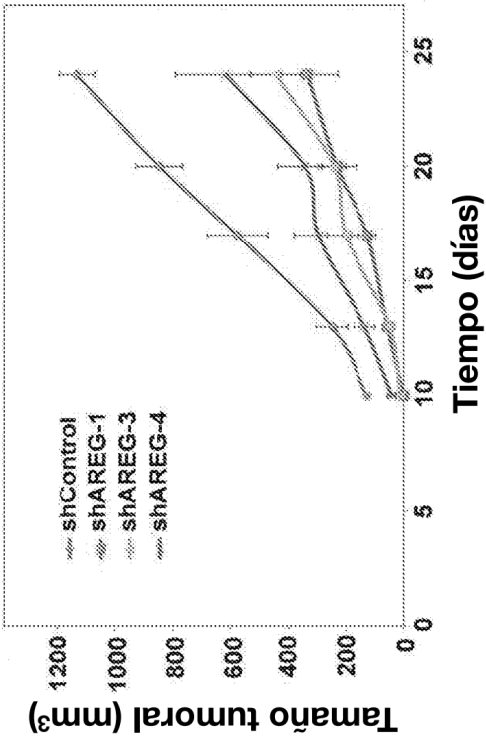


FIG. 5A

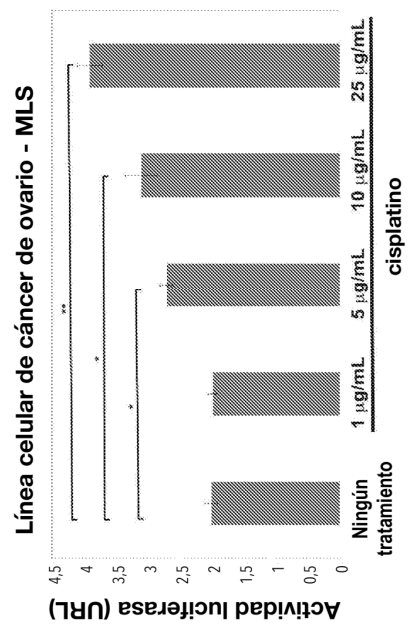


FIG. 5B

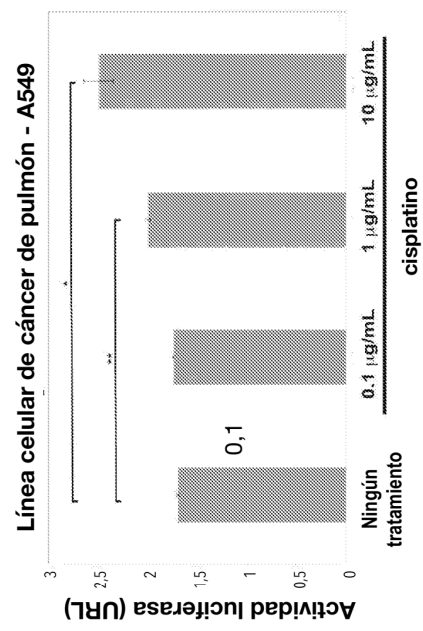


FIG. 5D

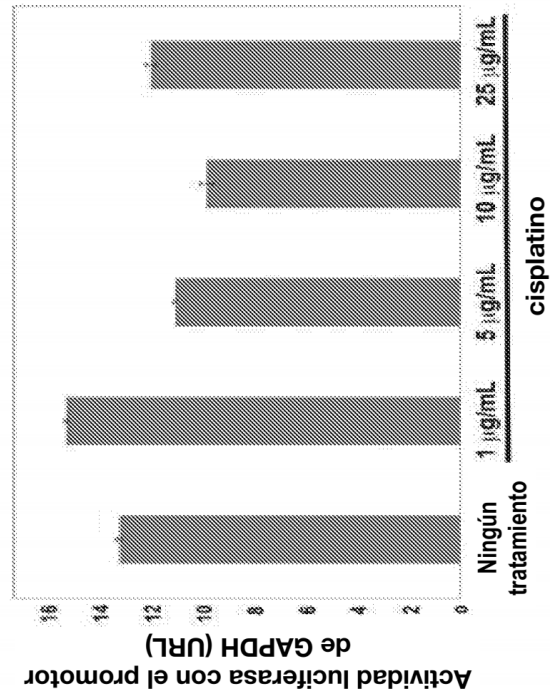


FIG. 5C

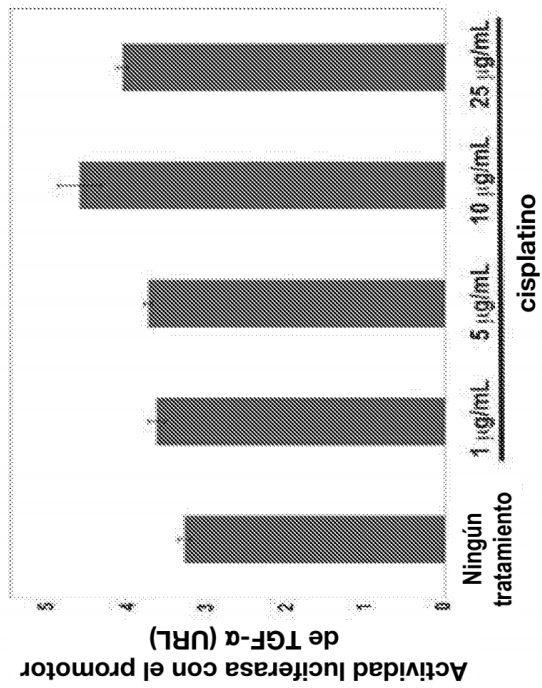


FIG. 5E

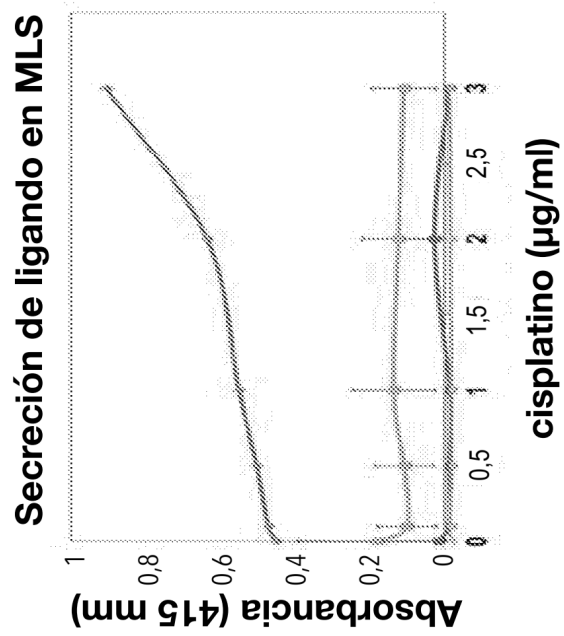


FIG. 5F

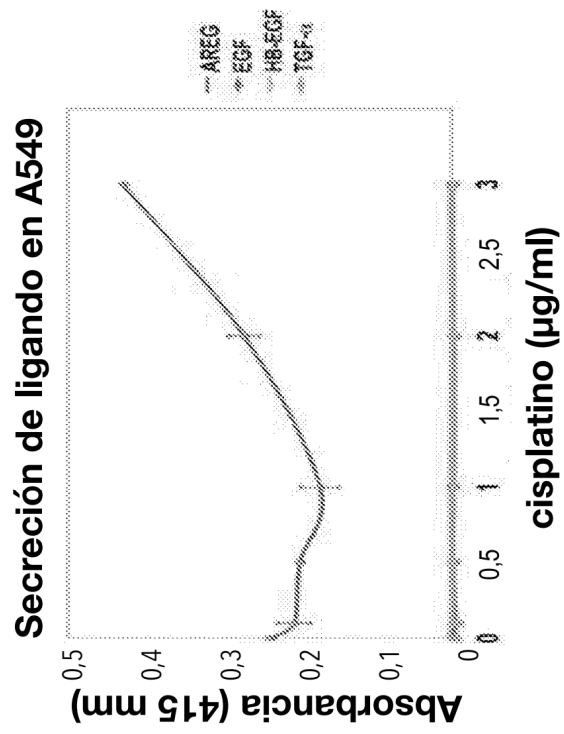


FIG. 6B

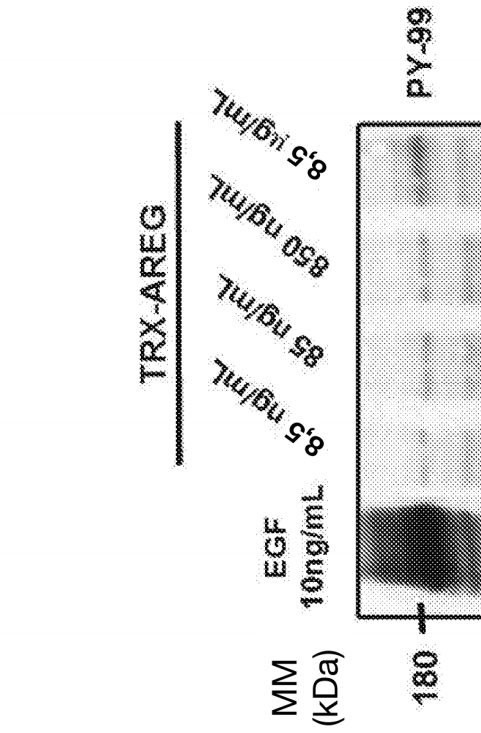


FIG. 6A

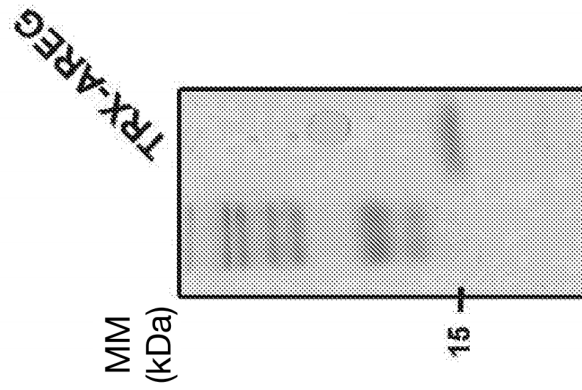
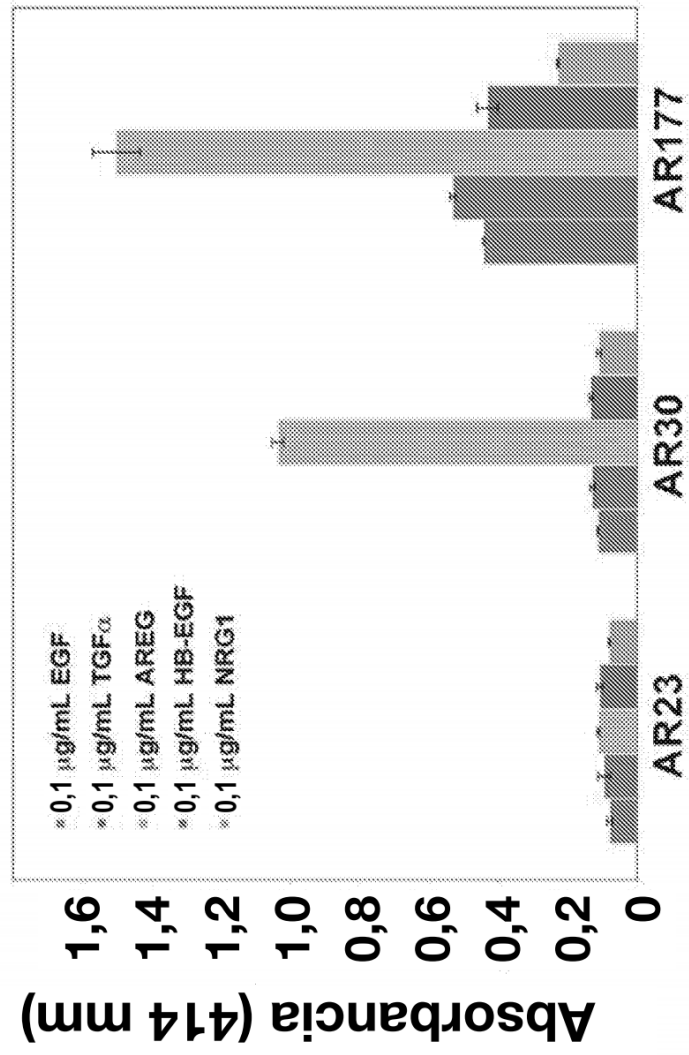


FIG. 6C



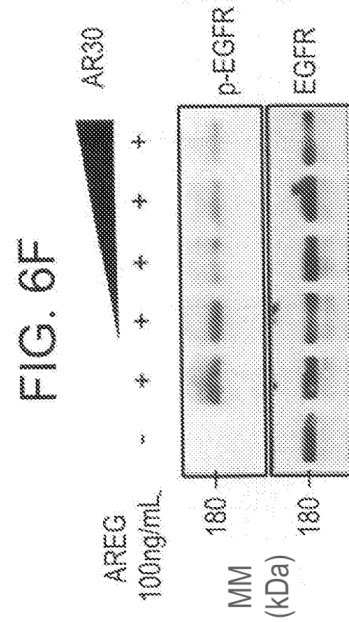
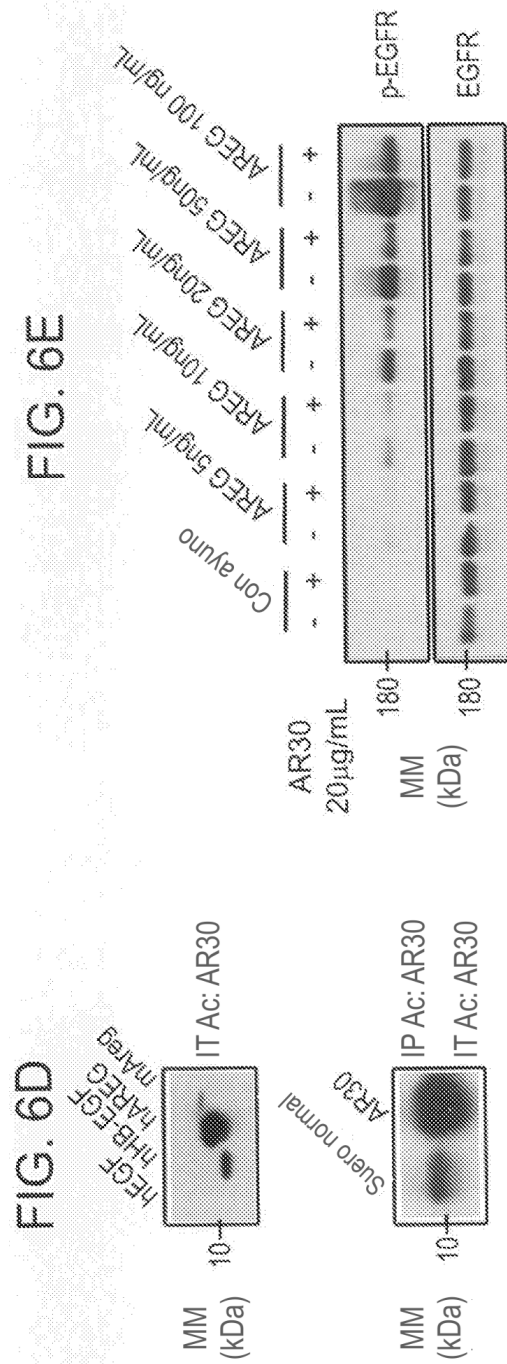


FIG. 7A

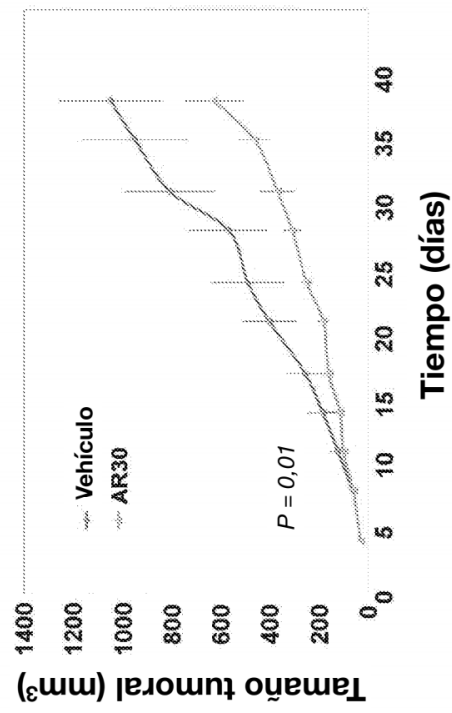


FIG. 7B

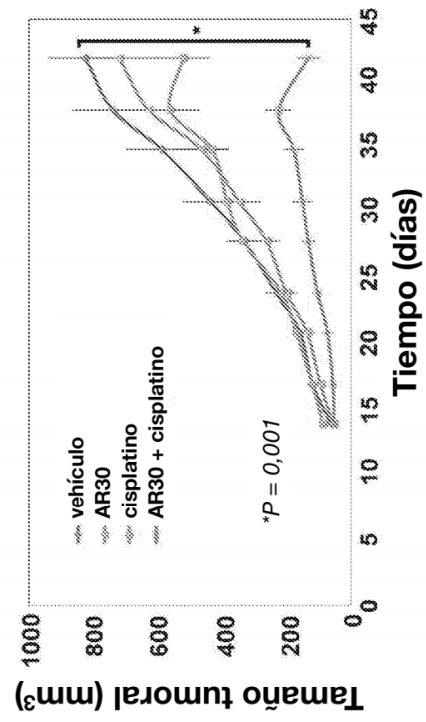


FIG. 7C

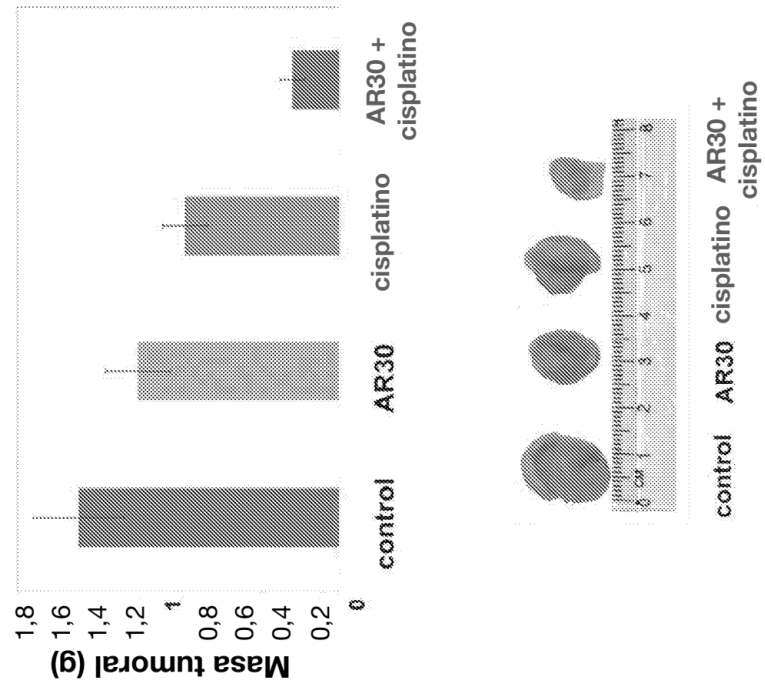


FIG. 8

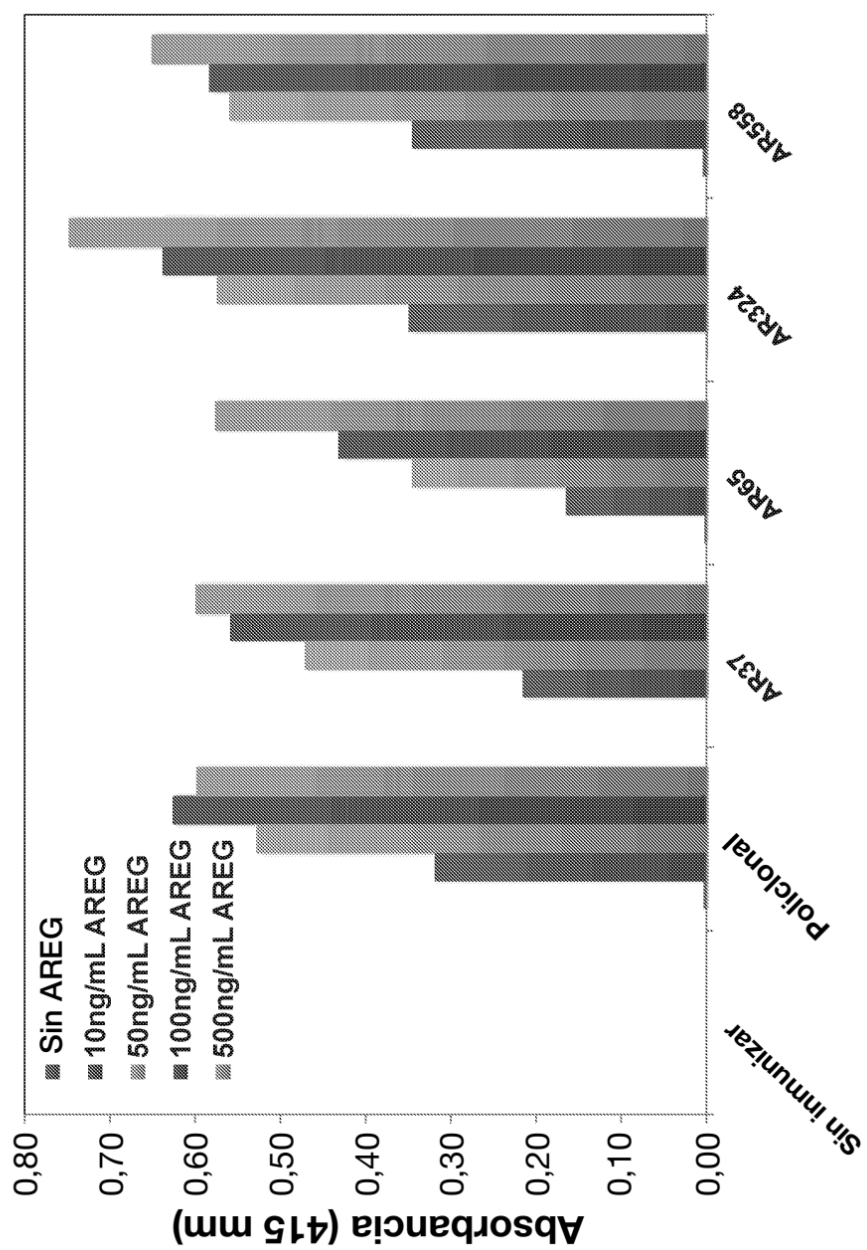
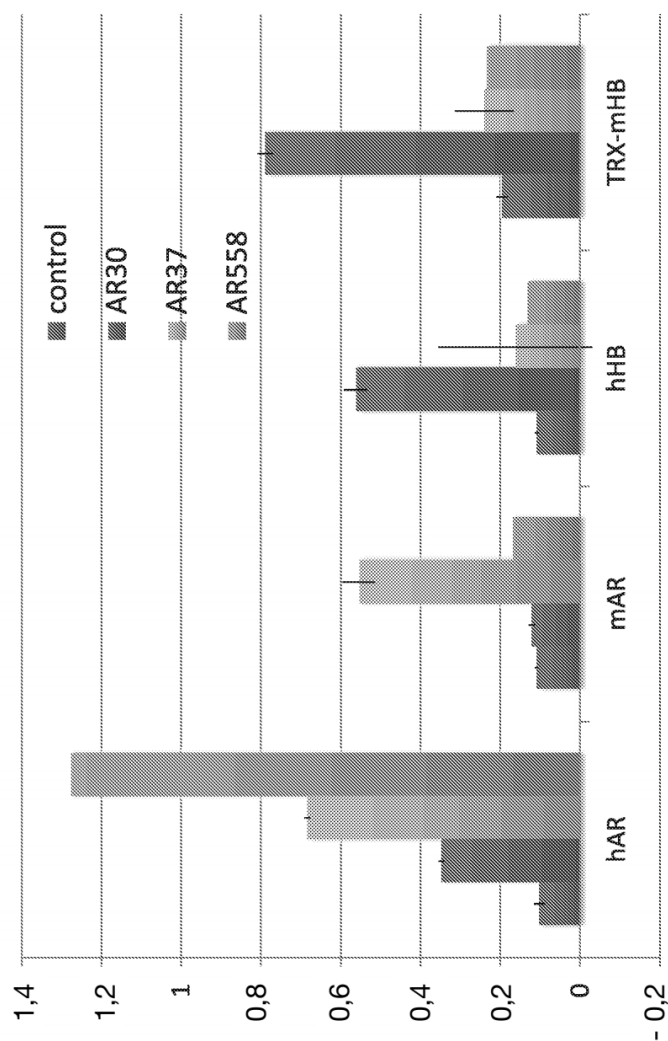


FIG. 9A



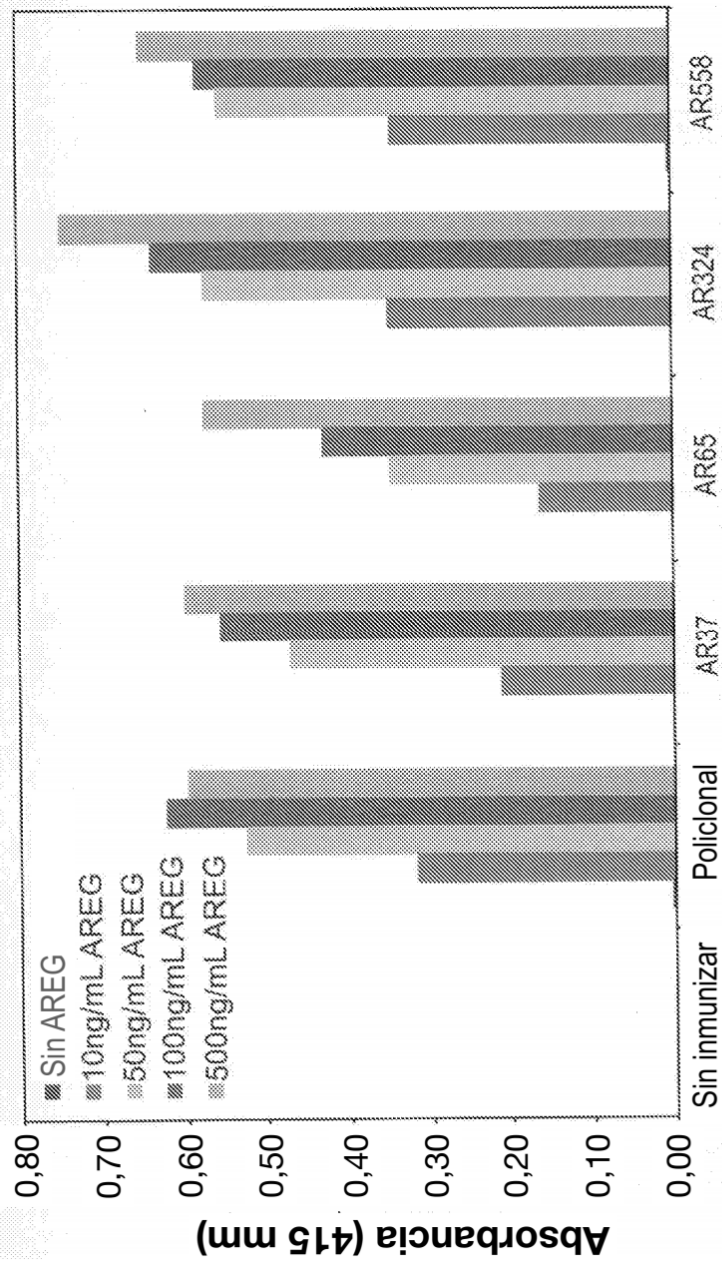
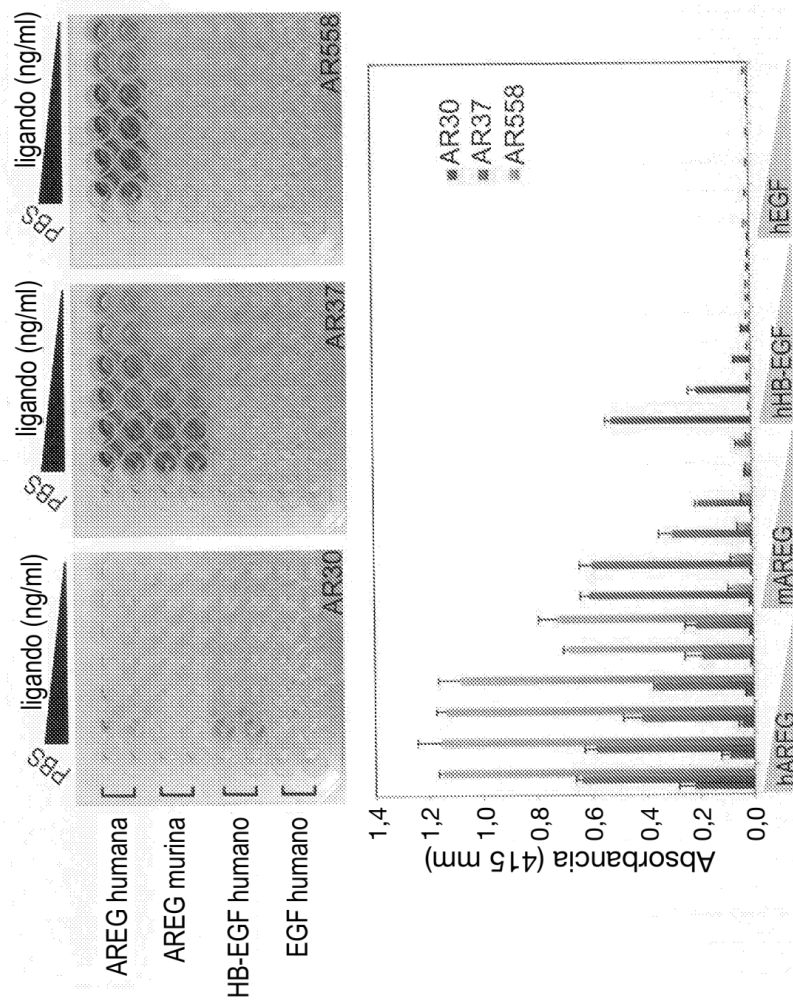


FIG. 9B



Ligandos (ng/ml)

FIG. 9C

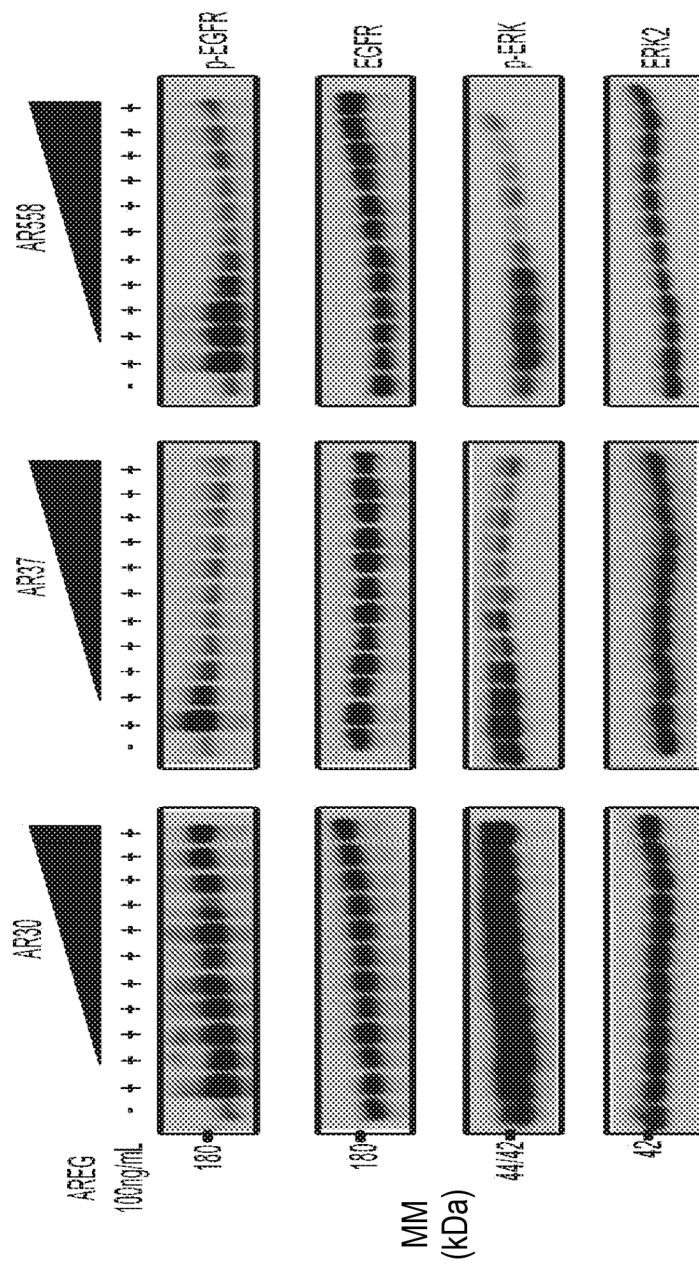


FIG. 10A

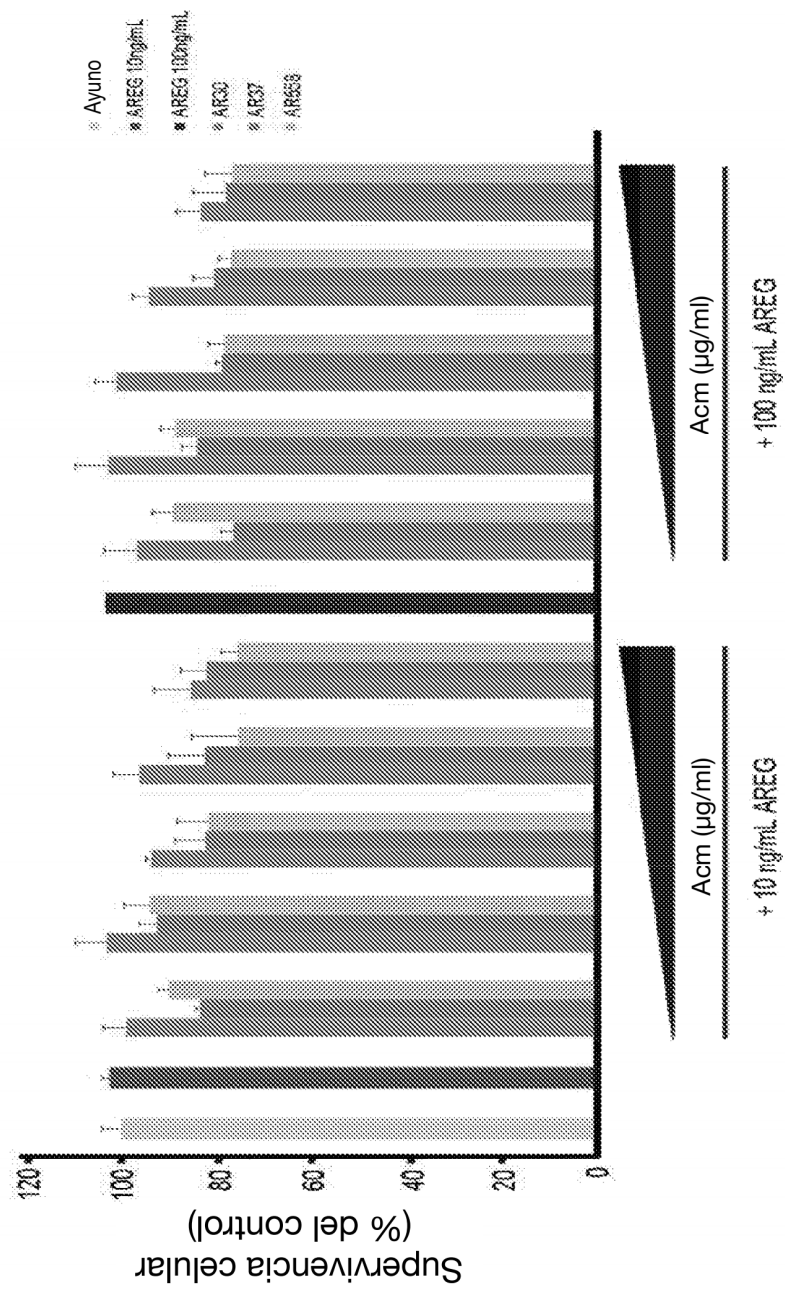


FIG. 10B

FIG. 11

