

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 251**

51 Int. Cl.:

C07K 16/26 (2006.01)

A61K 33/24 (2009.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2015 PCT/EP2015/062168**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185513**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2015 E 15729772 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3149039**

54 Título: **Anticuerpos antineurotensina y usos los mismos**

30 Prioridad:

02.06.2014 EP 14305825

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

10.08.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

FORGEZ, PATRICIA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 778 251 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 antineurotensina y usos los mismos

Campo:

La presente divulgación se refiere a anticuerpos antineurotensina y a usos de los mismos.

5 Antecedentes:

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

Además de estas acciones fisiológicas, los datos globales de la bibliografía alegan a favor de un papel estratégico de la NTS en la carcinogénesis (para revisión, véanse (5-7)). La acción oncogénica de NTS se ha descrito en numerosos tipos de células cancerosas y tumores con efectos en cada etapa de la progresión del cáncer desde el crecimiento tumoral, con efectos proliferativos y de supervivencia, hasta la expansión metastásica, con crecimiento independiente del anclaje, y efectos promigratorios y proinvasivos. Todos estos eventos celulares se activan presuntamente debido a la expresión anormal del receptor de neurotensina de alta afinidad 1 (NTSR1) durante los pasos tempranos de transformación celular en relación con la desregulación de la ruta de Wnt/ β -catenina. Los datos clínicos recientes han sido esenciales para identificar la expresión de NTSR1 como un marcador de pronóstico peyorativo en carcinomas de mama, pulmón y escamosos de cabeza y cuello (HNSCC) (8-10).

En particular, la NTS ha mostrado estimular el crecimiento de tejidos normales como mucosa de intestino delgado, colon, páncreas, estómago y corteza suprarrenal, y se ha propuesto en tumores benignos, tales como leiomiomas uterinos o adenomas de colon. Este efecto trófico se extendía a células cancerosas de diversos orígenes, ya que se encontró que la NTS exógena induce la estimulación del crecimiento de células de cáncer de páncreas, colon, próstata y pulmonar microcítico en cultivo. Los experimentos de incorporación de timidina tritiada en células de cáncer de próstata, páncreas y mama mostraron un efecto estimulante del crecimiento que da como resultado la potenciación parcial de la síntesis de ADN (11-13). Las alteraciones de la regulación de la apoptosis son otro mecanismo responsable de influir en el crecimiento celular. Los efectos antiapoptóticos inducidos por NTS se describieron por primera vez en la estirpe celular de adenocarcinoma de mama MCF-7 (14). Se ha reseñado la contribución del complejo NTS/NTSR1 en la estimulación del crecimiento tumoral en varios estudios. Se observó una disminución de al menos un 50 % del volumen y peso tumorales en xenoinjertos de células de cáncer de colon y pulmonar microcítico cuando los animales se trataban diariamente con un antagonista de NTSR1. Este resultado se ha confirmado desde entonces usando ARN interferente. Además, estos experimentos revelaban un efecto adicional sobre el crecimiento tumoral ya que la expresión de NTSR1 se anulaba completamente en tumores experimentales de carcinomas de mama y pulmonar no microcítico (NSCLC) (8, 15). De acuerdo con estos hallazgos, se mostró también que la NTS exógena aumenta significativamente el tamaño, peso y síntesis de ADN de las células de cáncer de colon MC26 y las células de cáncer de páncreas MIA Paca-2 xenoinjertadas en ratones atímicos (16, 17). En la misma línea, la administración mantenida de NTS promovía la carcinogénesis inducida experimentalmente, tal como hepatocarcinogénesis inducida por N-nitrosomorfolina, carcinogénesis de colon inducida por azoximetano o carcinogénesis gástrica inducida por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina en ratas al potenciar el número y tamaño de lesiones neoplásicas en comparación con el uso del carcinógeno solo (18, 19).

Los procesos de migración e invasión celulares son de hecho prerrequisitos de la dispersión metastásica. En células tumorales, la NTS se ha mostrado recientemente que modula la capacidad migratoria de las células inicialmente adherentes, como aquellas de glioblastoma, cáncer de colon, adenocarcinoma ductal pancreático, HNSCC y cáncer de mama. Se mostró también que la NTS induce la adquisición de un fenotipo celular invasivo en ensayos de movilidad tridimensional (20). Cuando se sometieron células de adenocarcinoma de próstata, LNCaP, a NTS, se observó un aumento del 75 % de su capacidad invasiva basal en Matrigel. Con privación de andrógenos, estas células de cáncer de próstata se vuelven espontáneamente invasivas. Estas propiedades invasivas adquiridas se correlacionaban con la NTS secretada intrínsecamente, puesto que el efecto se anulaba en presencia de silenciamiento de NTS específico (ARNbc). El agonista de NTS aumentaba de 3 a 4 veces el número de células invasivas en Matrigel en células HNSCC que expresan NTSR1 (10).

Se han identificado tres rutas principales inducidas por la activación de NSTR1 por NTS. La PKC es el efector central, y la ruta principal que da como resultado la activación de ERK1/2 y por la que se inducen efectos celulares proliferativos y de supervivencia posteriores. La segunda ruta se forma a partir de la cascada de PLC, IP3 y movilización de $[Ca^{2+}]_i$ que regula la expresión génica. La tercera ruta causa la activación de las proteínas G pequeñas que ejercen funciones

sobre la movilidad celular (21).

Los efectos oncogénicos finales inducidos por NTS son mayoritariamente dependientes de PKC. Se demostró la activación de PKC por NTS mediante el uso de inhibidores de isotipo amplio, siendo G66976 el usado más a menudo ya que tiene la ventaja de inhibir preferentemente las PKC α , β y γ convencionales (22). El uso del antagonista específico de NTSR1, SR48692, confirmaba que NTSR1 mediaba los efectos (23). La inducción de la actividad de PKC por NTS conducía a la activación rápida de la ruta de MAPK y preferentemente ERK1/2. Ocurrían varias rutas para la estimulación en cascada de MAPK, que implicaban el receptor de factor de crecimiento epidérmico o la estimulación directa de Raf-1, que es independiente de la activación de Ras como se ha descrito en células PANC-1 de adenocarcinoma ductal pancreático mutadas en K-Ras. De forma interesante, en la misma estirpe celular, se ha mostrado también que la NTS induce la actividad temprana y transitoria de proteína cinasa D1 (PKD1) en una ruta dependiente de PKC. La inducción de la cascada de MAPK estaba también asociada además a la inducción posterior del gen de respuesta de crecimiento temprano 1 (Egr-1), y al factor c-Fos de transcripción de AP-1 a niveles transcripcional y traduccional. Ambos mecanismos se impedían en presencia del antagonista de NTSR1. En un contexto tumoral, la activación mediada por NTS de la ruta de MAPK está asociada mayoritariamente a un crecimiento celular incontrolado, y puede exacerbar la tasa trófica en diversos tumores.

En la ruta de transducción de NTS principal, la activación de PKC estimula rutas laterales que implican la transactivación de receptores de factor de crecimiento epidérmico en ciertas estirpes celulares cancerosas. En el modelo de células cancerosas prostáticas PC3, la NTS inducía la fosforilación de EGFR, así como ERK1/2 y la proteína Akt. Esta estimulación de EGFR surge directamente de la liberación inducida por NTS de ligandos similares a EGF (HB-EGF o anfirregulina) a través de una ruta dependiente de PLC/PKC (24, 25). Los eventos de señalización siguientes posteriores conducían a la estimulación de la cascada de Ras-Raf-MEK-ERK clásica mediante un mecanismo dependiente de PI3K. En paralelo, se mostró una estimulación sinérgica de NTS combinada con EGF sobre la síntesis de ADN como resultado de la prolongación de la duración de la señal de ERK (26). La estimulación mantenida de NTS en células de cáncer de pulmón y mama, debido a regulación autocrina o paracrina, daba como resultado el aumento de la expresión de EGFR, HER2 y HER3 (Dupouy et al Oncotarget 2014, Younes et al Oncotarget 2014). En paralelo, ocurría la activación de metaloproteasas, acompañada de la liberación posterior de ligandos similares a EGF. En células de cáncer de pulmón, se activaron las metaloproteasas MMP1, HB-EGF y neuregulina 1. En células de cáncer de mama, se activaron MMP2, HB-EGF y neuregulina 2. Por tanto, en ambos modelos, EGFR y HER3 se activaron concomitantemente.

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

La NTS se ha mostrado también que estimula la actividad de diversas tirosina cinasas no receptoras mediante una fosforilación dependiente de la dosis de residuos de tirosina en NSCLC. El sustrato principal identificado correspondía a la cinasa de adhesión focal (FAK), una proteína que contribuye a la regulación de la dinámica de proteínas en la interfase célula-matriz, e implicada también en fenómenos de adhesión y migración celular (29). La fosforilación de tirosina de FAK es transitoria y rápida, y se impide mediante tratamiento con SR48692. La ruta de NTS/NTSR1 activaba también otras tirosina cinasas intracelulares, entre ellas Src y Etk/Bmx, en una estirpe celular de cáncer de próstata. Etk/Bmx se activa por FAK, posiblemente a través de Src, y las tres tirosina cinasas activadas forman un complejo de señalización (30). Este complejo está potencialmente implicado en los efectos tróficos alternativos inducidos por NTS consecuencia de la privación de andrógenos. Se divulga el uso de anticuerpos contra neurotensina para el tratamiento de mesotelioma pleural maligno, sin divulgar ningún anticuerpo específico (véase la patente internacional WO2010/069929).

Por consiguiente, los anticuerpos antineurotensina que tienen actividades neutralizantes son altamente deseables para el tratamiento del cáncer.

Compendio de la invención:

Como se define por las reivindicaciones, la presente invención se refiere a un anticuerpo neutralizante que se une al fragmento largo de neurotensina humana y comprende una región variable de cadena pesada que comprende una región H-CDR1 que comprende la SEQ ID NO:2, una región H-CDR2 que comprende la SEQ ID NO:3 y una región H-CDR3 que comprende la SEQ ID NO:4; y una región variable de cadena ligera que comprende una L-CDR1 que comprende la SEQ ID NO:6, una L-CDR2 que comprende la SEQ ID NO:7 y una región L-CDR3 que comprende la SEQ ID NO:8. La presente invención proporciona también el uso de tales anticuerpos en el tratamiento del cáncer. La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende tales anticuerpos.

La presente invención se refiere también a una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada y/o una cadena ligera de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

La presente invención se refiere también a un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 4.

La presente invención se refiere también a una célula hospedadora que se ha transfectado, infectado o transformado por la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 3 o el vector de la reivindicación 5.

Descripción detallada:

5 Para inhibir las propiedades oncogénicas de la neurotensina (NTS), los inventores produjeron un anticuerpo monoclonal de NTS dirigido contra NTS (concretamente NTSp27.7.4). Los inventores han clonado y caracterizado el dominio variable de las cadena ligera y pesada de dicho anticuerpo, y determinado por tanto el dominio de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de dicho anticuerpo como se describe en la Tabla A (véanse los EJEMPLOS). Los inventores demuestran que dicho anticuerpo monoclonal neutralizante de NTS representa un fármaco potencial para limitar la progresión del cáncer, y restaura las respuestas de quimioterapia.

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

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

Según la presente divulgación, "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tienen el mismo significado, y se usarán igualmente en la presente divulgación. El término "anticuerpo" como se usa en la presente memoria hace referencia a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, concretamente moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo engloba no solo moléculas de anticuerpo completas, sino también fragmentos de anticuerpo, así como variantes (incluyendo derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. En anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están ligadas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada está ligada con una cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (l) y kappa (k). Hay cinco clases principales (o isotipos) de cadena pesada que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene distintos dominios de secuencia. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, a los que se hace referencia colectivamente como CH). Las regiones variables de
25 ambas cadenas ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento y especificidad de unión al antígeno. Los dominios de región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren importantes propiedades biológicas tales como asociación de cadena de anticuerpo, secreción, movilidad transplacentaria, unión a complemento y unión a receptores de Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad de unión reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación con anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación con anticuerpo están compuestos por residuos que son principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR). Ocasionalmente, los residuos de las regiones hipervariables o de marco (FR) influyen en la estructura de dominio global y por ello el sitio de combinación. Regiones determinantes de la complementariedad o CDR hacen referencia a secuencias aminoacídicas que definen conjuntamente la afinidad y especificidad de unión de la región Fv natural de un sitio de unión a inmunoglobulina nativa. Las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR, designadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, incluye 6 CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de la región V de cadena pesada y ligera. Las regiones de marco (FR) hacen referencia a secuencias aminoacídicas interpuestas entre las CDR. Los residuos en los dominios variables de anticuerpo se numeran convencionalmente según el sistema concebido por Kabat et al. Este sistema se expone en Kabat et al.,
30 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, EE. UU. (de aquí en adelante "Kabat et al."). Este sistema de numeración se usa en la presente memoria descriptiva excepto cuando se indique otra cosa. Las denominaciones de residuos de Kabat no siempre corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos aminoacídicos. La secuencia aminoacídica lineal real puede contener menos o más aminoácidos que en la numeración de Kabat estricta correspondientes al acortamiento o inserción de un componente estructural, región de marco o determinante de la complementariedad (CDR), en la estructura de dominio variable básica. La numeración de Kabat correcta de residuos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineamiento de residuos de homología en la secuencia de un anticuerpo con una secuencia numerada por Kabat "estándar". Las CDR del dominio variable de cadena pesada están localizadas en los residuos 31-35 (CDR-H1), los residuos 50-65 (CDR-H2) y los residuos 95-102 (CDR-H3) según el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, según Chothia (Chothia, C. y Lesk, A. M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el residuo 26 al residuo 32. Por tanto "CDR-H1", como se usa en la presente memoria,
35 40 45 50 55 60

comprende los residuos 26 a 35, como se describe por una combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición de bucle topológica de Chothia. Las CDR del dominio variable de cadena ligera están localizadas en los residuos 24-34 (CDR-L1), los residuos 50-56 (CDR-L2) y los residuos 89-97 (CDR-L3) según el sistema de numeración de Kabat.

5 Según la divulgación, el anticuerpo está aislado. Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En particular, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo, como se determina por el método de Lowry, y lo más preferiblemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia aminoacídica N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta homogeneidad por PAGE-SDS en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ en células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

20 Como se usa en la presente memoria, la expresión "anticuerpo neutralizante" describe un anticuerpo que es capaz de neutralizar la actividad señalizadora biológica de neurotensina, por ejemplo, bloqueando la unión de neurotensina a su correspondiente receptor. Se apreciará que el término "neutralizante" como se usa en la presente memoria hace referencia a una reducción de la actividad de señalización biológica que puede ser parcial o completa. En particular, un anticuerpo neutralizante según la divulgación hace referencia a un anticuerpo que inhibe (parcial o completamente) las propiedades oncogénicas de la neurotensina. Por ejemplo, dichas actividades neutralizantes se evalúan típicamente según cualquier ensayo descrito en los EJEMPLOS.

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

30 "Identidad de secuencia aminoacídica porcentual (%)" con respecto a una secuencia peptídica o polipeptídica se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoacídicos en la secuencia peptídica o polipeptídica específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir la identidad de secuencia porcentual máxima, y no considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con fines de determinar la identidad de secuencia aminoacídica porcentual puede conseguirse de diversas formas que están dentro de las habilidades de la materia, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los especialistas en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el alineamiento máximo por la longitud completa de las secuencias que se comparan. Con fines de la presente memoria, sin embargo, los valores de identidad de secuencia aminoacídica en % se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla A siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 es propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla A siguiente se ha presentado con la documentación de usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde se registra con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible a través de Genentech, Inc., South San Francisco, Calif. o puede compilarse del código fuente proporcionado en la Fig. 8 siguiente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

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

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

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

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

- En particular, el anticuerpo de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO:1 y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO:5.
- 5 Según la divulgación, una primera secuencia aminoacídica que tiene al menos un 70 % de identidad con una segunda secuencia aminoacídica significa que la primera secuencia tiene un 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99 o 100 % de identidad con la segunda secuencia aminoacídica.
- 10 En particular, el anticuerpo de la presente divulgación comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica expuesta como SEQ ID NO:1 y/o una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica expuesta como SEQ ID NO:5.
- En particular, el anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo quimérico, típicamente un anticuerpo de ratón/humano quimérico. En particular, el anticuerpo quimérico de ratón/humano comprende los dominios variables del anticuerpo NTSp27-7.4 como se define anteriormente.
- 15 La expresión "anticuerpo quimérico" hace referencia a un anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo derivado del anticuerpo NTSp27-7.4, y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano.
- En particular, el anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo humanizado. En particular, en dicho anticuerpo humanizado, el dominio variable comprende regiones de marco aceptoras humanas, y opcionalmente dominio constante humano, cuando está presente, y CDR donantes no humanas, tales como CDR de ratón como se define anteriormente.
- 20 Según la divulgación, la expresión "anticuerpo humanizado" hace referencia a un anticuerpo que tiene regiones de marco y constantes de región variable de un anticuerpo humano pero que retienen las CDR del anticuerpo NTSp27-7.4 (concretamente, las SEQ ID NO:2, 3, 4, 6, 7 y 8).
- En particular, la presente divulgación proporciona además fragmentos de dichos anticuerpos que incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos.
- 25 Como se usa en la presente memoria, el término "Fab" designa un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígeno, en que aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y toda la cadena L, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, papaína, están unidos entre sí a través de un enlace disulfuro.
- 30 Como se usa en la presente memoria, el término "F(ab')₂" hace referencia a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 y actividad de unión a antígeno, que es ligeramente mayor que el Fab unido a través de un enlace disulfuro de la región de bisagra, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, pepsina.
- 35 Como se usa en la presente memoria, el término "Fab'" hace referencia a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígeno, que se obtiene cortando un puente disulfuro de la región de bisagra de F(ab')₂.
- Como se usa en la presente memoria, un polipéptido Fv monocatenario ("scFv") es un heterodímero VH::VL ligado covalentemente que se expresa habitualmente a partir de una fusión génica que incluye los genes que codifican VH y VL ligados por un ligador que codifica péptido.
- 40 Como se usa en la presente memoria, el término "dsFv" hace referencia a un heterodímero VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. Pueden formarse fragmentos de anticuerpo divalentes y multivalentes espontáneamente mediante la asociación de scFv monovalentes, o pueden generarse acoplando scFv monovalentes por un ligador peptídico, tal como sc(Fv)₂ divalente.
- 45 Como se usa en la presente memoria, el término "diacuerpos" hace referencia a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.
- 50 El anticuerpo de la presente divulgación puede producirse mediante cualquier técnica conocida en la materia, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, sola o en combinación. Por ejemplo, sabiendo la secuencia aminoacídica de la secuencia deseada, un especialista en la materia puede producir fácilmente dichos anticuerpos mediante técnicas estándares para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse usando el método en fase sólida bien conocido, preferiblemente usando un aparato de síntesis peptídica comercialmente disponible (tal como el elaborado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Como alternativa, los anticuerpos de la presente divulgación pueden sintetizarse mediante

técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos pueden obtenerse como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican los anticuerpos en vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en hospedadores eucarióticos o procarióticos adecuados que expresarán los anticuerpos deseados, de los que pueden aislarse más tarde usando técnicas bien conocidas.

- 5 Por consiguiente, un objeto adicional de la divulgación se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la presente divulgación. En particular, la secuencia de ácido nucleico codifica una cadena pesada y/o una cadena ligera de un anticuerpo de la presente divulgación.

Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede incluirse en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o vector vírico.

- 10 Las expresiones "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el que puede introducirse una secuencia de ADN o ARN (p. ej., un gen extraño) en una célula hospedadora, para transformar el hospedador y promover la expresión (p. ej., transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

Así, un objeto adicional de la divulgación se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de la divulgación.

- 15 Tales vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para causar o dirigir la expresión de dicho anticuerpo tras administración a un sujeto. Los ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para células animales incluyen el promotor temprano y potenciador de SV40 (Mizukami T. et al. 1987), el promotor y potenciador LTR de virus de leucemia de ratón de Moloney (Kuwana Y et al. 1987), el promotor (Mason JO et al. 1985) y potenciador (Gillies SD et al. 1983) de la cadena H de inmunoglobulina y similares.

- 20 Puede usarse cualquier vector de expresión para células animales, siempre que pueda insertarse y expresarse un gen que codifica la región C de anticuerpo humano. Los ejemplos de vectores incluyen pAGE107 (Miyaji H et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T et al. 1987), pHSG274 (Brady G et al. 1984), pKCR (O'Hare K et al. 1981), pSG1 beta d2-4- (Miyaji H et al. 1990) y similares.

- 25 Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR y similares.

- 30 Otros ejemplos de vector vírico incluyen vectores adenovíricos, retrovíricos, de herpesvirus y AAV. Tales vectores recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en la materia, tales como transfección de células de empaquetamiento o transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Los ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Pueden encontrarse protocolos detallados para producir tales virus recombinantes defectivos de replicación, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.

Un objeto adicional de la presente divulgación se refiere a una célula hospedadora que se ha transfectado, infectado o transformado por un ácido nucleico y/o un vector según la divulgación.

- 35 El término "transformación" significa la introducción de un gen, secuencia de ADN o ARN "extraño" (concretamente extrínseco o extracelular) en una célula hospedadora, de forma que la célula hospedadora exprese el gen o secuencia introducido para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducido. Una célula hospedadora que recibe y expresa en ADN o ARN introducido se ha "transformado".

- 40 Los ácidos nucleicos de la divulgación pueden usarse para producir un anticuerpo de la presente divulgación en un sistema de expresión adecuado. La expresión "sistema de expresión" significa una célula hospedadora y un vector compatible en condiciones adecuadas, p. ej. para la expresión de una proteína codificada por ADN extraño portado por el vector e introducido en la célula hospedadora.

- 45 Los sistemas de expresión comunes incluyen células hospedadoras E. coli y vectores de plásmido, células hospedadoras de insecto y vectores de baculovirus y células hospedadoras de mamífero y vectores. Otros ejemplos de células hospedadoras incluyen, sin limitación, células procarióticas (tales como bacterias) y células eucarióticas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células de planta, etc.). Los ejemplos específicos incluyen E. coli, levaduras *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, estirpes celulares de mamífero (p. ej., células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.), así como cultivos de células de mamífero primarias o establecidas (p. ej., producidas a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos incluyen también células SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), células P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), células CHO que son defectivas del gen de dihidrofolato reductasa (al que se hace referencia de aquí en adelante como "gen DHFR") (Urlaub G et al; 1980), células YB2/3HL.P2.G1 1.16Ag.20 de rata (ATCC CRL1662, a las que se hace referencia de aquí en adelante como "células YB2/0") y similares.

- 55 La presente divulgación se refiere también a un método de producción de una célula hospedadora recombinante que expresa un anticuerpo según la divulgación, comprendiendo dicho método las etapas de: (i) introducir in vitro o ex vivo

un ácido nucleico recombinante o un vector como se describe anteriormente en una célula hospedadora competente, (ii) cultivar in vitro o ex vivo la célula hospedadora recombinante obtenida y (iii), seleccionar opcionalmente las células que expresan y/o secretan dicho anticuerpo. Tales células hospedadoras recombinantes pueden usarse para la producción de anticuerpos de la presente divulgación.

- 5 En particular, el método comprende las etapas de: (i) cultivar el hibridoma NTSp27-7.4 en condiciones adecuadas para permitir la expresión del anticuerpo NTSp27-7.4 y (ii) recuperar el anticuerpo expresado.

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

- 10 En particular, el anticuerpo quimérico humano de la presente divulgación puede producirse obteniendo las secuencias nucleicas que codifican los dominios VL y VH como se describe anteriormente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano insertándolas en un vector de expresión para células animales que tiene genes que codifican CH de anticuerpo humano y CL de anticuerpo humano y expresando la secuencia de codificación introduciendo el vector de expresión en una célula animal.

- 15 Como dominio CH de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a la inmunoglobulina humana, pero son adecuadas aquellas de la clase IgG y pueden usarse también una cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. También, como CL de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a Ig, y pueden usarse aquellas de la clase kappa o la clase lambda.

- 20 Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas de ADN recombinante y transfección génica convencionales que son bien conocidas en la materia (véanse Morrison SL. et al. (1984) y los documentos de patente US 5.202.238 y US 5.204.244).

- 25 El anticuerpo humanizado de la presente divulgación puede producirse obteniendo las secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios CDR, como se describe anteriormente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo humanizado insertándolas en un vector de expresión para células animales que tiene genes que codifican (i) una región constante de cadena pesada idéntica a la del anticuerpo humano y (ii) una región constante de cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano y expresando los genes introduciendo el vector de expresión en una célula animal.

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

- 35 Los métodos para producir anticuerpos humanizados basados en técnicas de ADN recombinante y transfección génica convencionales son bien conocidos en la materia (véanse, p. ej., Riechmann L. et al. 1988; Neuberger MS. et al. 1985). Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la materia incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (EP 239.400; publicación PCT WO91/09967; pat. de EE. UU. n.º 5.225.539; 5.530.101 y 5.585.089), remodelación o remodelado (EP 592.106; EP 519.596; Padlan EA (1991); Studnicka GM et al. (1994); Roguska MA. et al. (1994)) y reordenamiento de cadena (pat. de EE. UU. n.º 5.565.332). La tecnología de ADN recombinante general para la preparación de tales anticuerpos es también conocida (véase la solicitud de patente europea EP 125023 y la solicitud de patente internacional WO 96/02576).

- 45 El Fab de la presente divulgación puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con Axl con una proteasa, papaína. También, el Fab puede producirse insertando ADN que codifica Fab del anticuerpo en un vector para un sistema de expresión procariótico, o para un sistema de expresión eucariótico, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según sea apropiado) para expresar el Fab.

- 50 El F(ab')₂ de la presente divulgación puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con Axl con una proteasa, pepsina. También, el F(ab')₂ puede producirse uniendo el Fab' descrito a continuación mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

El Fab' de la presente divulgación puede obtenerse tratando F(ab')₂ que reacciona específicamente con Axl con un agente reductor, ditiotreitól. También, el Fab' puede producirse insertando ADN que codifica el fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para procariotas o un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según sea apropiado) para efectuar su expresión.

- 55 El scFv de la presente divulgación puede producirse obteniendo ADNc que codifica los dominios VH y VL como se describe anteriormente, construyendo ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para

5 procariotas, o un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo entonces el vector de expresión en un procarionta o eucariota (según sea apropiado) para expresar el scFv. Para generar un fragmento scFv humanizado, puede usarse una tecnología bien conocida llamada injerto de CDR, que implica seleccionar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un fragmento de scFv donante e injertarlas en un marco de fragmento scFv humano de estructura tridimensional conocida (véanse, p. ej., los documentos WO98/45322; WO 87/02671; US5.859.205; US5.585.089; US4.816.567; EP0173494). Se contemplan una modificación o modificaciones de la secuencia aminoacídica de los anticuerpos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Es conocido que cuando se produce un anticuerpo humanizado simplemente injertando CDR en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en las FR de VH y VL de un anticuerpo humano, se reduce la actividad de unión a antígeno en comparación con la del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Se considera que varios residuos aminoacídicos de VH y VL del anticuerpo no humano, no solo en las CDR sino también en las FR, están asociados directa o indirectamente con la actividad de unión a antígeno. Por ello, la sustitución de estos residuos aminoacídicos por diferentes residuos aminoacídicos derivados de FR de VH y VL del anticuerpo humano reduciría la actividad de unión. Para resolver el problema, en anticuerpos injertados con CDR humanas, se han hecho intentos de identificar, entre las secuencias aminoacídicas de FR de VH y VL de anticuerpos humanos, un residuo aminoacídico que esté directamente asociado a la unión al anticuerpo, o que interaccione con un residuo aminoacídico de la CDR, o que mantenga la estructura tridimensional del anticuerpo y que esté directamente asociado con la unión al antígeno. La actividad de unión a antígeno reducida podría aumentarse reemplazando los aminoácidos identificados por residuos aminoacídicos del anticuerpo original derivado de un animal no humano.

25 Pueden hacerse modificaciones y cambios en la estructura de los anticuerpos de la presente divulgación y en las secuencias de ADN que las codifican, y seguir obteniendo una molécula funcional que codifica un anticuerpo con características deseables. Al hacer los cambios en las secuencias aminoacídicas, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice aminoacídico hidropático para conferir función biológica interactiva a una proteína se entiende generalmente en la materia. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en su hidrofobicidad y características de carga que es: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9) y arginina (-4,5). Un objeto adicional de la presente divulgación engloba también variantes conservativas de función de los anticuerpos de la presente divulgación.

35 "Variantes conservativas de función" son aquellas en que se ha cambiado un residuo aminoacídico dado en una proteína o enzima sin alterar la conformación y función globales del polipéptido incluyendo, pero sin limitación, el reemplazo de un aminoácido por otro que tenga propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, hidrófobo, aromático y similares). Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida de actividad apreciable. Puesto que la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína definen la actividad funcional biológica de la proteína, pueden hacerse ciertas sustituciones aminoacídicas en una secuencia proteica y, por supuesto, en su secuencia codificante de ADN, obteniendo no obstante una proteína con propiedades similares. Se contempla por tanto que pueden hacerse diversos cambios en las secuencias de anticuerpos de la divulgación, o secuencias correspondientes de ADN que codifican dichos anticuerpos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica. Es conocido en la materia que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropático similar y seguir dando como resultado una proteína con actividad biológica similar, concretamente, seguir obteniendo una proteína biológica funcionalmente equivalente. Como se destaca anteriormente, las sustituciones aminoacídicas están por lo tanto basadas generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral aminoacídica, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliadad, carga, tamaño y similares. Son bien conocidas por los especialistas en la materia sustituciones ejemplares que tienen en consideración diversas de las características anteriores e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina y valina, leucina e isoleucina.

50 Puede ensayarse en los anticuerpos la unión específica por cualquier método conocido en la materia. Pueden usarse muchos formatos de ensayo de unión competitiva diferentes para agrupamiento por epítomos. Los inmunoensayos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivos que usan técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos "de sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de precipitina, ensayos de precipitina de difusión en gel, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A y ensayos de fijación de complemento. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos en la materia (véanse, p. ej. Ausubel et al, eds, 1994 Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & sons, Inc., Nueva York). Por ejemplo, BIACORE® (GE Healthcare, Piscataway, NJ) es uno de una variedad de formatos de ensayos de resonancia de plasmón de superficie que se usan rutinariamente para agrupar por epítomos paneles de anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, pueden efectuarse ensayos de bloqueo cruzado rutinarios tales como los descritos en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane, 1988.

- Los anticuerpos genomanipulados de la presente divulgación incluyen aquellos en que se han hecho modificaciones en residuos de marco en VH y/o VL, p. ej. para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, tales modificaciones de marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es “retromutar” uno o más residuos de marco a la correspondiente secuencia de estirpe germinal. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado mutación somática puede contener residuos de marco que difieren de la secuencia de estirpe germinal de la que deriva el anticuerpo. Tales residuos pueden identificarse comparando las secuencias de marco de anticuerpo con las secuencias de estirpe germinal de las que deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de región de marco a su configuración de estirpe germinal, las mutaciones somáticas pueden “retromutarse” a la secuencia de estirpe germinal, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR. Tales anticuerpos “retromutados” pretenden estar también englobados por la divulgación. Otro tipo de modificación de marco implica mutar uno o más residuos en la región de marco, o incluso en una o más regiones CDR, para retirar los epítopos de linfocitos T para reducir así la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Se hace referencia también a este enfoque como “desinmunización” y se describe con más detalle en la publicación de patente de EE. UU. n.º 20030153043 de Carr et al.
- Además de, o como alternativa a, modificaciones hechas en las regiones de marco o CDR, los anticuerpos de la presente divulgación pueden genomanipularse para incluir modificaciones en la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como semivida sérica, fijación de complemento, unión a receptor de Fc y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la presente divulgación puede modificarse químicamente (p. ej., pueden enlazarse uno o más restos químicos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo.
- Por ejemplo, se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente divulgación puede alterarse usando cualquier método adecuado conocido en la materia. La presente divulgación se refiere por lo tanto también a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente divulgación, que tienen una afinidad mejorada por neutroensina. Tales variantes pueden obtenerse mediante una serie de protocolos de maduración por afinidad incluyendo mutación de las CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), reordenamiento de cadena (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutantes de E. coli (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), reordenamiento de ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), exposición en fago (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Crameri et al., Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (supra) discute estos métodos de maduración por afinidad.
- En particular, la región de bisagra de CHI se modifica de tal forma que se altere el número de residuos de cisteína en la región de bisagra, p. ej. aumente o disminuya. Este enfoque se describe además en la patente de EE. UU. n.º 5.677.425 de Bodmer et al. El número de residuos de cisteína en la región de bisagra de CHI se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblado de las cadenas ligera y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.
- En particular, se muta la región de bisagra de Fc del anticuerpo de la presente divulgación para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones aminoacídicas en la región de interfase del dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra de tal forma que el anticuerpo tenga unión a proteína A estafilocócica (SpA) dañada respecto a la unión a SpA del dominio Fc-bisagra nativo. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de EE. UU. n.º 6.165.745 de Ward et al.
- En particular, se modifica el anticuerpo de la presente divulgación para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, pueden introducirse una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.277.375 de Ward. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse en la región CHI o CL para contener un epítipo de unión a receptor silvestre tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de EE. UU. n.º 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al.
- En particular, se altera la región Fc reemplazando al menos un residuo aminoacídico por un residuo aminoacídico diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, pueden reemplazarse uno o dos aminoácidos por un residuo aminoacídico diferente de tal forma que al anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero retenga la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo original. El ligando efector del que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con más detalle en las patentes de EE. UU. n.º 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al.
- En particular, pueden reemplazarse uno o más aminoácidos seleccionados de residuos aminoacídicos por un residuo aminoacídico diferente de tal forma que el anticuerpo tenga unión a Clq alterada y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) reducida o anulada. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551 de Idusogie et al.
- En particular, se alteran uno o más residuos aminoacídicos para alterar así la capacidad del anticuerpo de fijar el complemento. Este enfoque se describe además en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer et al. En particular, se modifica la región Fc para aumentar la capacidad del anticuerpo de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor de Fc al modificar uno o más

aminoácidos. Este enfoque se describe además en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, se han cartografiado los sitios de unión en IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R. L. et al, 2001 J. Biol. Chem. 276: 6591-6604, WO2010106180).

5 En particular, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, puede hacerse un anticuerpo aglicosilado (concretamente, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de carbohidrato pueden lograrse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación en la secuencia de anticuerpo. Por ejemplo, pueden hacerse una o más sustituciones aminoacídicas que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de marco de
10 región variable para eliminar así la glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Se describe tal enfoque con más detalle en las patentes de EE. UU. n.º 5.714.350 y 6.350.861 de Co et al. Adicionalmente o como alternativa, puede elaborarse un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado o no fucosilado que tenga cantidades reducidas o ningún residuo de fucosilo o un anticuerpo que tenga estructuras GlcNAc bisectrices aumentadas. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de anticuerpos. Tales modificaciones
15 de carbohidrato pueden lograrse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glicosilación alterada. Se han descrito células con maquinaria de glicosilación alterada en la materia y pueden usarse como células hospedadoras en que expresar anticuerpos recombinantes de la presente divulgación para producir así un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hang et al. describe una estirpe celular con un gen FUT8 funcionalmente perturbado que codifica una fucosil transferasa, de tal forma que los anticuerpos expresados en tal estirpe celular exhiben hipofucosilación o están desprovistos de residuos de fucosilo. Por lo tanto, en particular, los anticuerpos de la presente divulgación pueden producirse por expresión recombinante en una estirpe celular que exhibe un patrón de hipofucosilación o no fucosilación, por ejemplo, una estirpe celular de mamífero con expresión deficiente del gen FUT8 que codifica fucosiltransferasa. La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una estirpe celular CHO variante, las células Lecl3, con capacidad reducida de enlazar fucosa con
20 carbohidratos ligados a Asn(297), dando también como resultado hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R.L. et al, 2002 J. Biol. Chem. 277: 26733-26740). La publicación PCT WO 99/54342 de Umana et al. describe estirpes celulares genomanipuladas para expresar glicosil transferasas modificadoras de glicoproteína (p. ej., beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de tal forma que los anticuerpos expresados en las estirpes celulares genomanipuladas exhiban estructuras GlcNAc bisectrices aumentadas que dan como resultado una actividad ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana et al, 1999 Nat. Biotech. 17: 176-180). Eureka Therapeutics describe además células de mamífero CHO genomanipuladas capaces de producir anticuerpos con patrón de glicosilación de mamífero alterado desprovisto de
25 residuos de fucosilo (<http://www.eurekainc.com/a&boutus/companyoverview.html>). Como alternativa, los anticuerpos de la presente divulgación pueden producirse en levaduras u hongos filamentosos genomanipulados para patrón de glicosilación similar a mamíferos y capaces de producir anticuerpos que carecen de fucosa como patrón de glicosilación (véase, por ejemplo, el documento EP1297172B1).

Otra modificación de los anticuerpos de la presente memoria que se contempla en la divulgación es la pegilación. Un anticuerpo puede pegilarse, por ejemplo, para aumentar la semivida biológica (p. ej. sérica) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, o fragmento del mismo, se hace reaccionar típicamente con polietilenglicol (PEG), tal como un derivado
40 éster o aldehído reactivo de PEG, en condiciones en que uno o más grupos PEG se enlazan con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La pegilación puede llevarse a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se usa en la presente memoria, el término "polietilenglicol" pretende englobar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como monoalcoxi o ariloxi (C1-C10)-polietilenglicol o polietilenglicolmaleimida.
45 En particular, el anticuerpo para pegilar es un anticuerpo aglicosilado. Son conocidos en la materia métodos para pegilar proteínas y pueden aplicarse a anticuerpos de la presente divulgación. Véanse por ejemplo los documentos EP 0 154 316 de Nishimura et al. y EP 0 401 384 de Ishikawa et al.

Otra modificación de los anticuerpos que se contempla por la divulgación es un conjugado o una proteína de fusión de al menos la región de unión a antígeno del anticuerpo de la presente divulgación con proteína sérica, tal como seroalbúmina humana o un fragmento de la misma, para aumentar la semivida de la molécula resultante. Tal enfoque se describe por ejemplo en Ballance et al. EP 0 322 094.

Otra posibilidad es una fusión de al menos la región de unión a antígeno del anticuerpo de la presente divulgación con proteínas capaces de unión a proteínas séricas, tales como seroalbúmina humana, para aumentar la semivida de la molécula resultante. Tal enfoque se describe, por ejemplo, en Nygren et al, EP 0 486 525.

55 Un objeto adicional de la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento de cáncer en un sujeto necesitado de ello que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la presente divulgación.

Los tumores para tratar incluyen tumores primarios y tumores metastásicos, así como tumores refractarios. Los tumores refractarios incluyen tumores que no consiguen responder o son resistentes al tratamiento con agentes
60 quimioterapéuticos solos, anticuerpos solos, radiación sola o combinaciones de los mismos. Los tumores refractarios engloban también tumores que parecen inhibirse por tratamiento con tales agentes, pero que reaparecen hasta 5

años, a veces hasta 10 años o más después de suspender el tratamiento. Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse mediante métodos y composiciones de la divulgación incluyen, pero sin limitación, células cancerosas de vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mama, colon, esófago, gastrointestinal, encía, cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaringe, cuello, ovario, próstata, piel, estómago, testículos, lengua o útero. Además, el cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque sin limitación a estos: neoplasia maligna; carcinoma; carcinoma indiferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiforme; carcinoma microcítico; carcinoma papilar; carcinoma escamoso; carcinoma linfoepitelial; carcinoma basocelular; carcinoma pilomatricial; carcinoma de células transicionales; carcinoma de células transicionales papilares; adenocarcinoma; gastrinoma maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinado; adenocarcinoma trabecular; carcinoma quístico adenoide; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma por poliposis adenomatosa familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide maligno; adenocarcinoma bronquioloalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma adrenocortical; carcinoma endometriode; carcinoma de anejos cutáneos; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistoadenocarcinoma; cistoadenocarcinoma papilar; cistoadenocarcinoma seroso papilar; cistoadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma ductal infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget; carcinoma de células acinares mamarias; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma maligno; tumor estromal ovárico maligno; tecoma maligno; tumor maligno de células de la granulosa y roblastoma maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor maligno de células de Leydig; tumor maligno de células lipídicas; paraganglioma maligno; paraganglioma extramamario maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma maligno en nevo pigmentado gigante; melanoma de células epitelioides; nevo azul maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rabdomiosarcoma; rabdomiosarcoma embrionario; rabdomiosarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto maligno; tumor mixto de Muller; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma maligno; tumor de Brenner maligno; tumor filoide maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma maligno; estruma ovárico maligno; coriocarcinoma; mesonefoma maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor de células gigantes del hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma maligno; cordoma; glioma maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplásmico; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; sarcoma cerebeloso neuroectodérmico primitivo; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfatorio; meningioma maligno; neurofibrosarcoma; neurilemmoma maligno; tumor maligno de células granulares; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; paragranuloma; linfoma linfocítico microcítico maligno; linfoma macrocítico difuso maligno; linfoma folicular maligno; micosis fungoide; otros linfomas no de Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma mastocitario; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfosarcoma; leucemia mieloide; leucemia basófila; leucemia eosinófila; leucemia monocítica; leucemia mastocítica; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide y tricoleucemia.

En particular, el paciente padece un cáncer derivado de origen epitelial. Los ejemplos de tipos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma (incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma y cáncer de células de islote), mesotelioma, schwannoma (incluyendo neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o malignidades linfoides. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer escamoso (p. ej., cáncer escamoso epitelial), cáncer de pulmón incluyendo cáncer pulmonar microcítico (SCLC), cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervicouterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endométrico o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer testicular, cáncer de esófago, tumores del tracto biliar, así como cáncer de cabeza y cuello, así como subtipos de cualquiera de tales cánceres incluyendo, pero sin limitación, los tipos resistentes a quimioterapia, resistentes al platino, avanzados, refractarios y/o recurrentes de los mismos.

Según la divulgación, el anticuerpo de la presente divulgación se administra al paciente con una cantidad terapéuticamente eficaz. Se entiende por una "cantidad terapéuticamente eficaz" una cantidad suficiente del anticuerpo de la presente divulgación para el tratamiento de cáncer a una relación de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente divulgación se decidirá por el médico a cargo dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; momento de administración, vía de

administración y tasa de excreción del compuesto específico empleado; duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el anticuerpo específico empleado y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, es bien conocido en las habilidades de la materia empezar con dosis del compuesto a niveles menores de los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta conseguir el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto al día. Típicamente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente para tratar. Un medicamento contiene típicamente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, típicamente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Se suministra una cantidad eficaz del fármaco habitualmente a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal al día.

En algunas realizaciones, se usa el anticuerpo de la presente divulgación en combinación con un agente quimioterapéutico. Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatrina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (p. ej., calicheamicina, especialmente calicheamicina gammall y calicheamicina omegall (véase, p. ej., Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de enediina cromoproteicos relacionados), aclacinomicinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCINO, morfolinodoxorrubicina, cianomorfolinodoxorrubicina, 2-pirrolinodoxorrubicina, inyección en liposoma de HCl de doxorubicina (DOXIL®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una eptilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores de ácido fólico tales como ácido frofínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucida; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINEO, FILDESIN®); dacarbazona; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®), formulación en nanopartículas manipuladas con albúmina de paclitaxel (ABRAXANE) y doxetaxel (TAXOTERE®); clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatraxato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

En particular, el anticuerpo es útil para restaurar la sensibilidad de las células cancerosas a un agente quimioterapéutico, tal como fármacos antineoplásicos basados en platino. Los ejemplos de fármacos antineoplásicos basados en platino incluyen cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, picoplatino, nedaplatino, triplatinato y lipoplatino.

En particular, el anticuerpo de la presente divulgación se usa en combinación con cisplatino.

En particular, el anticuerpo de la presente divulgación se usa en combinación con un inhibidor de HER.

Como se usa en la presente memoria, "HER" tiene su significado general en la materia y hace referencia a una proteína tirosina cinasa receptora que pertenece a la familia del receptor HER e incluye los receptores EGFR, HER2, HER3 y HER4. Como se usan en la presente memoria, los términos "ErbB1", "HER1", "receptor de factor de crecimiento epidérmico" y "EGFR" se usan intercambiabilmente en la presente memoria y hacen referencia a EGFR como se divulga, por ejemplo, en Carpenter et al. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 881-914 (1987). Como se usan en la presente memoria, los términos "ErbB2" y "HER2" se usan intercambiabilmente en la presente memoria y hacen referencia a la proteína HER2 humana descrita, por ejemplo, en Semba et al., *PNAS (USA)* 82: 6497-6501 (1985) y Yamamoto et al. *Nature* 319: 230-234 (1986) (número de acceso a Genbank X03363). Como se usa en la presente memoria, los términos "ErbB3" y "HER3" hacen referencia al polipéptido receptor como se divulga, por ejemplo, en las pat. de EE. UU. n.º 5.183.884 y 5.480.968 así como Kraus et al. *PNAS (USA)* 86: 9193-9197 (1989). Como se usan en la presente memoria, los términos "ErbB4" y "HER4" hacen referencia al polipéptido receptor como se divulga, por ejemplo, en la sol. de pat. EP n.º 599.274; Plowman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1746-1750 (1993) y Plowman et al., *Nature*, 366: 473-475 (1993). Se entiende por "ligando de HER" un polipéptido que se une a y/o activa un receptor de HER.

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

En particular, el inhibidor de HER es un "anticuerpo anti-HER" que es un anticuerpo que se une a un receptor de HER. En algunas realizaciones, se usa el anticuerpo monoclonal anti-HER de la presente divulgación para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) contra células que expresan HER. En otra realización particular, el anticuerpo anti-HER puede ser adecuado para perturbar la expresión de HER en la superficie celular (p. ej., provocando la internalización de HER) de forma que se limite o inhiba la migración celular, proliferación celular y crecimiento tumoral de células tumorales.

En particular, el anticuerpo anti-HER es un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-HER-fármaco. Un "conjugado de anticuerpo monoclonal anti-HER-fármaco" como se usa en la presente memoria hace referencia a un anticuerpo monoclonal anti-HER según la divulgación conjugado con un agente terapéutico. Tales conjugados de anticuerpo monoclonal anti-HER-fármaco producen efectos clínicamente beneficiosos sobre células tumorales que expresan HER cuando se administran a un sujeto. En particular, se conjuga un anticuerpo monoclonal anti-HER con un agente citotóxico de tal forma que el conjugado de anticuerpo-fármaco resultante ejerza un efecto citotóxico o citostático sobre una célula tumoral que expresa HER cuando se capta o internaliza por la célula. Puede usarse cualquier agente citotóxico bien conocido por el especialista. En particular, el agente citotóxico o citostático es auristatina E (también conocida en la materia como dolastatina-10) o un derivado de la misma. Típicamente, el derivado de auristatina E es, p. ej., un éster formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar auristatina E con ácido para-acetilbenzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados típicos de auristatina incluyen AFP (dimetilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina-p-fenilendiamina), MMAF (dovalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina) y MAE (monometilauristatina E). Se describen la síntesis y estructura de auristatina E y sus derivados en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 20030083263; las publicaciones de patente internacional n.º WO 2002/088172 y WO 2004/010957 y las patentes de EE. UU. n.º 6.884.869; 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444 y 4.486.414.

Las publicaciones de patentes relacionadas con anticuerpos de HER incluyen: pat. de EE. UU. n.º 5.677.171, pat. de EE. UU. n.º 5.720.937, pat. de EE. UU. n.º 5.720.954, pat. de EE. UU. n.º 5.725.856, pat. de EE. UU. n.º 5.770.195, pat. de EE. UU. n.º 5.772.997, pat. de EE. UU. n.º 6.165.464, pat. de EE. UU. n.º 6.387.371, pat. de EE. UU. n.º 6.399.063, US2002/0192211A1, pat. de EE. UU. n.º 6.015.567, pat. de EE. UU. n.º 6.333.169, pat. de EE. UU. n.º 4.968.603, pat. de EE. UU. n.º 5.821.337, pat. de EE. UU. n.º 6.054.297, pat. de EE. UU. n.º 6.407.213, pat. de EE. UU. n.º 6.719.971, pat. de EE. UU. n.º 6.800.738, US2004/0236078A1, pat. de EE. UU. n.º 5.648.237, pat. de EE. UU. n.º 6.267.958, pat. de EE. UU. n.º 6.685.940, pat. de EE. UU. n.º 6.821.515, WO98/17797, pat. de EE. UU. n.º 6.127.526, pat. de EE. UU. n.º 6.333.398, pat. de EE. UU. n.º 6.797.814, pat. de EE. UU. n.º 6.339.142, pat. de EE. UU. n.º 6.417.335, pat. de EE. UU. n.º 6.489.447, WO99/31140, US2003/0147884A1, US2003/0170234A1, US2005/0002928A1, pat. de EE. UU. n.º 6.573.043, US2003/0152987A1, WO99/48527, US2002/0141993A1, WO01/00245, US2003/0086924, US2004/0013667A1, WO00/69460, WO01/00238, WO01/15730, pat. de EE. UU. n.º 6.627.196B1, pat. de EE. UU. n.º 6.632.979B1, WO01/00244, US2002/0090662A1, WO01/89566, US2002/0064785, US2003/0134344, WO 04/24866, US2004/0082047, US2003/0175845A1, WO03/087131, US2003/0228663, WO2004/008099A2, US2004/0106161, WO2004/048525, US2004/0258685A1, pat. de EE. UU. n.º 5.985.553, pat. de EE. UU. n.º 5.747.261, pat. de EE. UU. n.º 4.935.341, pat. de EE. UU. n.º 5.401.638, pat. de EE. UU. n.º 5.604.107, WO

87/07646, WO 89/10412, WO 91/05264, EP 412.116 B1, EP 494.135 B1, pat. de EE. UU. n.º 5.824.311, EP 444.181 B1, EP 1.006.194 A2, US 2002/0155527A1, WO 91/02062, pat. de EE. UU. n.º 5.571.894, pat. de EE. UU. n.º 5.939.531, EP 502.812 B1, WO 93/03741, EP 554.441 B1, EP 656.367 A1, pat. de EE. UU. n.º 5.288.477, pat. de EE. UU. n.º 5.514.554, pat. de EE. UU. n.º 5.587.458, WO 93/12220, WO 93/16185, pat. de EE. UU. n.º 5.877.305, WO 93/21319, WO 93/21232, pat. de EE. UU. n.º 5.856.089, WO 94/22478, pat. de EE. UU. n.º 5.910.486, pat. de EE. UU. n.º 6.028.059, WO 96/07321, pat. de EE. UU. n.º 5.804.396, pat. de EE. UU. n.º 5.846.749, EP 711.565, WO 96/16673, pat. de EE. UU. n.º 5.783.404, pat. de EE. UU. n.º 5.977.322, pat. de EE. UU. n.º 6.512.097, WO 97/00271, pat. de EE. UU. n.º 6.270.765, pat. de EE. UU. n.º 6.395.272, pat. de EE. UU. n.º 5.837.243, WO 96/40789, pat. de EE. UU. n.º 5.783.186, pat. de EE. UU. n.º 6.458.356, WO 97/20858, WO 97/38731, pat. de EE. UU. n.º 6.214.388, pat. de EE. UU. n.º 5.925.519, WO 98/02463, pat. de EE. UU. n.º 5.922.845, WO 98/18489, WO 98/33914, pat. de EE. UU. n.º 5.994.071, WO 98/45479, pat. de EE. UU. n.º 6.358.682 B1, US 2003/0059790, WO 99/55367, WO 01/20033, US 2002/0076695 A1, WO 00/78347, WO 01/09187, WO 01/21192, WO 01/32155, WO 01/53354, WO 01/56604, WO 01/76630, WO02/05791, WO 02/11677, pat. de EE. UU. n.º 6.582.919, US2002/0192652A1, US 2003/0211530A1, WO 02/44413, US 2002/0142328, pat. de EE. UU. n.º 6.602.670 B2, WO 02/45653, WO 02/055106, US 2003/0152572, US 2003/0165840, WO 02/087619, WO 03/006509, WO03/012072, WO 03/028638, US 2003/0068318, WO 03/041736, EP 1.357.132, US 2003/0202973, US 2004/0138160, pat. de EE. UU. n.º 5.705.157, pat. de EE. UU. n.º 6.123.939, EP 616.812 B1, US 2003/0103973, US 2003/0108545, pat. de EE. UU. n.º 6.403.630 B1, WO 00/61145, WO 00/61185, pat. de EE. UU. n.º 6.333.348 B1, WO 01/05425, WO 01/64246, US 2003/0022918, US 2002/0051785 A1, pat. de EE. UU. n.º 6.767.541, WO 01/76586, US 2003/0144252, WO 01/87336, US 2002/0031515 A1, WO 01/87334, WO 02/05791, WO 02/09754, US 2003/0157097, US 2002/0076408, WO 02/055106, WO 02/070008, WO 02/089842, WO 03/86467, WO2013164689, WO2012059857.

En particular, el inhibidor de HER es una molécula orgánica pequeña. Como se usa en la presente memoria, la expresión "molécula orgánica pequeña" hace referencia a una molécula de tamaño comparable a las moléculas orgánicas usadas generalmente en medicamentos. El término excluye macromoléculas biológicas (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos, etc.); las moléculas orgánicas pequeñas preferidas oscilan en tamaño hasta 2000 Da, y lo más preferiblemente hasta aproximadamente 1000 Da.

En particular, el inhibidor de HER es un inhibidor de tirosina cinasa. Un "inhibidor de tirosina cinasa" es una molécula que inhibe la actividad tirosina cinasa del receptor HER. Los ejemplos de tales inhibidores incluyen la molécula orgánica pequeña inhibidora de tirosina cinasa HER2 tal como TAK165 disponible en Takeda; CP-724.714, un inhibidor selectivo oral de la tirosina cinasa receptora ErbB2 (Pfizer y OSI); inhibidores de HER duales tales como EKB-569 (disponible en Wyeth) que se une preferentemente a EGFR pero inhibe células que sobreexpresan tanto HER2 como EGFR; GW572016 (disponible en Glaxo) un inhibidor de tirosina cinasa de HER2 y EGFR; PKI-166 (disponible en Novartis); inhibidores pan-HER tales como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de HER no selectivos tales como mesilato de imatinib (Gleevec™); el inhibidor de cinasa I regulada por MAPK extracelular CI-1040 (disponible en Pharmacia); quinazolininas tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino)quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidinas; curcumina (4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida de diferuloilmetano); tirfostinas que contienen restos nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); quinoxalinas (pat. de EE. UU. n.º 5.804.396); trifostinas (pat. de EE. UU. n.º 5.804.396); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores pan-HER tales como CI-1033 (Pfizer); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: pat. de EE. UU. n.º 5.804.396; WO99/09016 (American Cyanamid); WO98/43960 (American Cyanamid); WO97/38983 (Warner Lambert); WO99/06378 (Warner Lambert); WO99/06396 (Warner Lambert); WO96/30347 (Pfizer, Inc); WO96/33978 (Zeneca); WO96/3397 (Zeneca) y WO96/33980 (Zeneca).

En particular, el inhibidor de HER es un inhibidor de EGFR. Los inhibidores de GFR son bien conocidos en la materia (Inhibitors of erbB-1 kinase; Expert Opinion on Therapeutic Patents Dec 2002, Vol. 12, n.º 12, páginas 1903-1907, Susan E Kane. Cancer therapies targeted to the epidermal growth factor receptor and its family members. Expert Opinion on Therapeutic Patents Feb 2006, Vol. 16, n.º 2, páginas 147-164. Peter Traxler Tyrosine kinase inhibitors in cancer treatment (Part II). Expert Opinion on Therapeutic Patents Dic 1998, Vol. 8, n.º 12, páginas 1599-1625). Los ejemplos de tales agentes incluyen anticuerpos y moléculas orgánicas pequeñas que se unen a EGFR. Los ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase la pat. de EE. UU. n.º 4.943.533, Mendelsohn et al.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225 o cetuximab; ERBUTIX®) y 225 humano reconformado (H225) (véase el documento WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); IMC-11F8, un anticuerpo orientado a EGFR totalmente humano (Imclone); anticuerpos que se unen a EGFR mutante de tipo II (pat. de EE. UU. n.º 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR como se describe en la pat. de EE. UU. n.º 5.891.996 y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, tales como ABX-EGF (véase el documento WO98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A: 636-640 (1996)); EMD7200 (matuzumab), un anticuerpo de EGFR humanizado dirigido contra EGFR que compite tanto con EGF como TGF-alfa por la unión a EGFR y mAb 806 o mAb 806 humanizado (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29): 30375-30384 (2004)). El anticuerpo anti-EGFR puede conjugarse con un agente citotóxico, generando por tanto un inmunocombinado (véase, p. ej., el documento EP659.439A2, Merck Patent GmbH). Los ejemplos de moléculas orgánicas pequeñas que se unen a EGFR

incluyen ZD1839 o gefitinib (IRESSA™; Astra Zeneca); CP-358774 o erlotinib (TARCEVA™; Genentech/OSI) y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen); EMD-7200. En particular, el inhibidor de HER es una molécula orgánica pequeña inhibidora pan-HER tal como dacomitinib (PF-00299804).

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

15 El anticuerpo de la presente divulgación se combina típicamente con excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente matrices de liberación mantenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones farmacéuticas. "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" hacen referencia a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra indeseada cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable hace referencia a una carga, diluyente, material encapsulante o auxiliar de formulación sólido, semisólido o
 20 líquido no tóxico de cualquier tipo. En las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, puede administrarse el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales a animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o
 25 soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal. Típicamente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de inyectarse. Estos pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas estériles (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales) o composiciones secas, especialmente liofilizadas que, tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables. Las
 30 formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Pueden prepararse soluciones que comprenden compuestos de la divulgación como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezclados adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los
 35 mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. El anticuerpo puede formularse en una composición en forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos hidroc্লórico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres pueden derivar también de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. El portador puede ser también un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso
 40 de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede causarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Puede causarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Se preparan soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del anticuerpo activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan las dispersiones mediante la incorporación de los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes
 45 requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y liofilización que procuran un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución del mismo esterilizada por filtración anteriormente. Tras la formulación, se administrarán las soluciones de manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad como sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se
 50
 55
 60

administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descrito anteriormente, pero pueden emplearse también cápsulas de liberación de fármaco y similares. Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debería estar adecuadamente tamponada si es necesario y volverse primero el diluyente líquido isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, serán conocidos por los especialistas en la materia medios acuosos estériles que pueden emplearse a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, podría disolverse una dosificación en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio de infusión propuesto. Aparecerá necesariamente cierta variación en la dosificación dependiendo de la condición del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

La divulgación se ilustrará además por las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deberían interpretarse de ningún modo como limitantes del alcance de la presente divulgación.

FIGURAS:

15 **Figura 1: NTSp27-7.4 inhibe la inhibición de la proliferación de CHO que sobreexpresan NTSR1 inducida por NTS o de medios acondicionados de células de cáncer de pulmón que sobreexpresan NTS.** Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes.

20 **Figura 2: NTSp27-7.4 inhibe la invasión celular inducida por EGF y NTS en células de cáncer de mama.** Sinergia entre NTS y EGF sobre la invasión en un ensayo de invasión de colágeno 1 de células MCF-7 y NTS-1. Se sembraron las células en la parte superior de un gel de colágeno de tipo 1 y se trataron con EGF (100 ng/ml). Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos. Recuadro, análisis de transcritos de NTS y NTSR1 a partir de 200 ng de ARN total de MCF-7 y NTS-h.

25 **Figura 3. NTSp27-7.4 inhibe la invasión celular inducida por NTS en carcinoma hepatocelular.** A) Migración en un ensayo de invasión de colágeno 1 de células Hep 3B, HepR1a y HepR2b. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos. Los resultados se expresan como el % de células invasivas de las células de control, Hep3B. Recuadro, análisis del transcritos de NTS y NTSR1 a partir de 200 ng de ARN total de Hep 3B, HepR1a y HepR2b. B) Migración en un ensayo de invasión de colágeno de tipo 1 de células Hep 3B, HepR1a y HepR2b en presencia de 3,75 μ g/ml de NTSp27-7.4 purificado o IgG de ratón. Los resultados representan la media \pm EEM de 3 experimentos. Los resultados se expresan como el % de células invasivas de las células de control respectivas.

30 **Figura 4. NTSp27-7.4 inhibe el crecimiento tumoral experimental generado por estirpes celulares de cáncer de pulmón.** A) Se inyectaron células LNM-R o R-SI NTSR1 (LNM-R expresan ARNbc para NTSR1) en el flanco izquierdo y derecho de los ratones, respectivamente. Se muestra aquí un ejemplo de un ratón de cada grupo después de 15 días de tratamiento. B) Crecimiento tumoral generado por células LNM-R (flanco izquierdo) xenoinjertadas en ratones atímicos y tratadas durante 15 días con PBS o NTSp27-7.4 15 mg/kg. El día 1, se asignaron aleatoriamente 10 y 8 ratones con tumores de LNM-R de tamaño que alcance aproximadamente 40 mm³ al grupo de control y de NTSp27-7.4, respectivamente. Se trataron los ratones cada dos días y se midieron cada día. C) Crecimiento tumoral generado por células R-SI NTSR1 (flanco derecho) xenoinjertadas en los mismos ratones. D y E) Tasa de crecimiento tumoral desde el día 1 generado por células LNM-R (flanco izquierdo) y células R-SI NTSR1 (flanco derecho).

35 **Figura 5. NTSp27-7.4 inhibe el crecimiento tumoral experimental generado por estirpes celulares de cáncer de mama.** Crecimiento tumoral generado por células MDA-MB 231 (flanco izquierdo) (A) y células MDA Si2 (flanco derecho) (B), y tratadas durante 24 días con PBS o NTSp26-8.2 15 mg/kg. El día 1, se asignaron aleatoriamente 7 y 6 ratones con tamaño de tumores de MDA-MB231 que alcanza aproximadamente 50 mm³. Se trataron los ratones y se midieron cada dos días.

40 **Figura 6. NTSp27-7.4 restaura la respuesta a cisplatino en estirpes celulares de cáncer de pulmón que expresan NTS y NTSR1.** A) Se inyectaron células LNM-R o R-SI NTSR1 (LNM-R expresa ARNbc para NTSR1) en los flancos izquierdo y derecho de los ratones, respectivamente; se trataron los ratones con PBS o NTSp27-7.4 15 mg/kg cada dos días y/o con cisplatino 1 mg/kg el día 1, 3, 5, 7, 15, 17 y 19. El día 1, se asignaron aleatoriamente 9 y 8 ratones con tamaño de tumores de LNM-R que alcanza aproximadamente 95 mm³ de promedio. Se trataron los ratones cada dos días y se midieron cada día. B) Tasa de crecimiento tumoral desde el día 1 generada por células R-SI NTSR1 (flanco derecho).

45 **Figura 7. NTSp27-7.4 induce la apoptosis en estirpes celulares de cáncer de ovario que expresan NTS y NTSR1.** A) Análisis del transcritos de NTS, NTSR2 y NTSR1 a partir de 100 ng de ARN total de A2780 y SKOV3. B) Se usó el kit de detección de apoptosis Annexin-V-FITC (Roche) para detectar la apoptosis mediante citometría de flujo. (Izquierda) Ejemplo de análisis FACS en células tratadas o no con 50 μ g/ml de NTS p27-7.4 durante 24 h. (Derecha) Niveles de apoptosis de células tratadas con NTS p27-7.4 presentados como aumento en veces respecto a la apoptosis de células no tratadas, n= 3.

Figura 8. NTSp27-7.4 restaura la respuesta al cisplatino en estirpes celulares de cáncer de ovario que expresan NTS y NTSR1. Se inyectaron 3 millones de células A2780 en ratones. Cuando los tumores generados por A2780 alcanzaron un volumen promedio de 200 mm³, se asignaron aleatoriamente los ratones en 4 grupos. Se trataron los ratones con PBS o NTSp27-7.4 15 mg/kg cada dos días y/o con cisplatino 1 mg/kg al día los días 1, 3, 5 y 7. Los resultados son la media de 8 a 12 ratones efectuadas en dos experimentos independientes diferentes.

EJEMPLOS:

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

Etapas 0: Síntesis y conjugación de péptidos

10 Para inhibir la acción oncogénica de NTS, se produjo anticuerpo monoclonal de NTS dirigido contra el fragmento largo de NTS (SEQ ID NO:9: mmagmkiqlv cmlllafssw slcsdseeem kaleadfltn mhtskiskah vpswkmtiln vcslnvnlms paeetgevhe eelvarrklp taldfgslea mltiyqlhki chsrafqhwe liqedildtg ndkngkeevi krkipyilkr **qlyenkprp yilkrdsyyy**). La secuencia peptídica antigénica elegida fue SEQ ID NO:10 (CQLYENKPRRPYIL-amida PM1792,2). 1. Se controló la síntesis peptídica por MS y HPLC. El péptido usado era la forma liofilizada como sal de TFA y conjugada con BSA.

15 **Etapas 1: Inmunización**

Se inmunizaron 5 ratones con el antígeno.

DO_{405 nm} después de 15 min de incubación con el sustrato.

Se recubrieron las placas ELISA con conjugado p12027-BSA 50 µl/pocillo (concentración 4 µg/ml).

Dilución de antisuero	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4	Ratón 5	Suero normal
1:100	2,282	2,236	2,110	2,262	2,364	0,019
1:200	2,278	2,260	2,207	2,281	2,332	0,015
1:400	2,404	2,372	2,346	2,404	2,262	0,011
1:800	2,423	2,381	2,488	2,475	2,292	0,009
1:1600	2,306	2,236	2,400	2,391	2,016	0,015
1:3200	2,058	2,018	2,285	2,199	1,726	0,008
1:6400	1,668	1,620	1,927	1,866	1,286	0,000
1:12800	1,198	1,183	1,451	1,426	0,885	0,000

20 La prueba funcional era la inhibición de cambios morfológicos de CHO que sobreexpresan establemente NTSR1 e inducida por 10⁻⁸ o 10⁻⁷ M JMV449, un agonista de NTS degradable semanalmente, o el medio de cultivo de células LNM35 que expresan NTS y NTSR1. Los resultados eran los siguientes: el suero de los ratones n.º 3 y 5 inhibía los cambios de morfología un 15 y 10 %, respectivamente, y el ratón n.º 1 solo un 5 % en comparación con el suero preinmune. El suero de los ratones 2 y 4 no inhibía los cambios de morfología.

25 **Etapas 2: Fusión**

Se seleccionaron los ratones 3 y 5. Dos clones eran positivos después de la primera prueba de clonación. Se probaron los clones 1-5, 7-4.

Se efectuaron dos pruebas 1) la prueba de cambios de morfología de CHO NTSR1 inducidos por NTS y 2) la prueba de invasión en matrices de colágeno de tipo I de células MCF-7 que sobreexpresan NTS. El experimento se repitió 2 veces.

30 El clon 1.5 inhibía el efecto de NTS en ambas pruebas de un 50 a un 60 %, y el clon 7.4 inhibía el efecto de NTS en ambas pruebas de un 10 a un 20 % según el control.

Desgraciadamente, el clon 1.5 era muy inestable y se perdió.

Etapa 3: Selección final

Finalmente, se seleccionó el hibridoma del clon 7.4 (concretamente NTSp27-7.4). Se purificó el anticuerpo y se probó en un ensayo de proliferación de CHO NTSR1, ensayo de invasión de células de cáncer de mama que expresan o no NTS y carcinoma hepatocelular que expresa o no NTSR1. Se probó también NTSp27-7.4 sobre el crecimiento tumoral de células de cáncer de mama y pulmón, y sobre la respuesta al cisplatino en el modelo de cáncer de pulmón (véase la sección de resultados).

Etapa 4: Clonación y secuenciación

Se preparó el ARN total a partir de 2×10^7 células del primer tubo proporcionado por cada hibridoma usando el minikit Qiagen RNeasy (n.º de cat.: 74104). Se eluyó el ARN en 60 µl de agua y se comprobó en un gel de agarosa al 1,2 % al lado de marcadores Qarta Bio 1Kb (cat: M-DNA-1Kb). Se prepararon ADNc de V_H y V_K usando transcriptasa inversa con cebadores de IgG y región constante kappa. Se amplificaron los ADNc de la primera hebra por PCR usando un gran conjunto de cebadores de secuencia señal. Se purificaron en gel los ADN amplificados y se clonaron en el vector pGem T Easy (Promega). Se cribaron en los clones V_H y V_K obtenidos las inserciones del tamaño esperado. Se determinó la secuencia de ADN de clones seleccionados con referencia a otras secuencias de anticuerpo (Kabat EA *et al.*, 1991)

Se identificó una única secuencia de V_K productiva en 10 clones (8 independientes). Las secuencias eran idénticas aparte de un único cambio de base en un clon en posición 33 y un único cambio de base en otro clon en posición 315. Se encontraron también una V_K aberrante no productiva con un error en la unión V-J y la secuencia de V_K aberrante que surge del copartícipe de fusión. Se muestra la secuencia de proteína deducida con las CDR anotadas en la Tabla A.

Se identificó una única secuencia de V_H . Se encontró una secuencia idéntica en 6 clones independientes aparte de 2 únicos cambios de base en los residuos 22 y 243 en un clon, un único cambio de base en un clon en posición 103 y un único cambio de base en otro clon en posición 261. Se muestra la secuencia proteica deducida con las CDR anotadas en la Tabla A.

Tabla A: Secuencias del anticuerpo NTSp27-7.4

Dominio	Secuencias
VH	DVKLVESGGGLVKLGGSLKLSAAS <u>GFTFSGYYMS</u> WVRQTPEKRLELVA <u>AINNYGDNTNYPDTVKG</u> RFSVSRDNAKNTLYLEMNSLKSEDTALYYCAR <u>LANYANQRG</u> <u>AMDY</u> WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:1)
H-CDR1	GFTFSGYYMS (SEQ ID NO:2)
H-CDR2	AINNYGDNTNYPDTVKG (SEQ ID NO:3)
H-CDR3	LANYANQRGAMDY (SEQ ID NO:4)
VL	DIQMTHTTSSLSASLGDRVTIS <u>RASQDIANYLN</u> WYQQKPDGTVTLII <u>YTSRLHS</u> GVPSRFSGSGSGTDYSLT INNLQEDIATYFC <u>QQGYTLPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:5)
L-CDR1	RASQDIANYLN (SEQ ID NO:6)
L-CDR2	YTSRLHS (SEQ ID NO:7)
L-CDR3	QQGYTLPPT (SEQ ID NO:8)

Ejemplo 2: Ensayos funcionales:**Material y métodos:****Proliferación celular**

5 Se sembraron 20.000 células CHO-NTSR1 en placa de 48 pocillos, en 200 μ l de medio con 10 % de FCS. Al día siguiente, se trataron las células con neurotensina 10^{-7} M o medios acondicionados $\frac{1}{2}$ LNM-R que se preincubaron durante 2 h a temperatura ambiente en presencia o no de 2,8 μ g de anticuerpo P27-7.4. Se prepararon los medios acondicionados como sigue. Se sembraron 3 millones de células LNM-R en un matraz de 75 cm^2 en medios con 10 % de FCS. Se dejaron crecer las células durante 24 h, se retiraron los medios y se añadieron 10 ml de medios libres de suero. Se recogieron los medios y se centrifugaron 5 min a 500 g después de 48 h. Se tomaron alícuotas del sobrenadante y se congelaron a -20 °C hasta usarse. Se trataron las células durante 40 h con 200 μ l de medios con 2,5 % de FCS. Se evaluó la proliferación celular contando usando el recuento celular de Beckman Coulter.

Ensayo de invasión

15 Se recubrió el inserto de cultivo celular (8 μ m, Beckton Dickinson®) con colágeno de tipo I (100 μ l/pocillo, 4×10^2 μ g/ml, Sigma®) a 37 °C 24 h antes del ensayo. Se sembraron 1 millón de células MCF, NTS-h, Hep 3B, HepR1a y HepR2b en el inserto con 250 μ l de medio libre de suero en presencia o ausencia de 7 μ g de anticuerpos NTSp27-7.4. Fuera del inserto, se añadieron 750 μ l de medio con 10 % de FCS en el pocillo como quimioattractor. Después de 48 h de incubación, se retiraron las células no invasoras y el colágeno de la superficie superior de la membrana frotando con un hisopo de algodón. Se fijaron las células invasoras (aquellas que se adhieren a la superficie inferior de la membrana), se tiñeron con el kit de tinción Kwif diff (Thermo®) y se contó el número de células teñidas con un microscopio invertido a 200x aumentos.

Xenoinjertos tumorales

25 Se inocularon por vía subcutánea 1×10^6 células LMN-R y 1×10^6 R-SI NTSR1 en ratones NMRI nu/nu, LMN-R en el flanco izquierdo y R-SI NTSR1 en el flanco derecho. Cuando los tumores generados por LMN-R alcanzaron un volumen promedio de 40 mm^3 , se asignaron aleatoriamente los ratones a 2 grupos y se administró entonces anticuerpo NTSp27-7.4 (i.p. cada dos días, 15 mg/kg) para un total de 8 veces. Se usó PBS como control de vehículo. Se midió diariamente el volumen de tumor.

30 Se inocularon por vía subcutánea 3×10^6 células MDA-MB 231 y 3×10^6 MDA si2 en 100 μ l de Matrigel en el flanco izquierdo y el flanco derecho de los ratones NMRI nu/nu, respectivamente. Cuando los tumores generados por MDA alcanzaron un volumen promedio de 50 mm^3 , se asignaron aleatoriamente los ratones a 2 grupos y se administró entonces anticuerpo NTSp27-7.4 (i.p. cada dos días, 15 mg/kg) para un total de 12 veces. Se usó PBS como control de vehículo.

35 Prueba de cisplatino, se inocularon por vía subcutánea 1×10^6 células LMN-R y 1×10^6 R-SI NTSR1 en ratones NMRI nu/nu, LMN-R en el flanco izquierdo y R-SI NTSR1 en el flanco derecho. Cuando los tumores generados por LMN-R alcanzaron un volumen promedio de 95 mm^3 , se asignaron aleatoriamente los ratones a 5 grupos de 8 a 10 ratones. Se administró al grupo 1 PBS, al grupo 2 anticuerpo NTSp27-7.4 (i.p. cada dos días, 15 mg/kg) para un total de 13 veces y al grupo 3 IgG de ratón (i.p. cada dos días, 15 mg/kg). Se administró al grupo 4 PBS y cisplatino (1 mg/kg los días 1, 3, 5, 7, 15, 17 y 19) y a los grupos 5 anticuerpo NTSp27-7.4 (i.p. cada dos días, 15 mg/kg) y cisplatino (1 mg/kg los días 1, 3, 5, 7, 15, 17 y 19). Se midió el volumen de tumor cada dos días.

Análisis de FACS

40 Se usó el kit de detección de apoptosis Annexin-V-FITC (Roche) para detectar la apoptosis por citometría de flujo. Se expusieron las células o no a NTS p27-7.4 50 μ g/ml en 0,5 % de FCS durante 24 h. Se recolectaron las células por Accutase (incluyendo las células desprendidas) y se detectaron en un citómetro de flujo (BD LSR II).

45 Se combinaron células A2780 (3×10^6) con 50 μ l de PBS y 50 μ l de Matrigel y se inyectaron entonces por vía subcutánea en la pata trasera derecha de ratones NMRI-Nude Foxn1 hembra de 4 semanas de edad. El tratamiento empezó cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 200 mm^3 . Se calculó el volumen tumoral cada dos días usando la siguiente ecuación: volumen tumoral (mm^3) = $\frac{4}{3} \times \pi \times (\text{longitud}/2) \times (\text{anchura}/2) \times (\text{altura}/2)$. Después del tratamiento, se sacrificaron los ratones y se fijaron los tumores en formalina.

Resultados:**Neutralización de la inhibición de la proliferación inducida por NTS de CHO que sobreexpresan NTSR1.**

50 Las células LNM-R expresaban NTS y NTSR1. La NTS se libera a los medios y se ensayó por radioinmunoensayo. El medio de cultivo (CM) de células LNM-R contenía $76,4 \pm 10,3$, $153,2 \pm 25,3$ y $624,3 \pm 81,8$ fmol/ml de NTS correspondiente a 14, 48 y 72 horas de cultivo, respectivamente. Cuando las células CHO que sobreexpresan NTSR1 se exponen a NTS, las células cambian de forma, lo que induce una disminución de la tasa de proliferación. En la figura 1, el crecimiento celular se reduce un 60 % cuando las células se tratan con NTS o CM, cuando se añade el

anticuerpo monoclonal purificado NTSp27-7.4 a los medios se reduce esta inhibición del crecimiento celular un 30 % y 26 % para las células tratadas con NTS o CM, respectivamente.

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

5 Se transfectó establemente la estirpe celular de cáncer de mama, MCF-7 que expresa constitutivamente NTSR1, con la secuencia de codificación de longitud completa de neurotensina. Se seleccionó un clon que sobreexpresa NTS, NTS-h (inserto de la Figura 2). Se estudiaron las propiedades de invasividad de NTS-h usando un ensayo de invasión de colágeno tridimensional. La expresión ectópica de NTS de células MCF-7 inducía un pequeño aumento de las propiedades de invasividad. La invasión inducida por EGF se triplicaba en células que sobreexpresan NTS en comparación con MCF-7 (Figura 2). Se inhibió la inducción de la invasividad inducida o no por EGF por NTSp27-7.4 solo en los clones que sobreexpresan NTS. Esto confirma las propiedades neutralizantes del anticuerpo monoclonal de NTS NTSp27-7.4.

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

15 Hep3B es un carcinoma hepatocelular que expresa constitutivamente NTS pero no NTSR1. Se transfectaron establemente las células Hep3B con la secuencia de codificación de NTSR1 y se seleccionaron dos clones, Hep-R1a y Hep-R1b (inserto de la Figura 3A). Se estudiaron las propiedades de invasividad de las células usando un ensayo de invasión de colágeno tridimensional. La expresión ectópica de NTSR1 aumentaba en gran medida las propiedades invasivas de las células como se muestra en la Figura 3A. Cuando las células se expusieron a NTSp27-7.4, se redujo la tasa invasiva de las células que expresan NTS y NTSR1, y más drásticamente para las células para las que el aumento de la tasa invasiva era moderado, Hep-R1a. Ambos resultados confirman las propiedades de neutralización de este anticuerpo de NTS sobre la invasividad celular.

NTSp27-7.4 reducía el crecimiento tumoral específicamente en tumor que expresa NTS y NSTR1.

25 Se probó la eficacia de NTSp27-7.4 para disminuir el crecimiento tumoral en tumores experimentales de cáncer de pulmón generados por células que expresan LNM-R, células que expresan NTS y NTSR1 o células R-SI NTSR1 que expresan solo NTS. Las células R-SI NTSR1 son un clon obtenido de LNM-R y transfectado establemente con ARNbc de NTSR1. Se injertaron los ratones con ambas estirpes celulares. Células LNM-R en el flanco izquierdo y células R-SI NTSR1 en el flanco derecho (Figura 4A). Se asignaron aleatoriamente los ratones con tumores de LNM-R de $42 \pm 11 \text{ mm}^3$ y $43 \pm 8 \text{ mm}^3$ al grupo tratado con PBS y NTSp27-7.4, respectivamente. El tamaño tumoral de los animales tratados con NTSp27-7.4 era 2,6 veces menor en comparación con los controles (Figura 4B). El tiempo de duplicación después de 16 días de tratamiento era de $3,43 \pm 0,34$ y $5,11 \pm 0,38$ días para animales tratados con control y NTSp27-7.4, respectivamente. El crecimiento desde D1 era de $24,68 \pm 4,05$ veces para animales tratados con PBS y solo de $8,22 \pm 1,84$ para animales tratados con NTSp27-7.4 (figura 4D). Se confirmaron la especificidad y eficacia del anticuerpo cuando se analizaron los tumores que portan NTSR1 no expresado, en los mismos ratones. Para los tumores de R-I NTSR1, el tamaño del tumor y la tasa de crecimiento no eran diferentes si los ratones se trataban con PBS o NTSp27-7.4 (Figura 4C y 4E).

35 En la misma línea, se mostró también que NTSp27-7.4 reduce eficazmente el crecimiento tumoral generado por células de cáncer de mama. Se xenoinjertaron MDA-MD 231 que expresan NTS y NTSR1 y su subclón MDA Si2 transfectado establemente con sh NSTR1 en el flanco de ratones. Células MDA-MD 231 en el flanco izquierdo y células MDA Si2 en el flanco derecho. Se inyectaron células MDA Si2 unos pocos días antes de MDA MD 231. Se asignaron aleatoriamente los ratones con tumores de MDA-MB231 como sigue: $52 \pm 10 \text{ mm}^3$ para el grupo de control y $50,7 \pm 6,3 \text{ mm}^3$ para el grupo de NTSp27-7.4. La Figura 5A muestra una fuerte reducción del crecimiento tumoral de MDA-MB231 de células por NTSp27-7.4 en comparación con animales tratados con PBS. La tasa de crecimiento desde D1 era de $4,4 \pm 0,33$ veces para animales tratados con PBS y solo de $1,5 \pm 0,1$ para animales tratados con NTSp27-7.4. El tiempo de duplicación después de 24 días de tratamiento era de $11,63 \pm 1$ y $52,8 \pm 17,6$ días para los animales tratados con control y NTSp27-7.4, respectivamente. Los mismos parámetros analizados en los tumores MDA Si2 (NTSR1-) no mostraron diferencia entre los tamaños tumorales (Figura 5B), la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación.

NTSp27-7.4 restaura la respuesta a cisplatino

50 Se probó la capacidad de NTSp27-7.4 de restaurar la respuesta a cisplatino sobre tumores experimentales de cáncer de pulmón generados por células que expresan LNM-R, células que expresan NTS y NTSR1 o células R-SI NTSR1 que expresan solo NTS. Se injertaron los ratones con ambas estirpes celulares. Células LNM-R en el flanco izquierdo y células R-SI NTSR1 en el flanco derecho.

55 Se asignaron aleatoriamente ratones con tumores LNM-R de $96,3 \pm 18,5$, $96,4 \pm 14,2$, $91,3 \pm 14,9$, $92,9 \pm 10,6$ y $91,4 \pm 10,1 \text{ mm}^3$ al grupo tratado con PBS, NTSp27-7.4, PBS y cisplatino, NTSp27-7.4 y cisplatino o IgG de ratón, respectivamente. Debido al gran tamaño de los tumores, se detuvo el experimento después de 21 días para el grupo de control, 23 días para el grupo de IgG y PBS, 25 días para el grupo de NTSp27-7.4 y 27 días para el grupo de NTSp27-7.4 y cisplatino. Para los tumores de LNM-R, se muestra el tamaño del tumor con el tiempo en la figura 6A. Como los tumores de R-SI NTSR1 no pudieron asignarse aleatoriamente, se presenta el resultado como relación de crecimiento a D1 (Figura 6B).

La tasa de crecimiento tumoral de LNM-R no se alteraba por el tratamiento con cisplatino o IgG purificada, en comparación con los ratones tratados con PBS (Figura 6A). Como se muestra anteriormente, cuando se tratan animales con NTSp27-7.4, el tamaño del tumor de LNM-R es menor. El tamaño del tumor se estabiliza cuando los tumores se tratan con NTSp27-7.4 y cisplatino (Figura 6A).

- 5 El tamaño del tumor de R-SI NTSR1 disminuye cuando los animales se tratan con cisplatino, indicando que el complejo NTS/NTSR1 está implicado en la resistencia celular al cisplatino (Figura 6B). Como se esperaba, el tratamiento combinado con NTSp27-7.4 no cambia la tasa de crecimiento tumoral.

Neutralización de la apoptosis inducida por NTS de células de cáncer de ovario que expresan NTSR1.

- 10 A 2780 y SKOV3 son células de carcinoma de ovario que expresan constitutivamente NTS, NTSR1 y NTSR2 como se muestra en la figura 7A. Se midió la apoptosis inducida por anticuerpo de NTS por tinción con Annexin V-FITC/PI después de tratar las células con NTS p27-7.4 durante 24 horas, seguido de análisis de clasificación celular activada por fluorescencia. Los ajustes de ventana distinguen entre células vivas (abajo a la izquierda), necróticas (arriba a la izquierda), apoptóticas tempranas (abajo a la derecha) y apoptóticas tardías (arriba a la derecha). Las representaciones de puntos bidimensionales muestran un aumento de los puntos fluorescentes en células apoptóticas tempranas y apoptóticas tardías en ambas estirpes celulares. Los niveles de apoptosis inducida por NTS p27-7.4 presentados como aumento en veces con respecto a las células de control son de 2,5 % y 8,2 % para las células A2780 y SKOV3, respectivamente (Figura 7B).

- 20 Se probó la capacidad de NTSp27-7.4 de restaurar la respuesta a cisplatino en tumores experimentales de cáncer de ovario generados por células A 2780 que expresan NTS y NTSR1. Se asignaron aleatoriamente los ratones como siguen $201,3 \pm 33,8$, $217,15 \pm 47,6$, $203,5 \pm 32,6$ y $205,9 \pm 46,5$ mm³ al grupo tratado con PBS, NTSp27-7.4, PBS y cisplatino, o NTSp27-7.4 y cisplatino, respectivamente. Las tasas de crecimiento del tumor de A2780 estaban ligera pero no significativamente alteradas por el tratamiento con cisplatino en comparación con los ratones tratados con PBS (Figura 8). Cuando se tratan los animales con NTSp27-7.4, el tamaño del tumor de A2780 era menor, $2062 \pm 371,5$ mm³, y $1280 \pm 262,0$ mm³ para el grupo tratado con PBS y NTSp27-7.4, respectivamente, $p = 0,054$ frente al grupo de PBS. La tasa de crecimiento tumoral es más reducida cuando los animales se tratan con NTS p27-7.4 y cisplatino a $870,75 \pm 92,8$ mm³ $p = 0,0058$ frente al grupo de cisplatino (Figura 8).

En conclusión, los tratamientos con NTSp27-7.4 restauran la sensibilidad al cisplatino de las células que expresan NTS y NTSR1, y pueden proponerse a pacientes con NSLCL y cáncer de ovario que expresan altos niveles de NTSR1.

REFERENCIAS:

- 30 1. Carraway, R. y Leeman, S. E. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 6854-6861.
2. Rosell, S. (1980) *Soc. Gen. Physiol Ser.* 35, 147-162.
3. Rosell, S., Al-Saffar, A. y Thor, K. (1984) *Scand. J. Gastroenterol. Suppl* 96, 69-75.
4. Vincent, J. P., Mazella, J. y Kitabgi, P. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 302-309.
5. Thomas, R. P., Hellmich, M. R., Townsend, C. M., Jr. y Evers, B. M. (2003) *Endocr. Rev.* 24, 571-599.
- 35 6. Wu, Z., Martinez-Fong, D., Tredaniel, J. y Forgez, P. (2012) *Front Endocrinol. (Lausanne)* 3, 184.
7. Dupouy, S., Mourra, N., Doan, V. K., Gompel, A., Alifano, M. y Forgez, P. (2011) *Biochimie* 93, 1369-1378.
8. Alifano, M., Souaze, F., Dupouy, S., Camilleri-Broet, S., Younes, M., hmed-Zaid, S. M., Takahashi, T., Cancellieri, A., Damiani, S., Boaron, M. et al. (2010) *Clin. Cancer Res.* 16, 4401-4410.
- 40 9. Dupouy, S., Viardot-Foucault, V., Alifano, M., Souaze, F., Plu-Bureau, Chaouat, M., Lavour, A., Hugol, D., Gespach, C., Gompel, A. et al. (2009) *PLoS. One.* 4, e4223.
10. Shimizu, S., Tsukada, J., Sugimoto, T., Kikkawa, N., Sasaki, K., Chazono, H., Hanazawa, T., Okamoto, Y. y Seki, N. (2008) *Int. J. Cancer* 123, 1816-1823.
11. Guha, S., Rey, O. y Rozengurt, E. (2002) *Cancer Res.* 62, 1632-1640.
12. Heakal, Y., Woll, M. P., Fox, T., Seaton, K., Levenson, R. y Kester, M. (2011) *Cancer Biol. Ther.* 12, 427-435.
- 45 13. Ishizuka, J., Townsend, C. M., Jr. y Thompson, J. C. (1993) *Ann. Surg.* 217, 439-445.
14. Somai, S., Gompel, A., Rostene, W. y Forgez, P. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 482-488.
15. Souaze, F., Dupouy, S., Viardot-Foucault, V., Bruyneel, E., Attoub, S., Gespach, C., Gompel, A. y Forgez, P. (2006) *Cancer Res.* 66, 6243-6249.

16. Iwase, K., Evers, B. M., Hellmich, M. R., Kim, H. J., Higashide, S., Gully, D. y Townsend, C. M., Jr. (1996) *Surg. Oncol.* 5, 245-251.
17. Yoshinaga, K., Evers, B. M., Izukura, M., Parekh, D., Uchida, T., Townsend, C. M., Jr. y Thompson, J. C. (1992) *Surg. Oncol.* 1, 127-134.
- 5 18. Nakaizumi, A., Uehara, H., Baba, M., Iishi, H. y Tatsuta, M. (1996) *Cancer Lett.* 110, 57-61.
19. Tatsuta, M., Iishi, H., Baba, M. y Nakaizumi, A. (1991) *Int. J. Cancer* 47, 408-412.
20. Servotte, S., Camby, I., Debeir, O., Deroanne, C., Lambert, C. A., Lapiere, C. M., Kiss, R., Nusgens, B. y Decaestecker, C. (2006) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 32, 575-584.
21. Wu, Z., Martinez-Fong, D., Tredaniel, J. y Forgez, P. (2012) *Front Endocrinol. (Lausanne)* 3, 184.
- 10 22. Ehlers, R. A., Zhang, Y., Hellmich, M. R. y Evers, B. M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 704-708.
23. Gully, D., Labeeuw, B., Boigegrain, R., Oury-Donat, F., Bachy, A., Poncelet, M., Steinberg, R., Suaud-Chagny, M. F., Santucci, V., Vita, N. et al. (1997) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 802-812.
24. Hassan, S. y Carraway, R. E. (2006) *Regul. Pept.* 133, 105-114.
25. Hassan, S., Dobner, P. R. y Carraway, R. E. (2004) *Regul. Pept.* 120, 155-166.
- 15 26. Kisfalvi, K., Guha, S. y Rozengurt, E. (2005) *J. Cell Physiol* 202, 880-890.
27. Servotte, S., Camby, I., Debeir, O., Deroanne, C., Lambert, C. A., Lapiere, C. M., Kiss, R., Nusgens, B. y Decaestecker, C. (2006) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 32, 575-584.
28. Zhao, D., Kuhnt-Moore, S., Zeng, H., Wu, J. S., Moyer, M. P. y Pothoulakis, C. (2003) *Am. J. Physiol Cell Physiol* 284, C1397-C1404.
- 20 29. Leyton, J., Garcia-Marin, L., Jensen, R. T. y Moody, T. W. (2002) *Eur. J. Pharmacol.* 442, 179-186.
30. Lee, L. F., Guan, J., Qiu, Y. y Kung, H. J. (2001) *Mol. Cell Biol.* 21, 8385-8397.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> INSERM
- <120> Anticuerpos antineurotensina y usos los mismos
- 5 <130> BIO14015 FORGEZ / MC
- <160> 10
- 10 < 170 > PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 122
- <212> PRT
- 15 <213> Artificial
- <220>
- <223> Secuencia VH
- 20 <400> 1
- Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu Gly Gly
1 5 10 15
- Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
- Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45
- Ala Ala Ile Asn Asn Tyr Gly Asp Asn Thr Asn Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
- Lys Gly Arg Phe Ser Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
- Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
- Ala Arg Leu Ala Asn Tyr Ala Asn Gln Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110
- Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120
- <210> 2
- <211> 10
- 25 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> H-CDR1
- 30 <400> 2
- Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Tyr Met Ser
1 5 10
- <210> 3
- 35 <211> 17
- <212> **PRT**
- <213> Artificial
- <220>

ES 2 778 251 T3

<223> H-CDR2

<400> 3

Ala Ile Asn Asn Tyr Gly Asp Asn Thr Asn Tyr Pro Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

5

<210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> H-CDR3

<400> 4

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

15

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia VL

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr His Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ala Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Thr Leu Leu Ile
 35 40 45

25

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Asn Leu Asp Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Leu Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

30

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> L-CDR1

35

<400> 6
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ala Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

40

<210> 7
 <211> 7

ES 2 778 251 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> L-CDR2

<400> 7
 Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
 1 5

10 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> L-CDR3

<400> 8
 Gln Gln Gly Tyr Thr Leu Pro Pro Thr
 1 5

20 <210> 9
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 9
 Met Met Ala Gly Met Lys Ile Gln Leu Val Cys Met Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Phe Ser Ser Trp Ser Leu Cys Ser Asp Ser Glu Glu Glu Met Lys Ala
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 778 251 T3

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
5 <213> Artificial

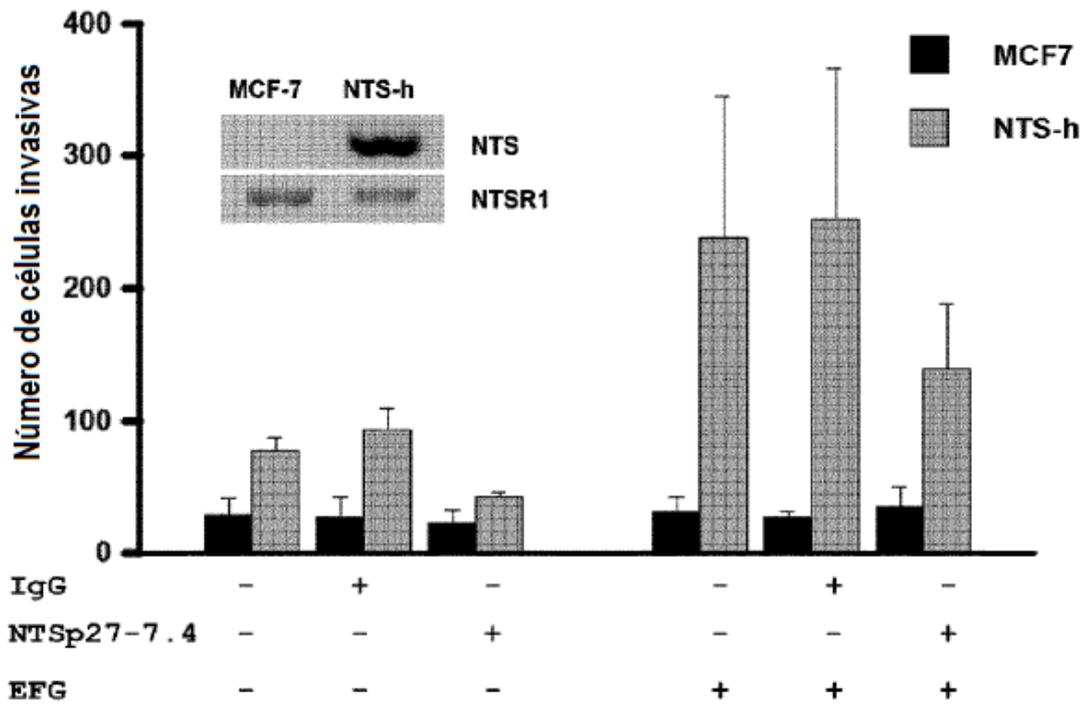
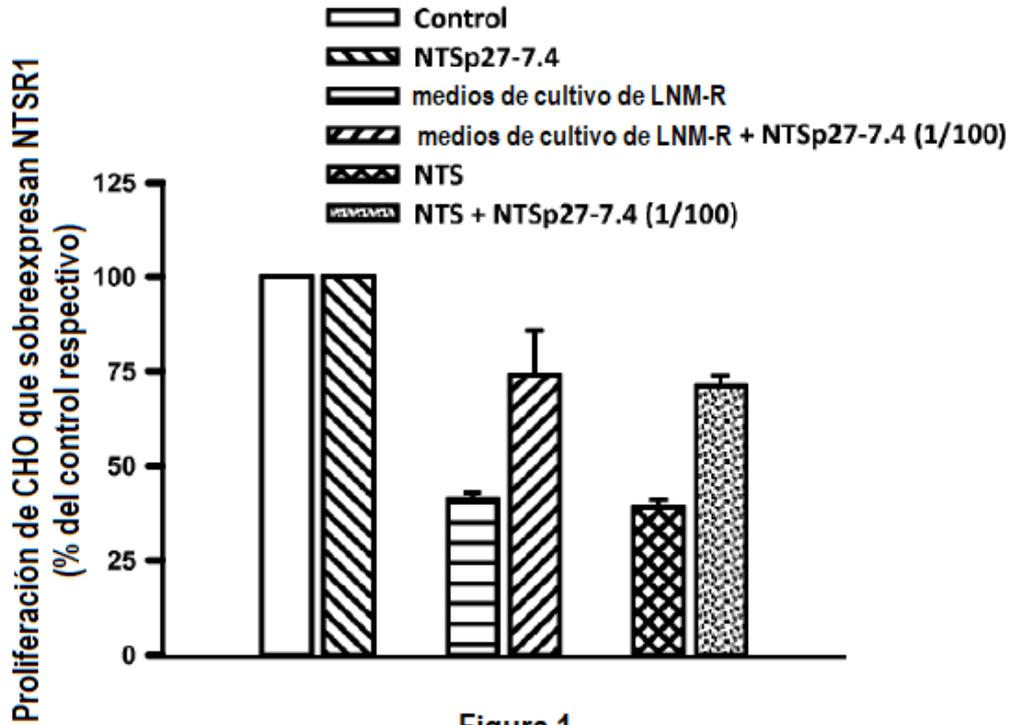
<220>
<223> péptido de antígeno

10 <400> 10
Cys Gln Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo neutralizante que se une a neurotensina humana y que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:2 en la región H-CDR1, la SEQ ID NO:3 en la región H-CDR2 y la SEQ ID NO:4 en la región H-CDR3; y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:6 en la región L-CDR1, la SEQ ID NO:7 en la región L-CDR2 y la SEQ ID NO:8 en la región L-CDR3.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO:1 y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO:5, o que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica expuesta como SEQ ID NO:1 y/o una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica expuesta como SEQ ID NO:5.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, que se selecciona del grupo consistente en un anticuerpo quimérico, tal como un anticuerpo quimérico de ratón/humano, anticuerpo humanizado, Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos.
4. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 4.
6. Una célula hospedadora que se ha transfectado, infectado o transformado con la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 4 o el vector de la reivindicación 5.
7. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto necesitado de ello.
8. El anticuerpo para uso según la reivindicación 7, en el que el cáncer se selecciona del grupo consistente en neoplasia maligna; carcinoma; carcinoma indiferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiforme; carcinoma microcítico; carcinoma papilar; carcinoma escamoso; carcinoma linfoepitelial; carcinoma basocelular; carcinoma pilomatricial; carcinoma de células transicionales; carcinoma de células transicionales papilares; adenocarcinoma; gastrinoma maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinado; adenocarcinoma trabecular; carcinoma quístico adenóide; adenocarcinoma en pólipos adenomatosos; adenocarcinoma por poliposis adenomatosa familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide maligno; adenocarcinoma bronquioloalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma adrenocortical; carcinoma endometriode; carcinoma de anejos cutáneos; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistoadenocarcinoma; cistoadenocarcinoma papilar; cistoadenocarcinoma seroso papilar; cistoadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma ductal infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget; carcinoma de células acinares mamarias; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma maligno; tumor estromal ovárico maligno; tectoma maligno; tumor maligno de células de la granulosa y roblastoma maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor maligno de células de Leydig; tumor maligno de células lipídicas; paraganglioma maligno; paraganglioma extramamario maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma maligno en nevo pigmentado gigante; melanoma de células epitelioideas; nevo azul maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rhabdomyosarcoma; rhabdomyosarcoma embrionario; rhabdomyosarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto maligno; tumor mixto de Muller; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma maligno; tumor de Brenner maligno; tumor filóide maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma maligno; estruma ovárico maligno; coriocarcinoma; mesonefoma maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelio maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condrosarcoma maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor de células gigantes del hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma maligno; cordoma; glioma maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplásmico; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; sarcoma cerebeloso neuroectodérmico primitivo; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfatorio; meningioma maligno; neurofibrosarcoma; neurilemmoma maligno; tumor maligno de células granulares; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; paragranuloma; linfoma linfocítico microcítico maligno; linfoma macrocítico difuso maligno; linfoma folicular maligno; micosis fungoide; otros linfomas no de Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma mastocitario; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfoma; leucemia mieloide; leucemia basófila; leucemia eosinófila; leucemia monocítica; leucemia mastocítica; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide y tricoleucemia.

9. El anticuerpo para uso según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo se usa en combinación con un agente quimioterapéutico.
10. El anticuerpo para uso según la reivindicación 9, en el que el agente quimioterapéutico es cisplatino.
- 5 11. El anticuerpo para uso según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo se usa en combinación con un inhibidor de HER tal como un inhibidor de HER seleccionado del grupo consistente en anticuerpos de EGFR, anticuerpos de HER2, anticuerpos de HER3 y anticuerpos de HER4, antagonistas de HER de molécula orgánica pequeña, inhibidores de tirosina cinasa de HER, inhibidores de tirosina cinasa duales de HER2 y EGFR, inhibidores de la dimerización de HER, cetuximab, panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab, erlotinib, gefitinib, lapatinib, neratinib, canertinib, vandetanib, afatinib, TAK-285, ARRY334543, dacomitinib, OSI-420, AZD8931, AEE788, pelitinib, 10 CUDC-101, XL647, BMS-599626, PKC412, BIBX1382, AP261 13 e inhibidor pan-HER.
12. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.



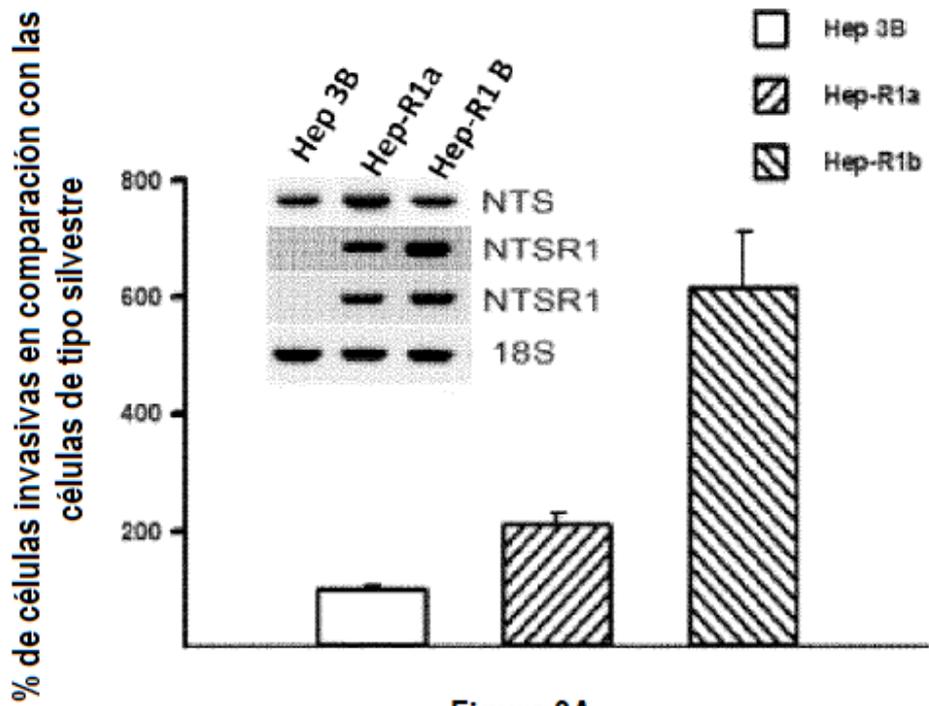


Figura 3A

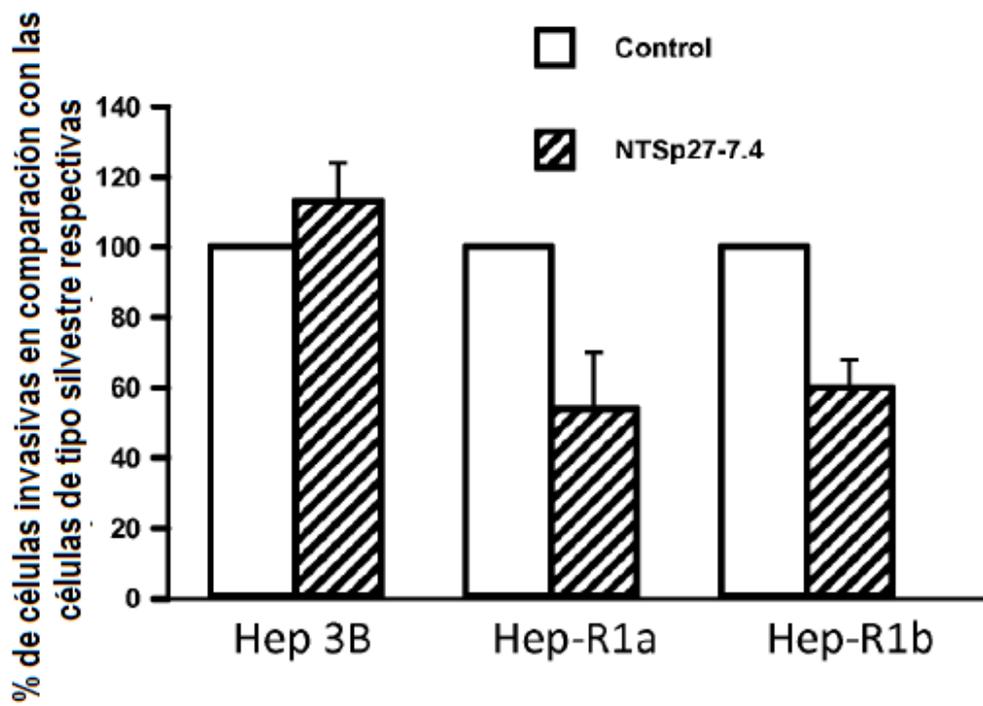


Figura 3B

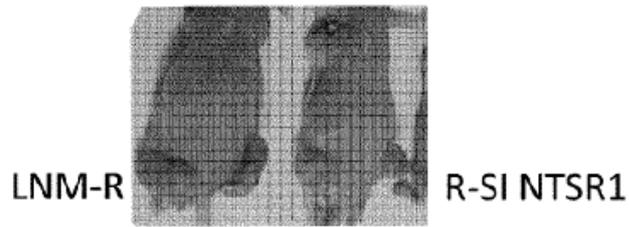


Figura 4A

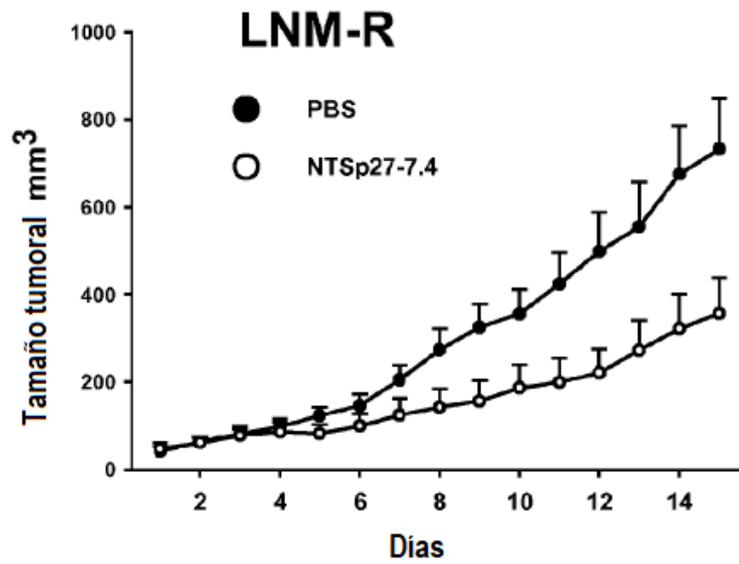


Figura 4B

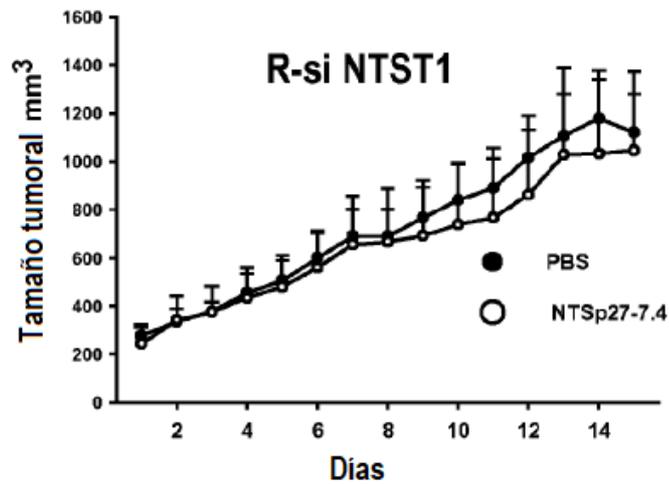


Figura 4C

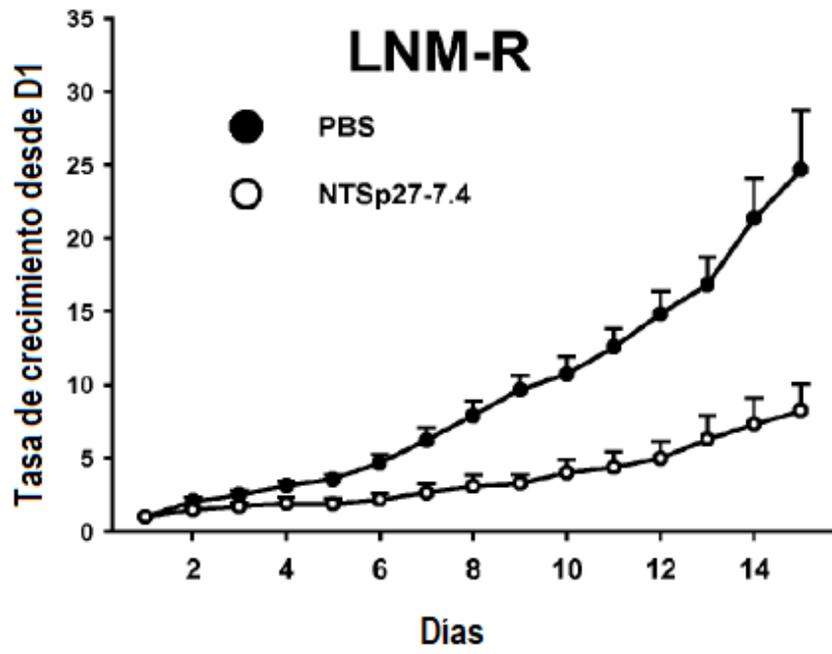


Figura 4D

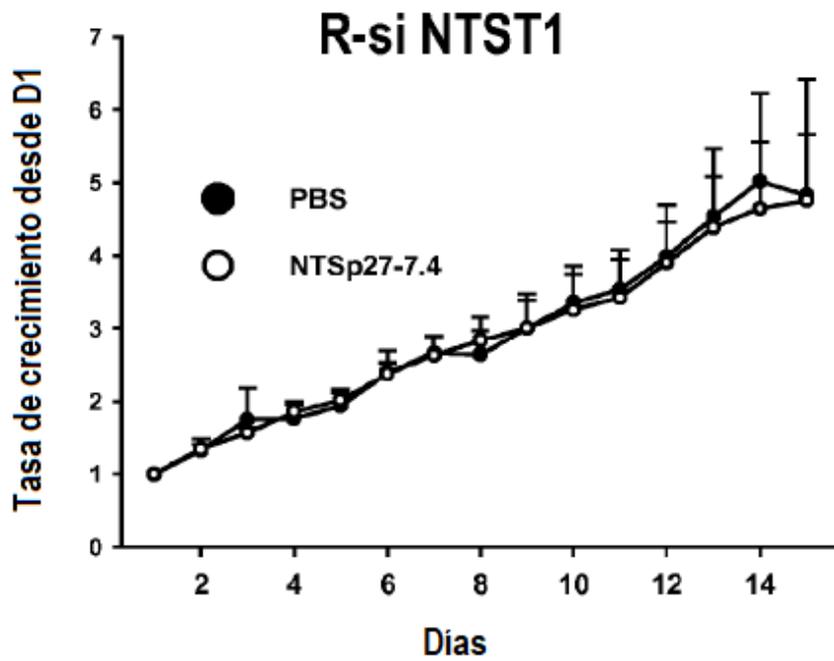


Figura 4E

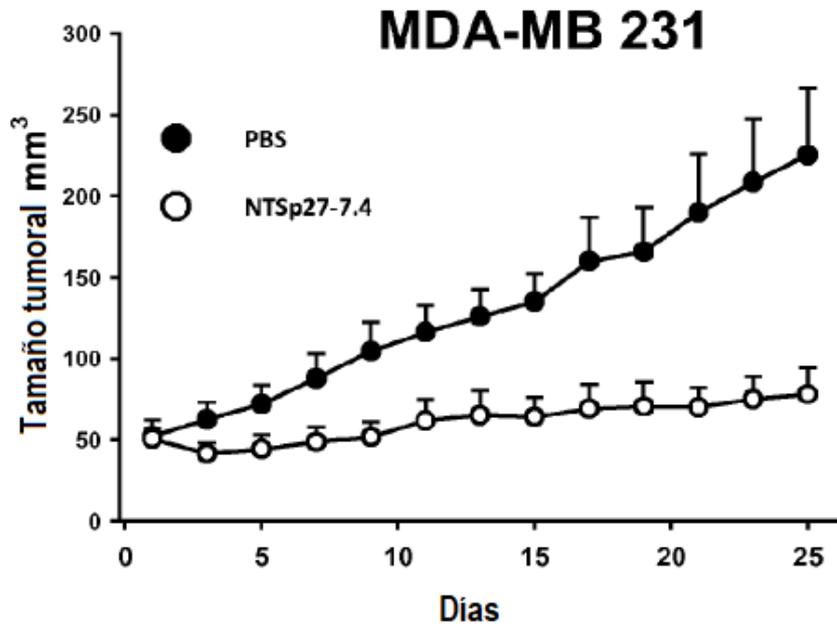


Figura 5A

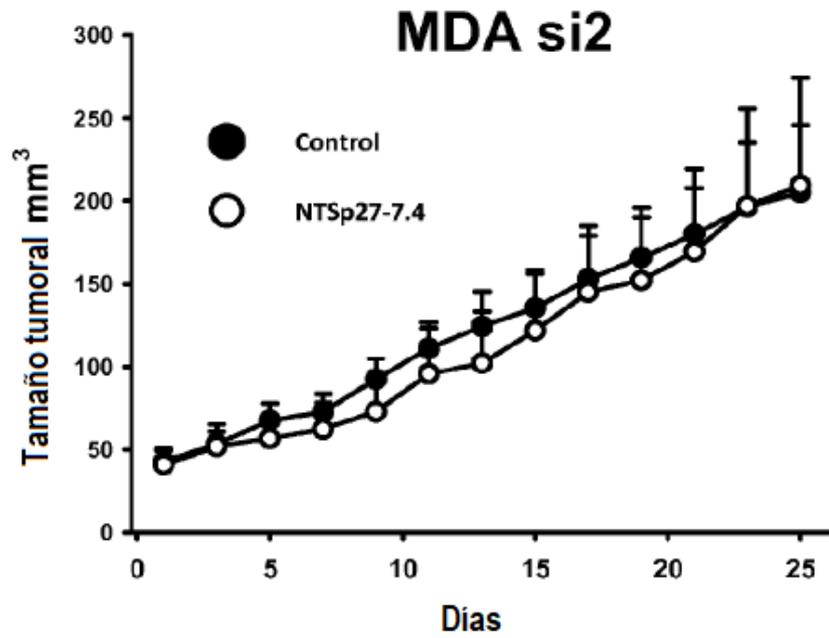


Figura 5B

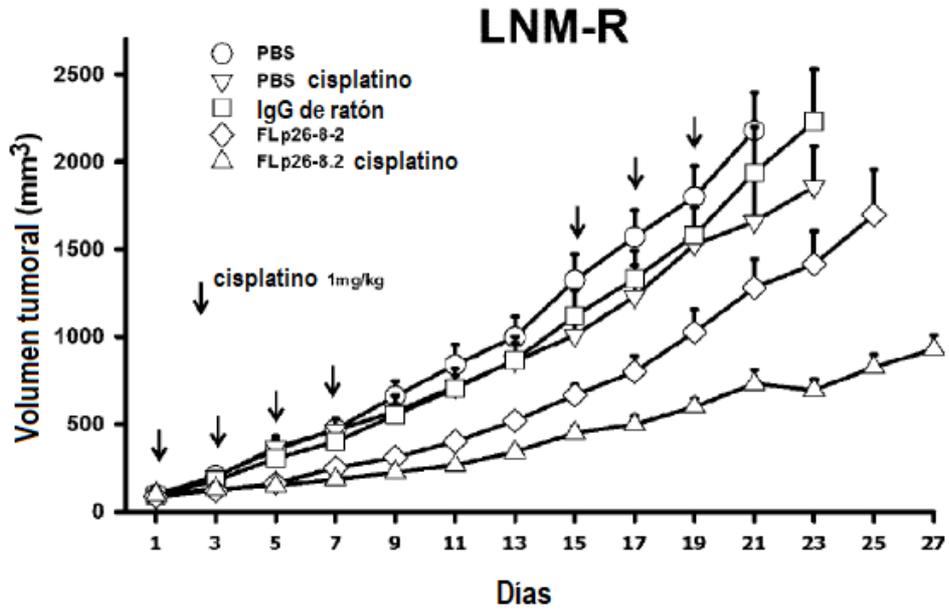


Figura 6A

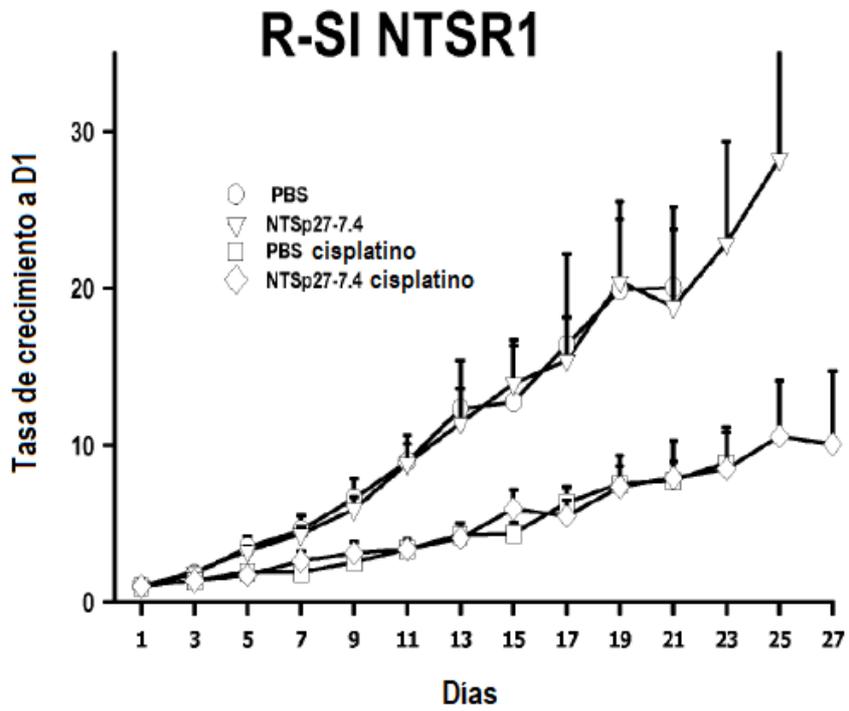


Figura 6B

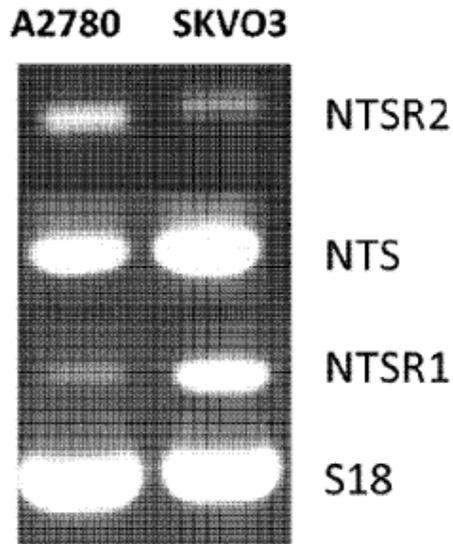


Figura 7A

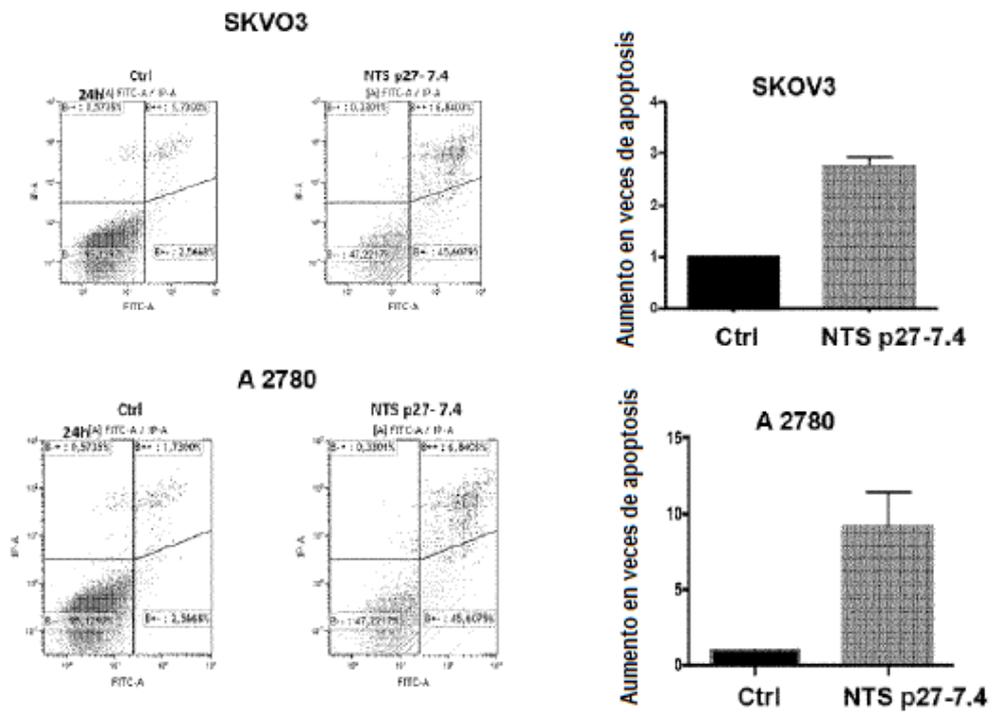


Figura 7B

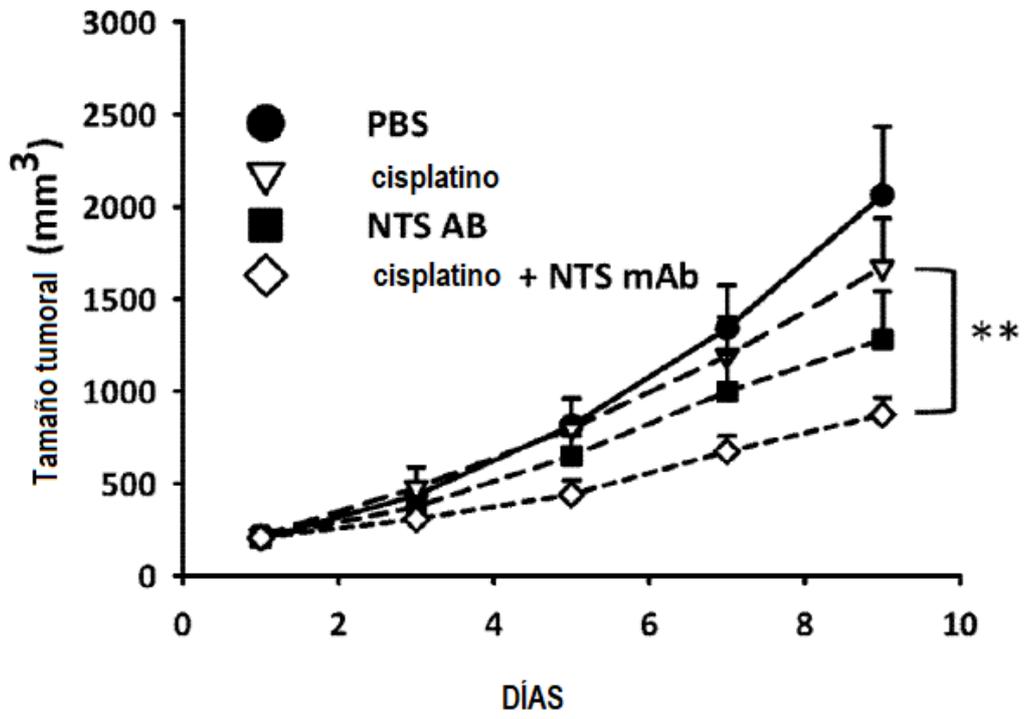


Figura 8