



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 905**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/566** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C12N 5/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04798043 .8**  
96 Fecha de presentación : **19.11.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1685405**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

54 Título: **Moléculas inhibidoras de la angiogénesis y su uso en el tratamiento y diagnóstico del cáncer.**

30 Prioridad: **19.11.2003 EP 03026629**  
**18.12.2003 US 738123**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.05.2011**

73 Titular/es: **MERCK SERONO S.A.**  
**Centre Industriel**  
**1267 Coinsins, Vaud, CH**

72 Inventor/es: **Imhof, Beat, A. y**  
**Aurrand-Lions, Michel**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 358 905 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

- 5 La presente invención se refiere a moléculas que son capaces de inhibir la angiogénesis, a composiciones terapéuticas o diagnósticas que comprenden una o varias de las moléculas y al uso de tales moléculas en medicina, en particular en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer, en particular de tumores sólidos. Además se describe un método para proporcionar tales moléculas.
- La angiogénesis, o la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente, es fundamental para curar las heridas, para la reproducción y el desarrollo embrionario. La angiogénesis también es esencial en el desarrollo de tumores. Los nuevos vasos sanguíneos en los tumores proporcionan nutrientes que hacen que las células sufran una mitosis incontrolada.
- 10 Durante la angiogénesis, las células endoteliales proliferan, migran en el nuevo tejido y forman uniones interendoteliales que conducen a la formación del tubo. Este proceso comienza y se realiza por factores angiogénicos. La señalización de VEGFs y angiopoyetinas conduce a la pérdida del contacto pericito-endotelial lo que permite la proliferación e interacción de nuevas células endoteliales con la matriz extracelular mediada por integrinas. Se ha descrito que las integrinas  $\alpha v \beta 3$  y  $\alpha v \beta 5$  participan en el desarrollo de los vasos sanguíneos y la angiogénesis vía una interferencia de
- 15 señales con factores angiogénicos.
- Además de las interacciones entre células endoteliales y la matriz extracelular, la regulación de contactos interendoteliales es importante para la formación del tubo. Por ejemplo, la molécula de adhesión VE-cadherina desempeña un papel en la remodelación vascular y mantiene la integridad de los vasos sanguíneos.
- 20 En la investigación que condujo a la presente invención fueron descubiertas las moléculas de adhesión intercelular JAM-B y JAM-C. Estas moléculas se encuentran en contactos célula-célula vasculares y están implicadas en la migración transendotelial de leucocitos. Ahora se ha encontrado que la interacción entre JAM-B y JAM-C también desempeña un papel importante en la angiogénesis.
- Según este descubrimiento, los inventores trataron de encontrar nuevas moléculas que fueran capaces de inhibir la angiogénesis.
- 25 Para esto, los inventores usaron un método que comprende las etapas de:
- a) proporcionar una variedad de moléculas;
  - b) probar si estas moléculas pueden prevenir la interacción entre JAM-B y JAM-C;
  - c) analizar las moléculas positivas según su capacidad de bloquear la angiogénesis *in vivo*; y
  - d) seleccionar la moléculas que sean positivas en el ensayo *in vivo* según las moléculas inhiban la angiogénesis.
- 30 El análisis de las moléculas según su capacidad para bloquear la angiogénesis *in vivo* puede ser realizado por medio de la prueba de retina que se describe en el Ejemplo 4.
- Según la invención, fue encontrado que no todas las moléculas que pueden prevenir la interacción entre JAM-B y JAM-C son también capaces de inhibir la angiogénesis. El ensayo adicional de la etapa d) anterior es, por lo tanto, necesario para encontrar las moléculas deseadas.
- 35 Para encontrar las moléculas que son particularmente adecuadas según la invención, el método puede comprender además la etapa de analizar las moléculas positivas según su capacidad de inhibir el crecimiento de tumores *in vivo*. El ensayo para inhibir el crecimiento de tumores *in vivo* es, por ejemplo, un ensayo como el que se describe en el Ejemplo 5.
- 40 Por medio de la etapa de aislar o producir las moléculas que inhiben la angiogénesis se produce la obtención real de las moléculas deseadas.
- La variedad de moléculas que pueden ser analizadas en este método puede ser diversa. La variedad de moléculas puede ser apropiadamente, por ejemplo, una población de anticuerpos dirigidos contra JAM-B o JAM-C. La preparación de anticuerpos es una técnica directa que no requiere habilidad inventiva y, por ejemplo, se describe en Kohler y Milstein, *Nature* **256**: 495-497 (1975). El experto será, por lo tanto, capaz de proporcionar tal variedad sin un
- 45 conocimiento extraordinario.
- Los ensayos de moléculas que pueden prevenir la interacción entre JAM-B y JAM-C son realizados, por ejemplo, incubando células que expresan JAM-B o JAM-C en su superficie con JAM-C o JAM-B soluble marcado, respectivamente, en presencia de dichas moléculas y registrando una disminución en el marcaje de las células según se compara la incubación control sin dichas moléculas. Las moléculas que inducen una disminución en la cantidad de marcador visualizado en comparación con las células control que expresan JAM-C o JAM-B y que tienen JAM-B o JAM-C marcados, pero ninguna molécula que se analiza unidas a su superficie, se seleccionan como moléculas positivas.
- 50

Los marcadores adecuados son marcadores fluorescentes, radiactivos o basados en Biotina, que son conocidos en la técnica. Las técnicas adecuadas para visualizar el marcador y la desaparición o su reducción son citometría de flujo, bioquímica o un ensayo inmunoenzimático (ELISA).

5 Las moléculas que se encuentran que inhiben la interacción entre JAM-B y JAM-C son analizadas además entonces según su capacidad de inhibir la angiogénesis *in vivo*. Para esto, están disponibles varias opciones. Sin embargo, la prueba de la retina que se describe en el Ejemplo 4 es muy adecuada porque la remodelación de la vasculatura depende esencialmente de las células endoteliales y no de los factores microambientales. Otras pruebas son el ensayo de la membrana corioalantoidea, reperfusión isquémica o angiogénesis inducida por injerto de matrigel cargado con factores angiogénicos. Estas pruebas son conocidas en la técnica.

10 Además, o en vez de probar la capacidad de inhibir la angiogénesis *in vivo*, puede analizarse la capacidad de la molécula de inhibir el crecimiento de tumores *in vivo*. Un ejemplo adecuado de tal ensayo es el que se describe en el Ejemplo 5.

15 El susodicho método finalmente condujo a la identificación del anticuerpo H33, producido por el hibridoma 13H33, depositado el 22 de octubre de 2003 con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de entrada de depósito **DSM ACC2622** como una molécula que inhibe la angiogénesis de la invención. Se demostró que el anticuerpo H33, que es dirigido contra JAM-C, puede bloquear la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* y prevenir el crecimiento de tumores *in vivo*. Esto reduce el reclutamiento de macrófagos en tumores. Esto también puede bloquear la interacción de JAM-C con JAM-B. El H33 no afecta a la proliferación, ni la apoptosis.

20 La invención se refiere por lo tanto al anticuerpo H33 para su uso como medicamento, en particular para el tratamiento del cáncer, más en particular para tratar tumores sólidos. Además, la invención se refiere a fragmentos y derivados de H33, que tienen la misma especificidad que H33 para su uso como medicamento. Tales fragmentos y derivados son en particular fragmentos Fab, fragmentos Fv, fragmentos de unión de antígeno de dominio simple, anticuerpos recombinantes que tienen especificidad de H33, scFv y sus agregados, V<sub>HH</sub>S, los derivados humanizados del H33, anticuerpos quiméricos que comprenden al menos la especificidad de H33 o anticuerpos monoclonales humanos que  
25 tienen la especificidad de H33. Éstos son producidos apropiadamente en ratones transgénicos u otros animales como será explicado más adelante en este documento.

La invención además se refiere a fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos que retienen la capacidad de unión del antígeno al anticuerpo entero como tal. Tales fragmentos y derivados de H33 no se han descrito en la técnica anterior y son, por eso, nuevos.

30 Los fragmentos funcionales de anticuerpos que se unen al antígeno pueden modificarse por proteólisis de anticuerpos (digestión de papaína, digestiones de pepsina u otros enfoques enzimáticos), produciendo Fab, Fv o dominios simples.

O bien, pueden producirse fragmentos recombinantemente. Los fragmentos de Fab ("unión de antígeno a fragmento") son los dominios de unión del antígeno de una molécula de anticuerpo, que contiene V<sub>H</sub> + C<sub>H1</sub> y C<sub>L</sub> + V<sub>L</sub>. Entre C<sub>L</sub> y C<sub>H1</sub> se presenta un enlace disulfuro intercadena. El peso molecular del heterodímero tiene, por lo general, aproximadamente  
35 50 kDa. Los fragmentos de Fab pueden prepararse por digestiones de papaína de anticuerpos enteros.

El fragmento mínimo (~30 kDa) que contiene todavía el sitio de unión al antígeno entero de un anticuerpo de IgG entero se forma tanto de los dominios de la cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) como de la cadena ligera variable (V<sub>L</sub>). Este heterodímero, llamado el fragmento Fv (por "Fragmento variable") es todavía capaz de unirse al antígeno.

Otro fragmento es el fragmento de unión del antígeno del dominio simple (dAbs) o V<sub>HS</sub>.

40 Los fragmentos Fv de cadena simple pueden prepararse recombinantemente. En el fragmento de scFv, los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se unen con un enlazante peptídico hidrófilo y flexible. Los scFvs pueden complejarse en dímeros (diacuerpos), trímeros (triacuerpos) o agregados más grandes, cuyas unidades monoméricas pueden tener las mismas especificidades o diferentes.

45 Un tipo más de fragmento de anticuerpo es el V<sub>HH</sub>S que comprende el fragmento de unión del antígeno intacto disponible más pequeño. El V<sub>HH</sub>S puede producirse a partir de anticuerpos de cadena pesada proteolizados de una camélida inmunizada o por técnicas recombinantes.

50 Usando técnicas de ADN recombinante, básicamente, un polinucleótido que codifica el dominio V de la cadena H o de la cadena L del anticuerpo H33 puede unirse con un polinucleótido que codifica para la región constante de una cadena H o L, humana preferiblemente. Para la expresión de las cadenas H y L completas obtenidas de esta manera, también puede añadirse una secuencia que codifica un péptido señal que produce la secreción de la proteína.

Para producir las moléculas que inhiben la angiogénesis de la invención se usan casetes de expresión, en los que se une un polinucleótido fusionado de la invención a las secuencias control apropiadas lo que permite la regulación de su transcripción y traducción en una célula huésped dada, y vectores recombinantes que comprenden un polinucleótido o dicho casete de expresión.

Los polinucleótidos de la invención, es decir, las moléculas que inhiben la angiogénesis que tienen especificidad de H33, pueden obtenerse fácilmente por lo tanto mediante métodos conocidos de la tecnología del ADN recombinante, sino también por síntesis química del ADN.

5 Pueden obtenerse constructos de ADN recombinante e introducirse en células huésped mediante las técnicas conocidas del ADN recombinante e ingeniería genética.

Las células huésped útiles dentro del marco de la presente invención pueden ser células procarióticas o eucarióticas. Entre las células eucarióticas adecuadas se encuentran, por ejemplo, células de planta, células de levaduras tal como *Saccharomyces*, células de insectos tales como *Drosophila*, o *Spodoptera*, y células de mamífero tales como HeLa, CHO, 3T3, C127, BHK, COS, etc.

10 Hay varios métodos para transfectar células procarióticas o eucarióticas con vectores que contienen los constructos de ácido nucleico que codifican la cadena Ig quimérica. Un modo preferido para introducir un vector en linfocitos es por fusión de esferoblastos. (véase, por ejemplo, Gillies *et al.* (1989) *Biotechnol.* 7: 798-804). Los métodos alternativos incluyen la electroporación o la precipitación con fosfato de calcio. Otros métodos útiles para producir los inmunocombinados incluyen la preparación de una secuencia de ARN que codifica el constructo y su traducción en un sistema apropiado *in vivo* o *in vitro*.

15 Una vez expresadas, las proteínas de la invención pueden recuperarse por procedimientos de purificación de proteína estándares (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº. 5.650.150).

20 Cuando se combinan cadenas pesadas y ligeras en la molécula de la invención, la cadena pesada de una región variable de anticuerpo preferiblemente se co-expresa en la misma célula con una cadena ligera correspondiente. Para las proteínas de fusión que comprenden cadenas de polipéptido múltiples, puede usarse más de un vector de expresión. Los métodos de co-transfección que usan, por ejemplo, dos vectores de expresión, con frecuencia dan lugar a ambos vectores que se administran a una célula diana. O bien, es útil a veces usar un vector simple que codifica una pluralidad de polipéptidos para su co-expresión en la misma célula.

25 Además, puede ser conveniente expresar la proteína de la presente invención como una molécula de cadena simple. Por ejemplo, puede expresarse una región de anticuerpo variable como un anticuerpo de cadena simple o sFv opcionalmente fusionado a una proteína no inmunoglobulina. En otra realización, se combina una cadena pesada (con o sin una citoquina fusionada) con su homólogo de cadena ligera (o pesada) (con o sin una citoquina fusionada) para formar inmunocombinados monovalentes y divalentes.

30 Las regiones  $V_L$  y  $V_H$  pueden unirse por un puente disulfuro o un enlace peptídico, según se construyan sus secuencias de ácidos nucleicos. En general, las regiones V se unen por un puente disulfuro cuando sus secuencias son codificadas en los constructos de ADN separados. En contraste, las regiones V se unen típicamente por un enlace peptídico cuando sus secuencias son codificadas en un constructo de ADN de cadena simple.

35 En ciertas realizaciones de la invención, la región variable de cadena ligera y la región de variable de cadena pesada pueden ser conectadas, respectivamente, a una región constante de cadena ligera y una región constante de cadena pesada de una inmunoglobulina. Pueden usarse tanto cadenas kappa como lambda de las regiones constantes de cadenas ligeras de inmunoglobulina.

La construcción de vectores de expresión de la invención, y la transformación de huésped-células puede hacerse por técnicas estándares de biología molecular.

40 Las moléculas que inhiben la angiogénesis de la invención producidas por tales células procarióticas o eucarióticas pueden purificarse a partir de células o sobrenadantes de cultivos por cromatografía de afinidad usando la proteína A Sepharose y evaluarse según su actividad de unión de JAM-C midiendo sus actividades inhibitorias frente a la unión de H33 a JAM-C soluble revestido en placas de microtítulo por medio de tecnologías ELISA competitivas conocidas.

45 Los dominios variables de rata restantes todavía pueden ser inmunógenos en seres humanos, y pueden perjudicar así la eficacia de una terapia a base de anticuerpos. Pueden ser aplicados los enfoques conocidos para reducir la inmunogenicidad, tales como "inactivación" y "humanización", que implican la introducción de sustituciones de aminoácidos como se describe en la patente W02004055056. El rastreo subsecuente según la afinidad de unión puede ser realizado como se describe antes por medio de la actividad inhibitoria frente a H33.

50 O bien, se mutan los epítopos de células T no humanas de modo que correspondan a los propios epítopos humanos que están presentes en los anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº. 5.712.120). Los anticuerpos de H33 son parte de la invención teniendo regiones  $V_L$  y  $V_H$  que incluyen al menos una secuencia humanizada, reduciéndose así la inmunogenicidad cuando se administran a un ser humano.

La producción del anticuerpo subsecuente en la célula huésped y la purificación pueden ser realizadas como se describe antes.

5 Según otro aspecto de la invención, la región variable del anticuerpo de H33 o una molécula similar pueden unirse, con o sin una intervención de parte de Fc, a un resto de no inmunoglobulina. Específicamente, el resto de no inmunoglobulina puede ser una citoquina, tal como una interleuquina, un factor hematopoyético, una linfoquina, un interferón o una quimioquina. La interleuquina puede ser, por ejemplo, interleuquina 2 o interleuquina 12. El factor hematopoyético y la linfoquina pueden ser, por ejemplo, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y una linfotóxina, respectivamente. El interferón puede ser, por ejemplo, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$  o interferón- $\gamma$ .

En algunas realizaciones de la invención, la proteína de fusión incluye un segundo resto de no inmunoglobulina, tal como una segunda citoquina.

10 La invención también proporciona el uso del anticuerpo H33 o sus fragmentos o derivados para la preparación de un medicamento para prevenir la interacción JAM-B/JAM-C en un paciente.

Tal prevención puede comprender reconocer una célula con JAM-C en su superficie administrando un anticuerpo con regiones variables de la presente invención a un paciente. En una realización, la célula reconocida es una célula tumoral.

15 Según aspectos adicionales de la invención, la prevención de la interacción JAM-C/JAM-B puede ser efectuada usando un ácido nucleico que codifica la región variable del anticuerpo o una célula que incluya este ácido nucleico, cualquiera de los cuales que se administren a un paciente.

20 Para el uso clínico en seres humanos, puede ser provechoso modificar el anticuerpo H33 derivado de rata para reducir o minimizar la inmunogenicidad del anticuerpo. Como un medio de reducir la inmunogenicidad de anticuerpos murinos, se han descrito varios métodos en la bibliografía. Tales métodos incluyen la producción de anticuerpos quiméricos que contienen regiones variables murinas o de rata y regiones constantes humanas, la producción de anticuerpos de cadena simple que comprende las secuencias de unión variables derivadas de anticuerpos murinos o de rata, la producción de fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos murinos o de rata que debido a su tamaño más pequeño son potencialmente menos inmunógenos, la producción de anticuerpos monoclonales humanos y la producción de anticuerpos "humanizados".

25 La humanización idealmente proporciona un anticuerpo que no es inmunógeno, con la retención completa de las propiedades de unión al antígeno de la molécula de anticuerpo no humana parenteral. La no inmunogenicidad permite la administración de dosis múltiples sin padecer una reacción inmunógena adversa. Se han descrito varios métodos para producir anticuerpos humanizados en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos humanizados pueden ser potencialmente producidos: (a) injertando sólo CDRs no humanos en regiones marco humano y constantes (Jones *et al.*, *Nature* **321**: 522-25 (1986); Verhoeyen *et al.*, *Science* **239**: 1534-1536 (1988)); o (b) trasplantando los dominios variables no humanos enteros (para conservar las propiedades de unión del ligando) sino que también "encubriéndolos" con una superficie tipo humana por el reemplazo de residuos expuestos para reducir la inmunogenicidad (también denominados anticuerpos "inactivados") (Padlan, *Molec. Immun.* **28**: 489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.* **31** (3): 169-217 (1994)).

30 La retención de residuos no humanos (murinos o de rata) dentro de dominios marco de región variable humanos, según se ha publicado, ayuda a retener la función de unión apropiada del anticuerpo humanizado resultante. Se ha descrito que los anticuerpos humanizados disminuyen potencialmente, o eliminan, la inmunogenicidad del anticuerpo en un receptor huésped, permitiendo así un aumento de la disponibilidad biológica y una reducción de la posibilidad de reacciones inmunes adversas, permitiendo potencialmente así administraciones de anticuerpo múltiples. También, la síntesis del susodicho scFv descrito y fragmentos de anticuerpo tales como los fragmentos Fv, Fd, Fab, Fab', y F(ab)'<sub>2</sub>, derivados de anticuerpos que tienen una especificidad de unión deseada comprende otros medios conocidos de producir restos de reconocimiento que tienen menos inmunogenicidad que los propios anticuerpos. Esencialmente, los anticuerpos de cadena simple y los fragmentos de anticuerpo, debido a su menor tamaño, podrían ser menos inmunógenos que los anticuerpos propios.

35 También se sabe que las proteínas recombinantes, por ejemplo, los anticuerpos, son glicosilados diferentemente en las diferentes células huésped usadas para la expresión. Para el uso clínico de anticuerpos H33, la glicosilación puede aumentar su período de semivida y/o disminuir su inmunogenicidad.

40 El anticuerpo H33 también puede usarse en el rastreo por competición para aislar "anticuerpos monoclonales humanos" o "anticuerpos humanos recombinantes" que tienen la misma especificidad, o una similar, a H33. Básicamente, los anticuerpos humanos así aislados pueden ser producidos en un hibridoma, transfectoma o en un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, capaz de producir isotipos múltiples de anticuerpos monoclonales humanos frente a JAM-C (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) sufriendo una recombinación de V-D-J y cambio de isotipo. (por ejemplo, las patentes EP1471938 y US2004208873). Tal animal transgénico también puede ser un conejo transgénico que produzca anticuerpos policlonales como se describe en el documento US 2003/0017534.

45 La expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una especificidad de unión sencilla que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos que tienen la misma especificidad que H33 son

producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

5 El sistema de animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión son conocidos en la técnica. Las parejas de fusión (por ejemplo, las células de mieloma murinas) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

10 En una realización preferida, pueden generarse anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra JAM-C y que tienen especificidad de H33 usando a ratones transgénicos que llevan partes del sistema inmunológico humano en vez del sistema de ratón conocido tales como los ratones "HuMAb". (Lonberg, *et al.* (1994) *Nature* **368** (6474): 856-859). En consecuencia, los ratones muestran una menor expresión que la IgM del ratón o la cadena ligera [kappa], y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos introducidos sufren un cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG [kappa] humanos de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; revisado en Lonberg, N. (1994) "Handbook of Experimental Pharmacology" **113**: 49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Volumen **13**: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **764**: 536-546). La preparación de ratones HuMAb es descrita detalladamente en Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* **20**: 6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* **5**: 647-656; Tuailleon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* **4**: 117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* **12**: 821-830; Tuailleon *et al.* (1994) *J. Immunol.* **152**: 2912-2920; Lonberg, N. *et al.*, (1994) *Nature* **368** (6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) "Handbook of Experimental Pharmacology" **113**: 49-101; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* **6**: 579-591; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Volumen **13**: 65-93; Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **764**: 536-546; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* **14**: 845-851. Véanse además, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299 y 5.770.429; todas de Lonberg, N. y Kay, R. M. y GenPharm Internacional; la patente de Estados Unidos Nº. 5.545.807 de Surani *et al.*; la Publicación Internacional Nº. WO 98/24884, publicada el 11 de junio de 1998; el documento WO 94/25585, publicado el 10 de noviembre de 1994; el documento WO 93/1227, publicado el 24 de junio de 1993; el documento WO 92/22645, publicado el 23 de diciembre de 1992; y el documento WO 92/03918, publicado el 19 de marzo de 1992.

30 Los ratones HuMAb preferidos tienen una interrupción JKD en sus genes de cadena ligera endógena (kappa) (como se describe en Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* **12**: 821-830), una interrupción CMD en sus genes de cadena pesada endógena (como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424 por Korman *et al.*), un transgén de cadena ligera kappa humana KCo5 (como se describe en Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* **14**: 845-851), y un transgén de cadena pesada humana HCo7 (como se describe en la patente de Estados Unidos Nº. 5.770.429 de Lonberg, N. y Kay, R. M.) y/o un transgén de cadena pesada humana HCo2 (como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/14424 de Korman *et al.*).

40 O bien, pueden usarse ratones que lleven genes de inmunoglobulina humanos en un fragmento transcromosómico para generar anticuerpos anti-JAM-C que tengan especificidad de H33. La preparación de tales ratones transcromosómicos es descrita en el documento W097/07671 de Tomizuka *et al.* Un ratón preferido es aquel en el cual ciertos genes de inmunoglobulina humanos son llevados en un transgén y los otros son llevados en un trans-cromosoma, tal como un ratón que lleva un transgén de cadena ligera humana (por ejemplo, el transgén de cadena kappa KCo5) y un trans-cromosoma de cadena pesada humano (por ejemplo, el trans-cromosoma SC20) como se describe detalladamente en el documento W002/43478 de Ishida *et al.*

45 Para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos frente a JAM-C que tengan especificidad de H33, los ratones HuMAb pueden inmunizarse con una preparación enriquecida o purificada de antígeno de JAM-C y/o células que produzcan JAM-C y/o JAM-C recombinante, como se describe en Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* **368** (6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* **14**: 845-851 y el documento W098/24884. Preferiblemente, los ratones tendrán 6-16 semanas de edad en la primera infusión. Por ejemplo, puede usarse JAM-C recombinante para inmunizar a los ratones HuMAb intraperitonealmente.

50 Para producir anticuerpos monoclonales humanos frente a JAM-C, los esplenocitos de ratón pueden aislarse y fusionarse con PEG a una línea celular de mieloma de ratón según protocolos estándares. Los hibridomas que resultan se protegen entonces para la producción de anticuerpos específicos de antígeno mediante técnicas conocidas.

También pueden producirse anticuerpos humanos de la invención que tienen especificidad de H33 en un transfectoma de célula huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinantes y métodos de transfección de genes como es conocido en la técnica (Morrison, S. (1985) *Science* **229**: 1202).

55 Pueden usarse en esta invención el H33, sus fragmentos o derivados que tienen la capacidad de prevenir la interacción entre JAM-B y JAM-C e inhibir la angiogénesis *in vivo*. La producción de fragmentos de anticuerpo y proteínas de fusión de anticuerpo es examinada en Joosten, V. *et al.*, *Microb. Cell Fact.* **2** (1): 1 (2003). Las técnicas para preparar fragmentos de anticuerpo y derivados son muy conocidas y pueden ser realizadas por la persona experta en el campo sin un conocimiento excesivo.

- 5 Por ejemplo, para expresar el anticuerpo H33, o sus fragmentos de anticuerpo, pueden ser obtenidos los ADNs que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o de cadena completa, mediante técnicas de biología molecular estándares (por ejemplo, amplificación por PCR, mutagénesis dirigida) y pueden insertarse en vectores de expresión tal que los genes se unan operativamente a secuencias de control transcripcionales y de translación. En este contexto, La expresión "operativamente unido" se pretende que signifique que un gen de anticuerpo se une en un vector tal que las secuencias de control transcripcionales y de translación dentro del vector desempeñan la función pretendida de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias control de expresión son elegidos para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada.
- 10 El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden ser insertados en el vector separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos estándares (por ejemplo, hibridación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y vector, o unión del extremo romo si no está presente ningún sitio de restricción).
- 15 Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en este documento pueden usarse para crear genes del anticuerpo de cadena completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican las regiones constante de la cadena pesada y constantes de la cadena ligera del isotipo deseado tal que el segmento  $V_H$  se une operativamente al segmento(s) CH dentro del vector y el segmento  $V_L$  se une operativamente al segmento CL dentro del vector.
- 20 Además o de forma alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena del anticuerpo de una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector tal que el péptido señal se una en marco al extremo amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).
- 25 Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" se requiere que incluya a promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, las señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Tales secuencias reguladoras son descritas, por ejemplo, en Goeddel; *Gene Expression Technology*. "Methods in Enzymology" **185**, Academic Press, San Diego, California (1990).
- 30 Será apreciado por los expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se transforma, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc.
- 35 Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de la célula huésped mamífera incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de la expresión de la proteína en células mamíferas, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), Virus Símico 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. O bien, pueden usarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de  $\beta$ -globina.
- 40 Además de los genes de la cadena del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes que expresan las moléculas que inhiben la angiogénesis de la invención pueden llevar otras secuencias, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las cuales el vector ha sido introducido (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N<sup>os</sup>. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia frente a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la cual el vector ha sido introducido.
- 45 Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para el uso en células dhfr-huésped con selección/amplificación de metotrexato) y el neo-gen (para la selección de G418).
- 50 Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el(los) vector(es) de expresión que codifica(n) las cadenas pesadas y ligeras es(son) transfectado(s) en una célula huésped por técnicas estándares. Las diversas formas del término "transfección" son requeridas para que abarquen una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción del ADN exógeno en una célula huésped procariótica o eucariótica, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección de DEAE-dextrano y otras similares. Aunque sea teóricamente posible expresar las moléculas de la invención en células huésped procarióticas o eucarióticas, la expresión en células eucarióticas, y células huésped lo más preferiblemente mamíferas, es la más preferida porque tales células eucarióticas, y en particular células mamíferas, se ensamblan más probablemente que las células procarióticas y secretan el anticuerpo correctamente plgado e inmunológicamente activo, su fragmento o derivado.
- 55 Las células huésped mamíferas preferidas que expresan los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células CHO (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982)

5 *Mol. Biol.* **159**: 601-621), células de mieloma de NS/0, células COS, células HEK293 y células SP2.0. En particular, para el uso con células de mieloma NS/0, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión de genes de GS (glutamina sintetasa) descrito en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338841. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican los genes del anticuerpo son introducidos en células huésped mamíferas, los productos de expresión se producen cultivando las células huésped durante un periodo del tiempo suficiente para permitir la expresión del producto en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción del producto en el medio de cultivo en el cual las células huésped se cultivan. Los productos de expresión pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas estándares.

10 O bien, los genes del anticuerpo clonados pueden ser expresados en otros sistemas de expresión, incluyendo células procarióticas, tales como microorganismos, por ejemplo, *E. coli* para la producción de anticuerpos scFv, así como células de insecto. Además, los anticuerpos pueden producirse en animales no humanos transgénicos, tal como en la leche de ovejas y conejos o huevos de gallinas, o en plantas transgénicas. Véase, por ejemplo, Verma, R., *et al.* (1998). "Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems". *J. Immunol. Meth.* **216**: 165-181; Pollock, *et al.* (1999). "Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies". *J. Immunol. Meth.* **231**: 147-157; y Fischer, R., *et al.* (1999). "Molecular farming of recombinant antibodies in plants". *Biol. Chem.* **380**: 825-839.

20 Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada y ligera (CDRs). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDRs son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDRs. Como las secuencias de CDR son responsables de la mayor parte de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de los anticuerpos específicos que se dan naturalmente construyendo vectores de expresión que incluyan secuencias de CDR del anticuerpo específico que se dan naturalmente, en este caso en particular H33, injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.*, 1998, *Nature* **332**: 323-327; Jones, P. *et al.*, 1986, *Nature* **321**: 522-525; y Queen, C. *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 10029-10033). Tales secuencias marco pueden ser obtenidas a partir de bases de datos de ADN públicas que incluyan secuencias del gen del anticuerpo de la línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal se diferenciarán de las secuencias del gen del anticuerpo maduras porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que son formados por V (D) J uniéndose durante la maduración de células B. Las secuencias del gen de la línea germinal también se diferenciarán de las secuencias de un anticuerpo repertorio secundario de afinidad alta que contiene mutaciones en todas partes de los genes variables pero que típicamente se agrupan en las CDRs. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la parte del extremo amino de la región marco 1 y en la parte del extremo carboxi de la región marco 4. Además, muchas mutaciones somáticas no cambian significativamente las propiedades de unión del anticuerpo.

35 Por esta razón, no es necesario obtener la secuencia de ADN entera de un anticuerpo particular a fin de recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase el documento WO 99/45962). La secuencia de la cadena pesada y ligera parcial que atraviesa las regiones CDR es típicamente suficiente para este fin. La secuencia parcial se usa para determinar qué variable de la línea germinal y segmentos de genes que se unen contribuyeron a los genes variables del anticuerpo recombinado. La secuencia de la línea germinal se usa entonces para rellenar partes ausentes de las regiones variables. Las secuencias líder de la cadena pesada y ligera se dividen durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir las secuencias ausentes, pueden combinarse las secuencias de cDNA clonadas con oligonucleótidos sintéticos por hibridación o amplificación PCR. O bien, puede sintetizarse la región variable entera como un grupo de oligonucleótidos cortos, que se sobrelapan, y combinarse por amplificación PCR para crear un clon de la región variable completamente sintético. Este proceso tiene ciertas ventajas tales como la eliminación o inclusión de sitios de restricción particulares, u optimización de codones particulares.

En esta solicitud, la expresión "moléculas que inhiben la angiogénesis" se refiere a H33 y todos sus posibles fragmentos y derivados que retienen la misma especificidad o similar como se describe en este documento.

50 La invención también se refiere al uso de las moléculas que inhiben la angiogénesis, tales como H33, sus fragmentos y derivados, para la preparación de una composición terapéutica o diagnóstica para el tratamiento o el diagnóstico del cáncer, en particular de tumores sólidos.

55 La invención también se refiere a composiciones terapéuticas o diagnósticas para el tratamiento o el diagnóstico del cáncer, en particular de tumores sólidos, que comprende una cantidad terapéuticamente o diagnósticamente eficaz de una o varias moléculas que inhiben la angiogénesis de la invención y un excipiente adecuado, vehículo, diluyente u otro aditivo. El experto en el campo de la terapia cancerígena será capaz de establecer la cantidad terapéuticamente o diagnósticamente eficaz.

La composición también puede incluir una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) moléculas que inhiban la angiogénesis de la invención.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir al menos un agente quimioterapéutico, al menos un agente antiinflamatorio o al menos un agente inmunodepresivo.

5 En otra realización, las moléculas que inhiben la angiogénesis de la invención pueden administrarse junto con radioterapia.

En otra realización, las moléculas que inhiben la angiogénesis de la invención pueden administrarse en combinación con uno o varios anticuerpos diferentes, por ejemplo, uno o varios anticuerpos humanos tales como, por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF.

10 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un bolo solo, varias dosis divididas pueden administrarse con el tiempo o la dosis puede ser reducida o aumentada proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es sobre todo ventajoso formular composiciones parenterales en la forma de dosis unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. La forma de dosis unitaria así usada en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que se tratan; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado conjuntamente con el vehículo farmacéutico requerido. La memoria descriptiva para las formas de dosis unitaria de la invención es dictada y es directamente dependiente de (a) las características propias del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se consiga, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de componer un compuesto tal activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

20 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" según se usa en este documento significan modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, por lo general por inyección o infusión, e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e infusión.

25 Las moléculas que inhiben la angiogénesis de la invención pueden estar comprendidas en la composición farmacéutica junto con un excipiente, vehículo o diluyente adecuado.

30 Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tal como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y otros similares), y sus mezclas adecuadas, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como el oleato de etilo.

35 Estas composiciones también pueden contener aditivos tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Puede asegurarse la prevención de la presencia de microorganismos tanto por procedimientos de esterilización, como por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, paraben, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y otros similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y otros similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede estar causada por la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

40 Cuando se administran los compuestos de la presente invención como productos farmacéuticos, a seres humanos y animales, pueden ser administrados solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, de 0,01 a 99,5 % (más preferiblemente, de 0,1 a 90 %) de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 Sin tener en cuenta la ruta de administración seleccionada, las moléculas que inhiben la angiogénesis de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosis farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

50 Los niveles de administración reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de administración seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o su éster, sal o amida, ruta de administración, tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica previa del paciente tratado, y factores típicos muy conocidos en las artes médicas.

55 Un médico o veterinario que tenga una habilidad ordinaria en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o el veterinario podrían comenzar la administración de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles más bajos que

los requeridos a fin de conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que el efecto deseado sea conseguido. En general, una dosis diaria adecuada de las composiciones de la invención será una en que la cantidad del compuesto será la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos más arriba.

5 La administración puede ser apropiadamente intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferiblemente puede administrarse proximal al sitio de reconocimiento. De ser deseado, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado en intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosis unitaria. Aunque sea posible que sea administrado un compuesto de la presente invención solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).

10 Por ejemplo, usando H33 como la molécula que inhibe la angiogénesis, la administración puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de anticuerpos H33 circulantes en diferentes puntos de tiempo siguiendo la administración en una muestra biológica haciendo uso de anticuerpos anti-idiotípicos que reconocen los anticuerpos H33 o usando otros métodos específicos para detectar los anticuerpos H33, por ejemplo, mediante un ensayo ELISA usando JAM-C como revestimiento.

15 Las composiciones terapéuticas también pueden administrarse con los dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, puede administrarse una composición terapéutica de la invención con un dispositivo de inyección hipodérmico sin aguja, tales como los dispositivos descritos en las patentes de EE.UU. N<sup>os</sup>. 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de implantaciones conocidas y módulos útiles en la presente invención incluyen: la patente de EE.UU. N<sup>o</sup>. 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar la medicación a una velocidad controlada; la patente de Estados Unidos N<sup>o</sup>. 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos por la piel; la patente de Estados Unidos N<sup>o</sup>. 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para administrar la medicación a una velocidad de infusión precisa; la patente de Estados Unidos N<sup>o</sup>. 4.447.224, que describe un aparato de infusión de flujo variable implantable para la administración de fármaco continua; la patente de EE.UU. N<sup>o</sup>. 4.439.196, que describe un sistema de administración de fármaco osmótico que tiene compartimentos de multicámara; y la patente de Estados Unidos N<sup>o</sup>. 4.475.196, que describe un sistema de administración de fármaco osmótico. Muchas otras tales implantaciones, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en la técnica.

20 En ciertas realizaciones, las moléculas que inhiben la angiogénesis de la invención pueden formularse para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera sangre-cerebro (BSC) excluye muchos compuestos muy hidrófilos. Para asegurarse de que los compuestos terapéuticos de la invención pueden cruzar la BSC (de ser deseado), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricar liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N<sup>os</sup>. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o varios restos que se transportan selectivamente en células específicas u órganos, realizándose así la administración del fármaco diana (véase, por ejemplo, V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* **29**: 685). Ejemplos de restos de reconocimiento incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N<sup>o</sup>. 5.416.016 de Low *et al.*); manósidas (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**: 1038); anticuerpos (P. G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* **357**: 140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 180); tensioactivo del receptor de la proteína A (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* **1233**: 134), cuyas diferentes especies pueden comprender las formulaciones de las invenciones, así como componentes de las moléculas inventadas; pl20 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 9090); véanse también K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* **346**: 123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* **4**: 273.

25 En una realización de la invención, las moléculas que inhiben la angiogénesis de la invención se formulan en liposomas; en una realización más preferida, los liposomas incluyen un resto de reconocimiento. En la realización más preferida, los compuestos terapéuticos en los liposomas son administrados mediante inyección por bolo a un sitio proximal al área deseada, por ejemplo, el sitio de un tumor. La composición debe ser fluida hasta un grado que sea fácil de inyectar. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenaje y debe conservarse contra la acción de la contaminación de microorganismos tales como bacterias y hongos.

30 Las dosis eficientes y los regímenes de dosificación para las moléculas que inhiben la angiogénesis de la invención dependen de la enfermedad o condición que se trate y pueden ser determinadas por los expertos en la técnica.

35 Una "dosis terapéuticamente eficaz" para la terapia del tumor puede medirse por las respuestas objetivas del tumor que pueden ser o completas o parciales. Una respuesta completa (CR) se define como no clínica, radiológica u otra prueba de la enfermedad. Una respuesta parcial (PR) se presenta con una reducción del tamaño del tumor agregado mayor que el 50 %. El tiempo promedio respecto a la progresión es una medida que caracteriza la durabilidad de la respuesta objetiva del tumor.

40 Una "dosis terapéuticamente eficaz" para la terapia del tumor también puede medirse por su capacidad de estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer puede evaluarse en un sistema modelo de animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o por otra parte puede mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto

ordinario en la técnica sería capaz de determinar las cantidades según factores tales como el tamaño del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto y la composición particular o ruta de administración seleccionada.

En consecuencia, los pacientes tratados con las composiciones de la invención pueden administrarse además (antes, simultáneamente o después de la administración de una molécula de la invención) con otros agentes terapéuticos, que realcen o aumenten el efecto terapéutico de las moléculas de la invención.

La invención además también se refiere al uso de los compuestos de la invención en el diagnóstico. Los anticuerpos marcados pueden usarse por ejemplo para localizar tumores en el cuerpo. El marcaje de anticuerpos con elementos radiactivos, paramagnéticos u otros es una técnica conocida en la técnica.

En una realización particular, la invención proporciona métodos para diagnosticar enfermedades asociadas con JAM-C por la detección *ex vivo* o *in vitro* de JAM-C en una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido, una muestra de fluido corporal o una muestra de células. Esto puede conseguirse, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra que se analiza, opcionalmente junto con una muestra control, con el anticuerpo H33 o su derivado o fragmento en condiciones que permitan la formación de un complejo entre H33 y JAM-C. La formación del complejo puede detectarse entonces (por ejemplo, usando un ELISA). Usando una muestra de control junto con la muestra de ensayo, el complejo puede detectarse en ambas muestras y cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de complejos entre las muestras es indicativa de la presencia de JAM-C en la muestra de ensayo.

La presente invención será descrita además en los Ejemplos que siguen. Estos Ejemplos tienen sólo objetivos ilustrativos y no se tiene intención de limitar la invención de ningún modo. En los Ejemplos, se hace referencia a las figuras siguientes.

La figura 1 muestra que JAM-C se expresa por los vasos sanguíneos en el tumor de hígado humano. La expresión de JAM-C fue analizada con un panel de tumores angiogénicos. Las transcripciones que codifican JAM-C humano no están presentes en el hígado normal. La inmunotinción de secciones congeladas con el anticuerpo anti-JAM-C muestra la expresión por una subpoblación de vasos sanguíneos (punta de flecha). La tinción con un anticuerpo policlónico contra PECAM-1 para visualizar estructuras vasculares se muestra en el panel derecho y la característica angiogénica del tumor fue controlada por tinción con  $\alpha V\beta 3$  (inserto).

La figura 2 muestra que JAM-C es reclutada en uniones inter-endoteliales de HUVECs bajo la estimulación de VEGF.

(A) se estimularon HUVECs con VEGF-165 recombinante, se fijaron con formaldehído y la localización de JAM-C fue visualizada con el anticuerpo monoclonal anti-JAM-C. Como control, se realizó la tinción de JAM-A. La molécula JAM-C fue enriquecida en contactos de célula-célula bajo la estimulación de VEGF-165 mientras que no fue visto ningún efecto con JAM-A. (B) El análisis FACS reveló que el enriquecimiento de JAM-C en contactos de célula-célula es debido a la relocalización de la molécula ya que el nivel de expresión permanecía sin alterar después del tratamiento de VEGF (línea delgada, control negativo; línea de puntos, células no tratadas; línea gruesa, células tratadas con VEGF).

La figura 3 muestra que el anticuerpo monoclonal anti-JAM-C impedía la angiogénesis *in vitro*. Se cultivaron anillos aórticos de ratones entre dos capas de Matrigel en presencia o ausencia de anticuerpos anti-JAM-C (50  $\mu\text{g/ml}$ ) y la neovascularización fue visualizada después de 12 días. Las fotos son microfotografías de luz de microvasos de anillos aórticos representativos no tratados (A, n=11) o tratados con anticuerpos monoclonales anti-JAM-C H33, (B, n=11) y D33 (C, n=6) o anticuerpo control asociado al isotipo Mell4 (D, n=6). Sólo H33 bloqueó la germinación angiogénica.

La figura 4 muestra que el anticuerpo anti-JAM-C H33 reducía el crecimiento tumoral y la vascularización del tumor. Los ratones fueron inyectados subcutáneamente con células de tumor LLC1 y fueron tratados cada dos días con anticuerpo anti-JAM-C o anticuerpo control asociado al isotipo (150  $\mu\text{g}$ ). (A) la aparición macroscópica de tumores LLC1 de 12-días cultivados en ratones de control (PBS e isotipo - anticuerpo de control emparejado) o en ratones tratados con el anticuerpo de JAM-C anti-H33. Los ratones tratados con anticuerpo H33 anti-JAM-C muestran un menor crecimiento del tumor como se indica por la medida del volumen del tumor (B) y el peso del tumor (C). Los microvasos se detectaron por inmunotinción con PECAM-1 (D) y se cuantificaron mediante análisis informático (E). \*  $p < 0,01$ . Cada barra representa el valor medio de diez animales analizados  $\pm$  sem.

La figura 5 muestra que el anticuerpo de H33 anti-JAM-C no es tóxico *in vivo*. Para evaluar que el efecto del anticuerpo de H33 anti-JAM-C sobre el crecimiento del tumor no era debido a un efecto tóxico general *in vivo*, los ratones fueron tratados como se describe en la Figura 4 y los órganos se disecaron y se analizaron. (A) El riñón de estos ratones teñidos con el ácido periódico-Schiff (PAS) no mostró ningún signo del desarrollo de glomerulonefritis. Como control, fueron comparadas las secciones del riñón de ratones NZBxBXSB afectados autoinmunes (Merino R. *et al.*, *J Clin Invest.* **94** (2): 521-5 (1994)). (B) Se evaluó la permeabilidad de los vasos sanguíneos *in vivo* usando el ensayo de permeabilidad azul de Evans. El anticuerpo H33 no tuvo ningún efecto en la permeabilidad vascular en los órganos representativos corazón, pulmón, riñón y cerebro. Cada barra representa el valor medio de siete animales analizados  $\pm$  sem.

La figura 6 muestra la cuantificación de glomérulos durante la revascularización de retinas. Los números de glomérulos fueron contados para comparar la neovascularización retinal en ratones tratados con anticuerpo H33 y control tratados con anticuerpo. La reducción del número de glomérulos fue observada en ratones tratados con H33 (13H33) comparado

con ratones control (ctrl) o ratones tratados con anticuerpo control asociado con el isotipo (9B5). Esto indica una menor neovascularización de las retinas en animales tratados con H33.

5 La figura 7 muestra que el anticuerpo anti-JAM-C H33 reduce el número de macrófagos en tumores. Se tiñeron criosecciones de tumor de LLC1 de ratones tratados con PBS, anticuerpo control o H33 según la fosfatasa ácida para detectar macrófagos (A, punta de flecha). La densidad de los microvasos se cuantificó contando el número de macrófagos marcados por mm<sup>2</sup> dentro del tumor (B). Los tumores de los animales tratados con H33 muestran menos macrófagos infiltrados, comparado con los animales control. Cada barra representa el valor medio ± SEM, obtenido de cuatro secciones de n ratones por grupo (PBS, n=6; anticuerpo control, n=6; H33, n=9). \*\* p <0,01. Escalas barras, (A) 160 mm, (B) 20 mm.

10 La figura 8 muestra que el anticuerpo H33 no afecta, ni a la proliferación, ni a la apoptosis de las células endoteliales. Las células endoteliales (A) o células tumorales LLC1 (B) fueron sembradas en el intervalo de 1,25x10<sup>4</sup> a 5x10<sup>4</sup> células por pocillo y se cultivaron en presencia o ausencia del anticuerpo H33 o del anticuerpo control. La tasa de proliferación se determinó usando el ensayo de MTT. El anticuerpo de H33 no influye en la proliferación de células endoteliales y tumorales. (C) Se inmunotiñeron criosecciones de tumor de LLC1 de ratones control asociado al isotipo o tratados con H33 para PECAM-1 (verde) y para células apoptóticas con tinción TUNEL (rojo, puntas de flecha). Las células endoteliales no exhiben un aumento de la apoptosis cuando los ratones fueron tratados con el anticuerpo H33 comparado con los controles. En contraste, las células tumorales muestran una mayor apoptosis como se demuestra por la cuantificación de células apoptóticas dentro del tumor (D).

## **EJEMPLOS**

### **20 EJEMPLO 1**

#### Preparación de una población de anticuerpos contra JAM-B o JAM-C

Se prepara una población de anticuerpos que se analiza en el método de la invención según Kohler y Milstein, *Nature* **256**: 495-497 (1975). La fuente de antígenos para obtener tal población de anticuerpos consiste en JAM-B soluble recombinante o JAM-C preparada como se describe en el Ejemplo 3.

### **25 EJEMPLO 2**

#### Preparación de JAM-B y JAM-C soluble

Se encontró por los presentes inventores que JAM-C se relacionaba heterofílicamente con JAM-B por su dominio V y que el dominio V de JAM-C soluble es suficiente para unirse a JAM-B.

30 Los dominios V de JAM-B soluble y JAM-C soluble fueron obtenidos por PCR usando la misma estrategia de clonación. Los cebadores fueron obtenidos de Microsynth (Microsynth GmbH, Balgach, Suiza), y los sitios de restricción añadidos para la estrategia de clonación están subrayados. El cDNA que codifica el dominio V extracelular de JAM-C fue amplificado usando el plásmido que codifica la secuencia de longitud completa de JAM-C murina, Pfu polimerasa, T7 (y 5'-gctctagacagtgtgccgtcttgccctacag-3') como cebadores directos e inversos. El producto PCR fue digerido con HindIII y XbaI antes de clonar en pcDNA3 que contiene la secuencia FLAG-tag.

35 La JAM-B soluble se prepara como sigue: el cDNA que codifica la JAM-B soluble fue obtenido por PCR usando (5'-tcagctagcagccagct-3') y (5'-gctctagatctactctgcttc-3') como cebadores directos e inversos. El producto PCR digerido con XbaI fue clonado entonces en marco con la secuencia FLAG-tag en pcDNA3 usando los sitios EcoRI/blunt y XbaI.

### **EJEMPLO 3**

#### **40 Prueba para la capacidad de prevenir la interacción entre JAM-B y JAM-C**

Las células que expresan JAM-B o JAM-C en su superficie son obtenidas como se describe en Aurrand-Lions *et al.*, *J Biol Chem* **276**: 2733-41 (2001a); Aurrand-Lions *et al.*, *Blood* **98**: 3699-707 (2001b); Johnson-Leger *et al.*, *Blood* **100**: 2479-2486 (2002).

45 JAM-B soluble y JAM-C obtenidas como se describe en el Ejemplo 2 se marcan con ésteres de sulfosuccinimidilo de Alexa 488 (Molecular Probes Inc.) o sulfo-NHS-Biotina (Pierce) según los procedimientos de los fabricantes.

Las células que expresan JAM-B o JAM-C son puestas en contacto con JAM-C soluble marcada o JAM-B, respectivamente en presencia de las moléculas que se analizan. La fluorescencia se controla con citometría de flujo y la disminución en la intensidad de la fluorescencia comparando con el control no tratado, indica una menor unión de JAM-C soluble o JAM-B soluble.

**EJEMPLO 4**Prueba para la capacidad de bloquear la angiogénesis *in vivo*

El día postnatal 7 (P7) los ratones se colocan en oxígeno del 75 % durante cinco días causando la avascularización central de las retinas (Reynolds *et al.*, *Nature Medicine* **8**: 27-34 (2002)). Esta incubación es seguida del alojamiento de los ratones durante cinco días más (hasta P17) en condiciones normóxicas. A los ratones se les inyecta intraperitonealmente con 50 µg de anticuerpos monoclonales en P12, P14 y P16. La neovascularización se detecta por perfusión de toda la vasculatura con una solución de fluoresceína - dextrano no difusible. En retinas montadas planas, se detectan las áreas de la neovascularización y los glomérulos vasculares. Los glomérulos vasculares son grupos muy proliferativos de vasos tortuosos que son producidos en respuesta a estímulos angiogénicos y que sobresalen de la membrana limitante interior. Los números de glomérulos se cuentan para comparar la neovascularización retinal en ratones tratados con una molécula que se analiza y en ratones control.

Una de las moléculas analizadas es el anticuerpo monoclonal H33 que causó una reducción de la neovascularización.

**EJEMPLO 5**El anticuerpo monoclonal H33 dirigido contra JAM-C es un inhibidor del crecimiento de tumores y la angiogénesis

## 15 1. MATERIALES Y MÉTODOS

*Anticuerpos*

Los anticuerpos monoclonales de rata (CRAM) contra JAM-C humano y de ratón (H33, H36 y D33) y anticuerpos monoclonales de rata contra PECAM-1/CD31 de ratón (GC51) y L-selectina/CD62L (Mell4) han sido previamente descritos (Aurrand-Lions *et al.*, 2001a, *supra*; Gallatin *et al.*, *Nature* **330**: 30-34 (1983); Piali *et al.*, *Eur J Immunol.* **23**: 2464-71 (1993); Springer *et al.*, *Eur. J. Immunol.* **9**: 301 (1979). El CD44 antihumano (9B5) usado como anticuerpo irrelevante IgG2a de rata control fue amablemente proporcionado por el doctor B. Engelhardt (Laschinger y Engelhardt, 2000). Cualquier otro anticuerpo no relacionado puede usarse como control negativo. El anticuerpo policlonal contra JAM-B humana se preparó según Palmeri *et al.*, *J Biol Chem.* **275**: 19139-45 (2000). La integrina antihumana de ratón monoclonal αvβ3 (LM609) era de Chemicon (Temecula, CA).

25 *Células endoteliales*

Se aislaron Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana (HUVEC) por tratamiento con colagenasa de venas umbilicales (Wall RT *et al.*, *J Cell Physiol.* **96**: 203-213 (1978)). Los HUVECs fueron mantenidos en M199 suplementado con Suero de Ternero Fetal al 20 % (Laboratorios PAA), HEPES 25 mM (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico), aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, suplemento de crecimiento celular endotelial (ECGS, 15 µg/mL; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), y heparina (4 µg/ml; Sigma, Buchs, Suiza). Las células fueron usadas entre los pasos 3 y 5.

*Estimulación de VEGF*

1. Se pusieron en placas 1x10<sup>5</sup> HUVECs en el Factor de Crecimiento Reducido Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA, EE. UU.). Después de 48 horas, las células fueron incubadas con 100 ng/ml de VEGF-165 humanos recombinantes (PeproTech House, Londres, Reino Unido) durante 15 minutos (inmunoquímica) o de 15 minutos a 24 horas (citometría de flujo).

*Citometría de flujo*

Los HUVECs fueron incubados con anticuerpo monoclonal anti-JAM-C H36 en hielo. Después de lavar con PBS, la unión de BSA al 0,2 % del anticuerpo H36 se detectó usando un anticuerpo de anti-rata conectado con ficoeritrina (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc, West Grove, PA, EE.UU.). Como control, el anticuerpo primario fue omitido. El análisis fue realizado usando FACSCalibur y el Software Cellquest (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EE.UU.).

*Inmunotinción*

Para la inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal anti-JAM-C (H36) y anticuerpo policlonal contra JAM-B/VE-JAM, las secciones congeladas se fijaron con acetona/metanol 1:1 durante 5 minutos a - 20°C, fueron secadas e hidratadas de nuevo en PBS, gelatina al 0,2 %, Tween 20 al 0,05 %. Para la inmunocitoquímica, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 15 minutos antes de la permeabilización con Tritonx100 al 0,01 % en PBS durante 10 minutos. Las células se lavaron con PBS, BSA al 0,2 %, se incubaron con anticuerpos primarios durante una hora y se lavaron, antes de una incubación adicional con anticuerpos secundarios conectados a Texas Red, FITC o peroxidasa (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc, West Grove, PA, EE.UU.). Las fotos fueron tomadas usando el microscopio confocal Zeiss LSM510. La glomerulonefritis se detectó por tinción de riñón con ácido periódico-Schiff (PAS).

*Ensayo de anillo aórtico ex vivo*

5 Se realizaron ensayos de anillos aórticos de ratón como se ha descrito (Nicosia, R. F. y Ottinetti, *In Vitro Cell Dev Biol.* **26** (2): 119-28 (1990). Brevemente, fueron colocados anillos aórticos torácicos de 1 mm entre dos capas de 50  $\mu$ l de factor de crecimiento-Matrigel reducido (Becton Dickinson, Bedford, MA, EE.UU.) que contenía opcionalmente un anticuerpo que se analizaba, y revestido con 100  $\mu$ l de DMEM suplementado con 20 U/ml de heparina (Corporación Sigma-Aldrich, Sant-Louis, MO EE.UU.) y ECGS (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, EE.UU.). La generación de los microvasos fue visualizada por microscopia de fase usando un microscopio Zeiss Axioskop.

*Injerto de tumor*

10 Fueron inoculados subcutáneamente ratones C56BL/6J de 8 a 10 semanas hembras (laboratorios de Charles River, L'Arbresle, Francia) con  $1 \times 10^6$  células de carcinoma de pulmón de Lewis murinas (LLC1). A los ratones les fueron inyectados entonces intraperitonealmente cada dos días 150  $\mu$ g de anticuerpo monoclonal H33, anticuerpo de control asociado al isotipo Mell4 o PBS. Cuando los tumores de control (ratones inyectados con PBS) habían alcanzado 1-1,5  $\text{cm}^3$ , los animales se sacrificaron y los tumores se extirparon y analizaron.

*Cuantificación de vasos*

15 Se tiñeron criosecciones de tumor con el anticuerpo PECAM-1 anti-monoclonal como se describe en el Capítulo de la Inmuntinción. Fueron tomadas fotos de todas las criosecciones (4 criosecciones por tumor) usando un microscopio Zeiss Axioskop. La tinción de PECAM-1 y el área total del tumor fueron cuantificados usando el software Zeiss KS400.

*Ensayo de permeabilidad azul de Evans*

20 Fueron inyectados 150  $\mu$ g de anticuerpos anti-JAM-C o de control asociados al isotipo en la vena retro-orbital de ratones anestesiados. Después de 15 minutos, 100  $\mu$ l de una solución de tinte azul de Evans a 30 mg/kg (Corporación Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EE.UU.) en solución salina fue inyectada del mismo modo que los anticuerpos, y circuló durante una hora. Los ratones fueron sometidos entonces a perfusión con paraformaldehído al 1 % con tampón de citrato, pH 4,2, 37°C para limpiar el tinte del lumen del vaso. Inmediatamente después de la perfusión, los órganos (riñón, pulmón, corazón y cerebro) fueron disecados. Después de secar (Speed-Vac) el tejido, el peso en seco fue medido. El azul de Evans fue extraído mediante la incubación posterior del tejido en 500  $\mu$ l de formamida durante 18 horas a 70°C. El extracto fue centrifugado y la absorbancia del sobrenadante fue medida a 620 nm con un espectrofotómetro. La concentración de tinte en los extractos fue calculada a partir de una curva estándar de azul de Evans en formamida y se normalizó frente al peso del tejido en seco.

*Análisis estadístico*

30 Los recuentos de la densidad de vasos, el volumen del tumor y el peso del tumor fueron analizados usando la prueba *t* de Mann-Whitney. Los análisis fueron calculados usando el software StatView (Abacus Concepts Inc, Berkeley, CA, EE.UU.).

**RESULTADOS***La JAM-C se expresa por los vasos del tumor y es receptiva a estímulos angiogénicos*

35 En el tumor angiogénico del hígado humano, el anticuerpo H36 anti-JAM-C tiñe los vasos sanguíneos (Figura 1). En contraste, el transcrito que codifica JAM-C no está presente en el hígado normal. El tratamiento de HUVECs con VEGF conduce a la acumulación inmediata y masiva de JAM-C en contactos célula-célula endoteliales a los 15 minutos (Figura 2A). Esta corta aparición es el resultado de la relocalización de JAM-C y el nivel de expresión no se modifica por este tratamiento (Figura 2B). Los mismos resultados fueron observados cuando se estimularon HUVECs con TNF- $\alpha$  o trombina.

*La generación de vasos in vitro es inhibida por el anticuerpo monoclonal anti-JAM-C*

45 La neovascularización *in vitro* fue realizada usando ensayos de anillos aórticos *ex vivo*. Se cortaron aortas de ratón recientemente diseccionadas en anillos pequeños y se empaparon en Matrigel en presencia o ausencia de anticuerpos anti-JAM-C. La generación de vasos endoteliales de los anillos aórticos fue evaluada por un período de 12 días. Mientras que la presencia de anticuerpos anti-JAM-C control o asociados a isotipo no afectan al brote aórtico, el anticuerpo de H33 anti-JAM-C bloquea totalmente la neo-vascularización (Figura 3).

*El anticuerpo monoclonal anti-JAM-C reduce el crecimiento del tumor y la angiogénesis in vivo*

50 Considerando que la angiogénesis *in vitro* puede bloquearse con el anticuerpo anti-JAM-C H33, los inventores investigaron si este anticuerpo tenía algún efecto en la angiogénesis del tumor y el crecimiento del tumor. A los ratones les fueron inyectados subcutáneamente células de carcinoma de pulmón de Lewis. A los ratones les fueron inyectados después intra-peritonealmente cada dos días anticuerpos anti-JAM-C y control. Los animales fueron sacrificados cuando los tumores de control alcanzaron 1-1,5  $\text{cm}^3$  y los tumores se extirparon. El tamaño del tumor (Figura 4A), el volumen

(Figura 4B) y el peso (Figura 4C) fueron considerablemente menores cuando los ratones fueron tratados con anticuerpo de JAM-C anti-H33 comparado con el anticuerpo asociado al isotipo de control o PBS.

Los ejemplos representativos de tumores extirpados son mostrados en la figura 4A. Las células de carcinoma de pulmón de Lewis no expresan JAM-C (datos no mostrados). El efecto del anticuerpo H33 en el crecimiento del tumor es debido a la inhibición de la angiogénesis. A fin de visualizar la vasculatura del tumor, las criosecciones se inmunotifieron con el anticuerpo frente al marcador PECAM-1 endotelial (Figura 4D). La densidad de los vasos sanguíneos fue cuantificada contando el % de tinción de PECAM-1 a través del área del tumor (Figura 4E). El anticuerpo H33 redujo el número de vasos sanguíneos en los tumores cuando se compara con los controles.

*El anticuerpo monoclonal anti-JAM-C H33 no es tóxico in vivo*

Se sabe que los anticuerpos pueden ser tóxicos cuando se inyectan *in vivo*. A fin de controlar que el efecto observado del anticuerpo anti-JAM-C H33 no era debido a un efecto tóxico general en ratones, fue investigado si los animales inyectados del anticuerpo desarrollaban patologías. Ya que JAM-C se expresa por el endotelio en el riñón, fue analizado primero si el anticuerpo creaba glomerulonefritis. Para este fin, las secciones de riñón de animales tratados fueron teñidas con ácido periódico-Schiff. No se detectó ninguna acumulación anormal de la proteína en glomérulos (Figura 5A).

Ya que la JAM-C está implicada en el control de la permeabilidad vascular también fue analizado si el anticuerpo inducía el agujereado de los vasos sanguíneos. Por suerte no fue así en corazón, pulmón, riñón o cerebro, los órganos representativos analizados (Figura 5B).

La reducción del número de glomérulos fue observada en las retinas de ratones tratados con H33 comparado con los ratones control (ctrl) o los tratados con anticuerpo control asociado al isotipo. Esto indica una menor neo-vascularización de retinas en animales tratados con H33 (Figura 6).

## EJEMPLO 6

El anticuerpo anti-JAM-C H33 reduce el número de macrófagos en tumores, pero no afecta ni a la proliferación, ni a la apoptosis de las células endoteliales

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Histología y cuantificación de la densidad de vasos, células apoptóticas y contenido de macrófagos en los tumores*

Para la inmunohistoquímica en las criosecciones de tumor con el anticuerpo monoclonal anti-PECAM-1 (GC51), las secciones fueron fijadas con acetona/metanol 1:1 durante 5 minutos a -20°C, fueron secadas e hidratadas en PBS/Gelatina al 0,2 %/Tween 20 al 0,05 %. Las secciones se incubaron con anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente y, después de 3 lavados en PBS, se incubaron con un anticuerpo secundario conectado a la peroxidasa (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc, West Grove, PA, EE.UU.).

Para la inmunohistoquímica en secciones de ojo empapadas de parafina y fijadas con paraformaldehído con anticuerpos policlónicos contra PECAM-1 y JAM-C, las secciones se desceraron siguiendo un procedimiento clásico. Las secciones del tejido fueron tratadas entonces con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3 % en metanol durante 10 minutos, se lavaron en PBS y se bloquearon con PBS/BSA al 3 % /Tween 20 al 0,1 % durante 30 minutos. Las secciones se incubaron con anticuerpos policlónicos durante 1 hora a temperatura ambiente y, después se lavaron en PBS, se incubaron con el sistema EnVision® durante 30 minutos (DakoCytomation AG, Zg, Suiza).

La actividad de la fosfatasa ácida se detectó en las criosecciones tumorales usando el método antes descrito en (Kindler, V. *et al.*, *Cell*, **56**: 731-740, 1989). La detección de las células apoptóticas en las criosecciones tumorales estaba basada en el marcaje de rupturas de cadena de ADN (método de fluorescencia TUNEL) y se realizó usando la Terminal Transferasa y biotina-16-dUTP, según las instrucciones del fabricante (Roche diagnostics AG, Rotkreuz, Suiza).

Se detectó biotina-16-dUTP con streptavidina acoplada a tinte de Rojo de Texas (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc, West Grove, PA, EE. UU.).

Las fotos fueron tomadas usando un microscopio confocal Zeiss LSM510 o un microscopio Zeiss Axiophot 1 equipado con una cámara CCD de color AxioCam. Las imágenes fueron registradas y tratadas usando el software AxioVisionTX (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Para cuantificar el número de células positivas por fosfatasa ácida (macrófagos) y el número de células TUNELpositivas (células apoptóticas) en los tumores, fueron analizadas las fotos de toda la criosección (4 criosecciones por tumor) usando el software Zeiss KS400 u Openlab (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

*Prueba MTT para la determinación de la proliferación de células*

El índice de proliferación de células endoteliales primarias murinas (LMEC) y células tumorales (LLC1) fue determinado usando el método MTT (bromuro de 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil-tetrazolio) como se describe en Hansen, MB *et al.*, *J Immunol Methods*, **119**: 203-210, 1989. Brevemente, las células fueron puestas en placas por triplicado en placas de 96 pocillos a densidades en el intervalo de  $1,25 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$  células por pocillo y se cultivaron en medio completo en presencia o ausencia de 50 mg/ml de anticuerpo anti-JAM-C H33 o anticuerpo control 9B5. Después de 24 horas del cultivo, fueron añadidos 25 ml de la solución de MTT (5 mg/ml en PBS estéril) a cada pocillo, y después de 2 horas de una incubación a 37°C, fueron añadidos 100 ml del tampón de extracción (20 % p/v de SDS disuelto en una solución de DMF y agua desmineralizada; el pH fue ajustado a 4,7 añadiendo 2,5 % de un ácido acético al 80 % y HCl 1N al 2,5 %). Después de una incubación de una noche - a 37°C- fueron medidas las densidades ópticas a 570 nm usando un lector de microplaca (Corporación Molecular Devices, CA, EE. UU.).

**RESULTADOS***El anticuerpo anti-JAM-C H33 reduce el reclutamiento de macrófagos en los tumores*

La angiogénesis de tumores a menudo está acompañada por la inflamación y los macrófagos representan las células inflamatorias asociadas al tumor generadas (Crowther, M *et al.*, *J Leukoc Biol* **70**: 478-490, 2001). En efecto, los macrófagos participan en la angiogénesis secretando factores angiogénicos tales como VEGF, sobre todo en condiciones hipóxicas (Murdoch, C *et al.*, *Blood* **104** (8): 2224-34, 2004). JAM-C está implicada en la adhesión de los leucocitos y la trans migración a través de las células endoteliales y epiteliales (Zen, K *et al.*, *Mol Biol Cell* **15**: 3926-3937, 2004; Chavakis, T *et al.*, *J Biol Chem*, 2004; Johnson-Leger, CA *et al.*, *Blood* **100**: 2479-2486, 2002, Cunningham, SA *et al.*, *J Biol Chem* **275**: 34750-34756, 2000).

Fue así investigado si el anticuerpo H33 podía afectar al reclutamiento de macrófagos en tumores. Como se muestra en las figuras 7B y 7D, los ratones tratados con el anticuerpo H33 mostraron un menor contenido de macrófagos en tumores comparado con los ratones control. Esto indica que el efecto de H33 en la angiogénesis está mediado en parte por su acción en el reclutamiento de macrófagos.

*El anticuerpo anti-JAM-C H33 no tiene ningún efecto en la proliferación de las células endoteliales o en la apoptosis*

La angiogénesis es un proceso complejo orquestado por la proliferación y la reorganización arquitectónica de células endoteliales bajo estímulos angiogénicos. Fue primero analizado si el anticuerpo H33 bloqueaba la angiogénesis inhibiendo la proliferación de células endoteliales *in vitro* y no se encontró ningún efecto (figura 8A). Para evitar cualquier consecuencia directa del tratamiento H33 en la proliferación de células tumorales, el experimento también fue realizado con células tumorales *in vitro* y ningún efecto fue detectable (figura 8B).

Estos resultados indicaron que la reducción de la angiogénesis observada después de la administración de H33 no estaba causada por la prevención del crecimiento vascular o de células tumorales. La estimulación de la apoptosis sería otra explicación de la reducción de la angiogénesis inducida por el tratamiento con H33. Esta hipótesis fue analizada en secciones de tumor identificando la apoptosis por un protocolo de marcaje estándar de células apoptóticas (TUNEL). Los resultados revelaron que el anticuerpo H33 no tuvo ninguna consecuencia en la apoptosis de células endoteliales *in vivo* e *in vitro* (figura 8C y datos no mostrados). Sin embargo, las células tumorales mostraron un mayor marcaje TUNEL *in vivo*, sugiriendo que la apoptosis ocurría como consecuencia de la menor vascularización mediada por el anticuerpo (figura 8C y D).

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula que inhibe la angiogénesis, que se selecciona del grupo que consiste en el anticuerpo H33, producido por el hibridoma 13H33 según está depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH con el número de entrada de depósito DSM ACC2622, y sus fragmentos y derivados que tienen la misma especificidad que H33 para su uso como un medicamento.
2. La molécula que inhibe la angiogénesis según se reivindica en la reivindicación 1, en la que la molécula se selecciona del grupo que consiste en:
- 10 a. un anticuerpo humanizado basado en H33 y que tiene la misma especificidad que el anticuerpo H33;
- b. un anticuerpo quimérico basado en H33 y que tiene la misma especificidad que el anticuerpo H33;
- c. un fragmento de H33 seleccionado de:
- 15 i. un fragmento Fab,
- ii. un fragmento Fv;
- iii. un fragmento de unión antígeno de dominio simple;
- iv. un scFv, un dímero de un scFv, un trímero de scFv y un agregado más grande de un scFv;
- v. V<sub>HH</sub>;
- d. un anticuerpo recombinante que tiene especificidad de H33; y
- e. un anticuerpo monoclonal humano que tiene especificidad como H33, para uso como un medicamento
3. La molécula que inhibe la angiogénesis según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la molécula:
- 20 a. bloquea la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*;
- b. previene el crecimiento de tumores *in vivo*;
- c. reduce el reclutamiento de macrófagos en tumores; y
- d. bloquea la interacción de JAM-C con la JAM-B, para su uso como un medicamento
4. La molécula que inhibe la angiogénesis según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en la terapia del cáncer.
- 25 5. La molécula que inhibe la angiogénesis según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el diagnóstico *in vivo* del cáncer.
6. El uso de una molécula que inhibe la angiogénesis según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el diagnóstico *in vitro* del cáncer.
- 30 7. La molécula que inhibe la angiogénesis según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, en la que el cáncer es un tumor sólido.
8. Una composición farmacéutica que comprende una molécula que inhibe la angiogénesis según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 junto con un excipiente adecuado, vehículo o diluyente, para su uso como un medicamento.
- 35 9. Una composición farmacéutica que comprende una molécula que inhibe la angiogénesis según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 junto con un excipiente adecuado, vehículo o diluyente, para su uso como un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Figura 1

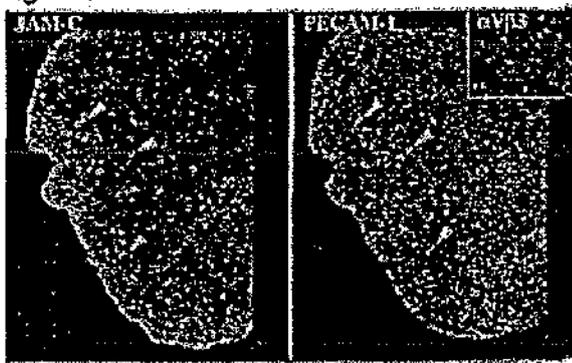


Figura 2

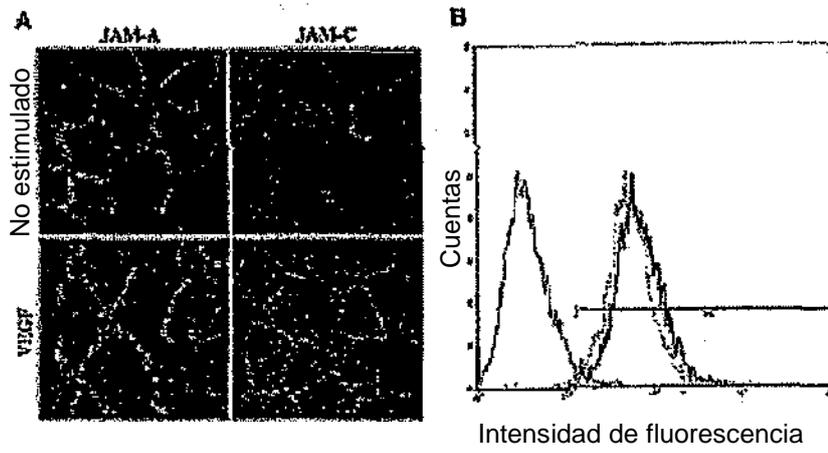


Figura 3

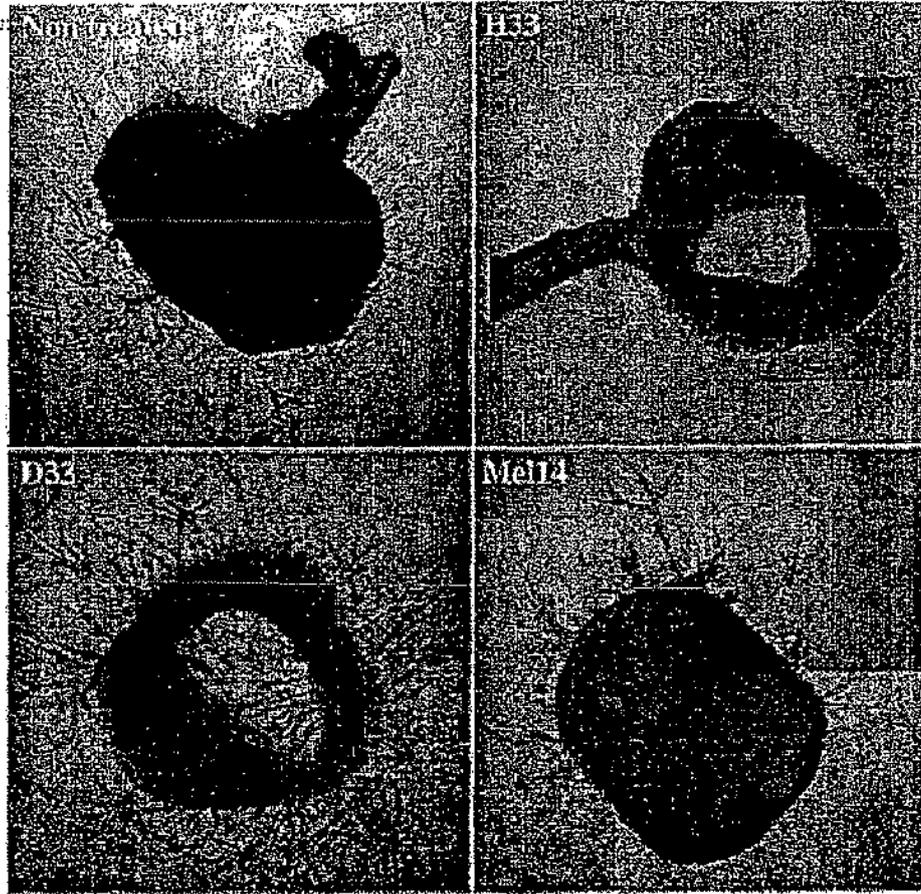


Figura 4

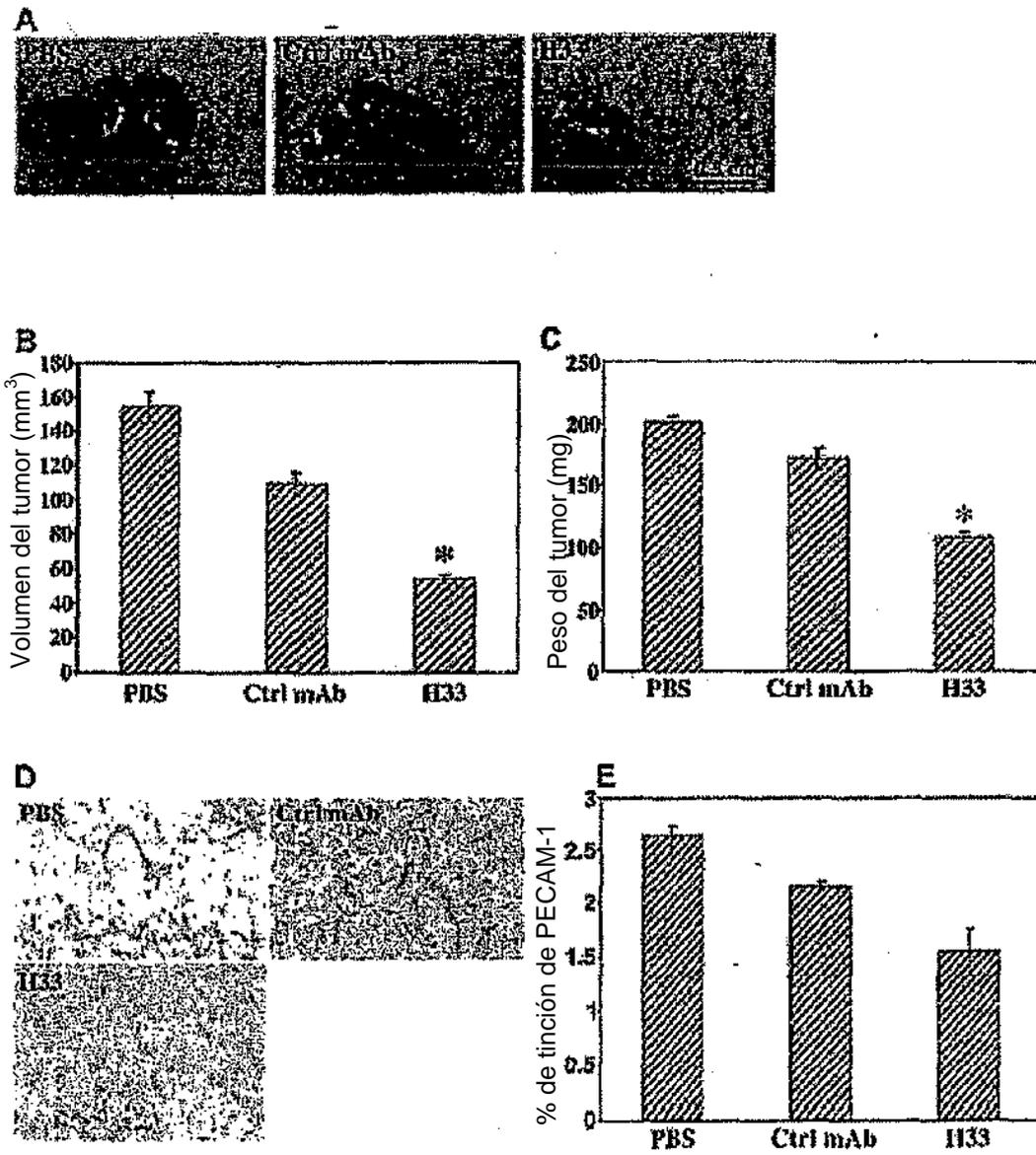
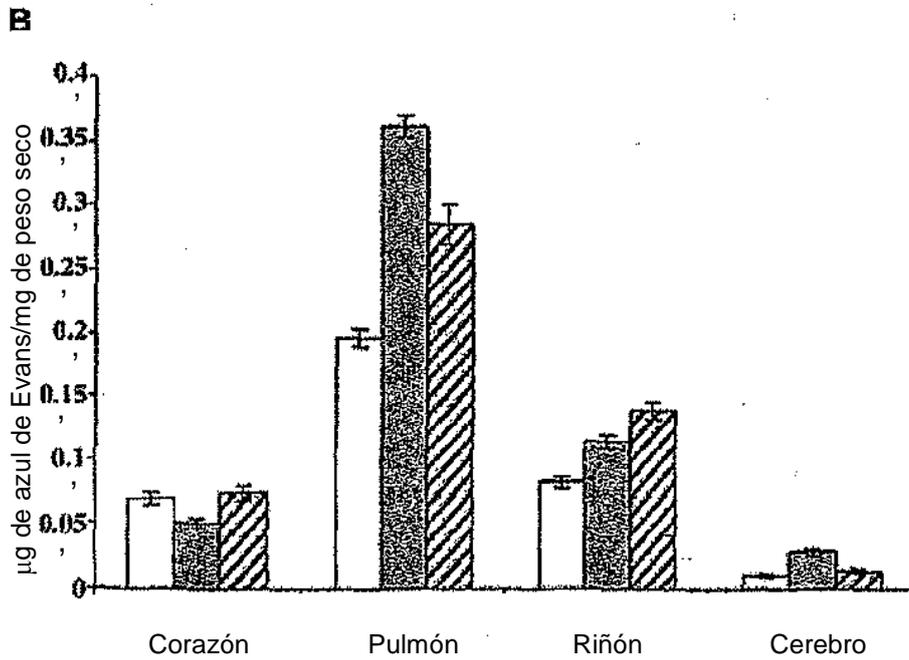
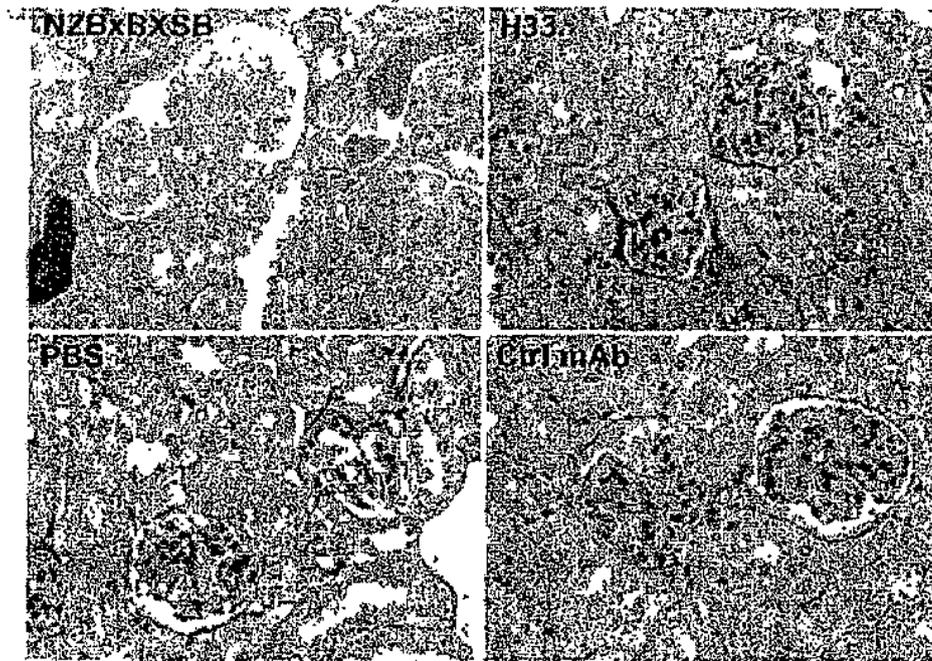


Figura 5



Angiogénesis retinal inducida por hipoxia

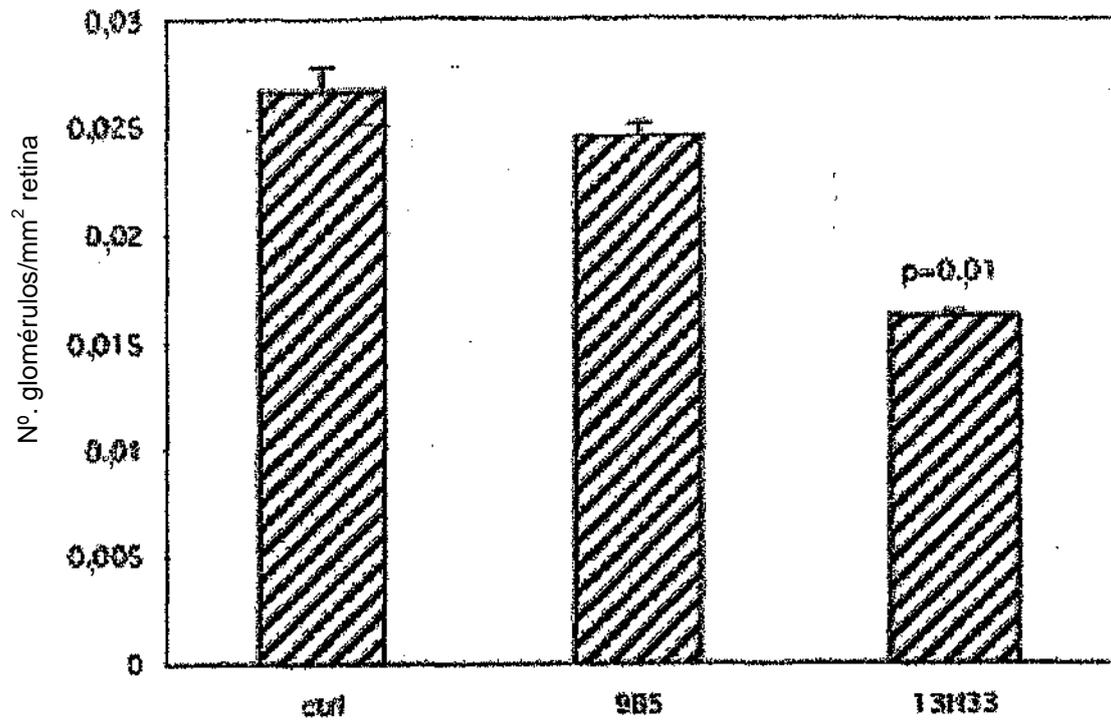


Figura 6

Figura 7

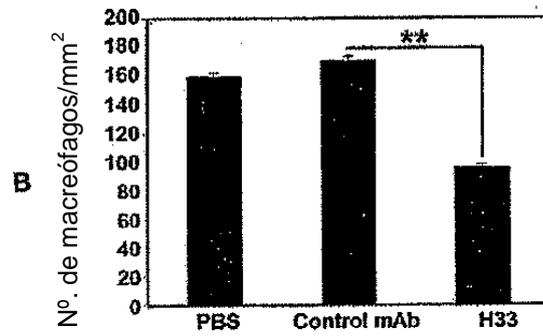
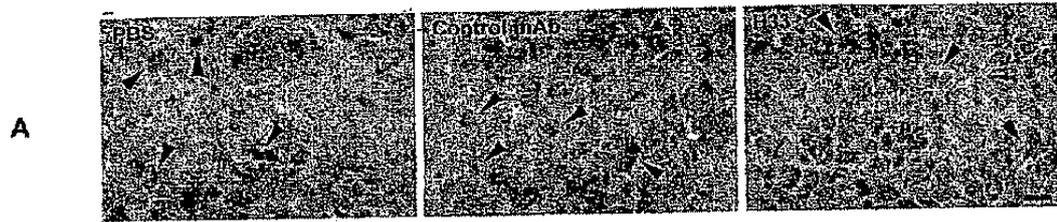


Figura 8

