



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 052**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01) **C12N 5/28** (2006.01)  
**C12N 15/08** (2006.01) **G01N 33/574** (2006.01)  
**G01N 33/577** (2006.01) **A61K 51/10** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01) **A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03710116 .9**

96 Fecha de presentación : **10.03.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1485415**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2004**

54

Título: **Anticuerpos específicos de neoplasmas y sus utilizaciones.**

30

Prioridad: **09.03.2002 DE 102 10 427**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.05.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.05.2011**

73

Titular/es: **PATRY'S LIMITED**  
**Level 6, Suite 614, 343 Lt Collins St**  
**Melbourne, Victoria 3000, AU**

72

Inventor/es: **Vollmers, Heinz, Peter y**  
**Mueller-Hermelink, Hans, Konrad**

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 359 052 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

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico y del tratamiento del cáncer y, más específicamente, a la identificación de polipéptidos, tales como anticuerpos, útiles en el diagnóstico, la detección, la monitorización y el tratamiento de neoplasmas en un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

En los Estados Unidos cada año se diagnostica con cáncer muy por encima de un millón de individuos. Aunque los avances recientes en el campo médico han mejorado significativamente la tasa de supervivencia entre los pacientes con cáncer, todavía podría evitarse un gran número de muertes relacionadas con el cáncer mediante el diagnóstico temprano del tumor. Por lo tanto, en el momento del diagnóstico inicial, un número alarmante de pacientes ya ha alcanzado estadios tardíos de la enfermedad.

Con respecto al cáncer colorrectal, el pronóstico es habitualmente escaso en el 50% de todos los casos porque el tumor a menudo no se detecta hasta que la enfermedad se ha expandido y alcanzado un estadio terminal. De manera similar, a aproximadamente un 75% de las mujeres se les diagnostica cáncer de ovario después que la enfermedad ya ha alcanzado un estadio avanzado (estadio III o IV) porque los síntomas del cáncer de ovario a menudo son imprecisos o "silenciosos". A pesar de la intervención quirúrgica agresiva y los nuevos regímenes quimioterápicos, la tasa de supervivencia global a 5 años para estas mujeres con cáncer de ovario en estadio avanzado ha permanecido constante durante los últimos 30 años, en aproximadamente 15%. Por el contrario, las mujeres a las que se les ha diagnosticado cáncer confinado en el ovario (estadio I) presentan una tasa de supervivencia global a 5 años de aproximadamente 90%.

El documento WO 01/93560 A1 describe un anticuerpo que reconoce un receptor TRAIL DR5 y que presenta una actividad inductora de la apoptosis frente a una célula que expresa DR5 *in vivo*. El documento WO 97/13844 A1 describe un elemento de unión específica que comprende un dominio de unión a antígeno de anticuerpo humano específico para TGF $\beta$  humano, que se une a las isoformas de TGF $\beta$  humano TGF $\beta$ 1 o TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 1, preferentemente con respecto a TGF $\beta$ 3. El documento EP 1 106 183 A2 describe la utilización de un anticuerpo anti-ErbB2 en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un tumor o cáncer asociado con la sobreexpresión o activación de ErbB2, siendo dicho tumor o cáncer un tumor de hígado, tumor colorrectal, tumor de próstata, tumor pancreático, tumor vulvar, tumor de tiroides, tumor hepático, sarcoma, glioblastoma, tumor de cabeza y cuello, leucemia o neoplasia linfóide.

Claramente, existe una necesidad de la detección y el tratamiento tempranos y mejorados de neoplasmas (por ejemplo, un adenocarcinoma colorrectal, cáncer de ovario, carcinoma escamoso de pulmón, carcinoma lobulillar de mama, carcinoma de estómago, carcinoma de células escamosas de esófago, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma ductal de mama, adenocarcinoma uterino, o adenocarcinoma de próstata), ya que esto aumentaría la posibilidad del tratamiento del neoplasma, y conduciría así a un pronóstico mejorado para la supervivencia a largo plazo.

**SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

Se ha descubierto un anticuerpo que reacciona con un epítipo específico para células neoplásicas. Estos polipéptidos no son sólo excelentes herramientas de diagnóstico, sino que también puede inducir la apoptosis de las células neoplásicas a las que se unen. Esta última característica da lugar a un tratamiento para enfermedades neoplásicas que carece de los efectos secundarios de muchos agentes terapéuticos existentes.

La invención se refiere a un anticuerpo purificado o un fragmento funcional del mismo, uniéndose dicho anticuerpo o fragmento funcional específicamente a por lo menos una de las células HT-29 (n.º de registro de la ATCC HTB-38; n.º de registro de la DSMZ ACC 299), CACO-2 (n.º de registro de la ATCC HBT-37; n.º de registro de la DSMZ ACC 169), COLO-320 (n.º de registro de la DSMZ ACC 144), COLO-206F (n.º de registro de la DSMZ ACC 21), o COLO-678 (n.º de registro de la DSMZ 194), dicho anticuerpo o fragmento funcional del mismo induce la apoptosis o inhibe la proliferación de células neoplásicas, y comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento funcional del mismo una secuencia de región variable de cadena pesada que es por lo menos 95% idéntica a la SEC ID n.º: 1 y una secuencia de región variable de cadena ligera que es por lo menos 95% idéntica a la SEC ID n.º: 3.

En un tercer aspecto, la invención muestra un polipéptido purificado que comprende un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo que se une específicamente a por lo menos una de las células HT-29 (n.º de registro de la ATCC HTB-38; n.º de registro de la DSMZ ACC 299), CACO-2 (n.º de registro de la ATCC HBT-37; n.º de registro de la DSMZ ACC 169), COLO-320 ((n.º de registro de la DSMZ ACC 144), COLO-206F (n.º de registro de la DSMZ ACC 21), o COLO-678 (n.º de registro de la DSMZ 194)), y en el que dicho anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una secuencia de región variable de cadena pesada expuesta como SEC ID n.º 1 y sustancialmente idéntica a la secuencia de región variable de cadena ligera expuesta como SEC ID n.º: 3.

El anticuerpo purificado, o un fragmento funcional del mismo, de la invención, inhibe la proliferación celular

cuando se une a una célula neoplásica, pero no inhibe la proliferación celular de una célula que no es neoplásica, uniéndose el anticuerpo específicamente a una célula de adenocarcinoma colorrectal, cáncer de ovario, carcinoma escamoso de pulmón, carcinoma lobulillar de mama, carcinoma de estómago, carcinoma de células escamosas de esófago, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma ductal de mama, adenocarcinoma uterino, o adenocarcinoma de próstata y no a una célula que no es neoplásica.

En las formas de realización preferidas de los primeros cuatro aspectos de la invención, el anticuerpo purificado incluye una secuencia que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 1 y/o la SEC ID n°: 3. Además, esta secuencia de aminoácidos del polipéptido purificado puede ser idéntica a la secuencia de la SEC ID n°: 1 y/o la SEC ID n°: 3. En otras formas de realización preferidas, el anticuerpo purificado es un anticuerpo monoclonal humano. Además, el fragmento funcional puede ser un fragmento Fab, Fab', o F(ab')<sub>2</sub>. Un fragmento funcional de este tipo puede incluir un fragmento que es sustancialmente idéntico, o que es idéntico, a la secuencia de la SEC ID n°: 1 o la SEC ID n°: 3. De manera preferida, la función de un fragmento de este tipo es la capacidad para inducir la apoptosis de una célula neoplásica y no de una célula que no es neoplásica o para inhibir la proliferación de una célula neoplásica y no de una célula que no es neoplásica.

Además, la invención se refiere a una célula que produce el anticuerpo o fragmento funcional de la invención. Dicha célula puede ser una célula de hibridoma. También puede ser una célula de levadura o bacteria.

En una forma de realización preferida, la invención muestra un procedimiento de generación de la célula reivindicada en este aspecto. Este procedimiento implica las etapas que consisten en (a) poner en contacto linfocitos con una línea celular de heteromioma en condiciones que dan lugar a la fusión de un linfocito con una célula de heteromioma, dando lugar a esta fusión un hibridoma y (b) determinar si el hibridoma produce un polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, que se une específicamente a por lo menos una de las células HT-29 (n.º de registro de la ATCC HTB-38; n.º de registro de la DSMZ ACC 299), CACO-2 (n.º de registro de la ATCC HBT-37; n.º de registro de la DSMZ ACC 169), COLO-320 (n.º de registro de la DSMZ ACC 144), COLO-206F (n.º de registro de la DSMZ ACC 21) o COLO-678 (n.º de registro de la DSMZ 194).

En otra forma de realización preferida, la invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico de un neoplasma, tal como un adenocarcinoma colorrectal, cáncer de ovario, carcinoma escamoso de pulmón, carcinoma lobulillar de mama, carcinoma de estómago, carcinoma de células escamosas de esófago, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma ductal de mama, adenocarcinoma uterino, o adenocarcinoma de próstata, en un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Este procedimiento implica las etapas siguientes (a) poner en contacto una célula o muestra de tejido del mamífero con el polipéptido purificado de estos aspectos de la invención, y (b) detectar si el polipéptido purificado se une a la célula o muestra de tejido, en el que la unión del polipéptido purificado a la célula o muestra de tejido es indicativa de que el mamífero presenta un neoplasma. En las formas de realización preferidas de este procedimiento, el polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo, se conjuga con un agente detectable, por ejemplo, un radionúclido, un marcador fluorescente, una enzima, una citotoxina, una citocina, o un inhibidor del crecimiento, o el polipéptido se conjuga con una etiqueta de purificación de proteína, por ejemplo, una etiqueta de purificación de proteína que puede escindirse.

En otras formas de realización preferidas, la invención muestra la utilización de un anticuerpo o el fragmento funcional del mismo según la invención para tratar un trastorno proliferativo, tal como un adenocarcinoma colorrectal, cáncer de ovario, carcinoma escamoso de pulmón, carcinoma lobulillar de mama, carcinoma de estómago, carcinoma de células escamosas de esófago, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma ductal de mama, adenocarcinoma uterino, o adenocarcinoma de próstata, en un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Este procedimiento implica la etapa que consiste en poner en contacto una célula o muestra de tejido con el anticuerpo purificado o el fragmento funcional del mismo según la invención, dando como resultado la unión del polipéptido purificado a la célula o muestra de tejido la inducción de la apoptosis de la célula o muestra de tejido. En las formas de realización preferidas de este procedimiento, el polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo, se conjuga con un agente detectable, por ejemplo, un radionúclido, un marcador fluorescente, una enzima, una citotoxina, una citocina, o un inhibidor del crecimiento, o el polipéptido se conjuga con una etiqueta de purificación de proteína, por ejemplo, una etiqueta de purificación de proteína que puede escindirse.

El agente detectable puede estar constituido por un polipéptido que es específico para una célula neoplásica y un compuesto que puede destruir la célula neoplásica, por ejemplo, induciendo la apoptosis. El efecto de destrucción celular puede deberse completamente al compuesto unido al polipéptido, o se debe quizás a un efecto aditivo o sinérgico del compuesto y el polipéptido contenidos en el agente detectable. Los ejemplos de compuestos que puede destruir una célula incluyen radionúclidos, citotoxinas y citocinas.

En otras formas de realización preferidas de esta utilización, la invención presenta el tratamiento de un trastorno proliferativo, tal como un adenocarcinoma colorrectal, cáncer de ovario, carcinoma escamoso de pulmón, carcinoma lobulillar de mama, carcinoma de estómago, carcinoma de células escamosas de esófago, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma ductal de mama, adenocarcinoma uterino, o adenocarcinoma de próstata, en un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Esta utilización implica la etapa de poner en contacto una célula o muestra de tejido con el anticuerpo purificado o el fragmento funcional del mismo según la invención en la que la unión del polipéptido purificado a la célula o muestra de tejido da lugar a una reducción en la proliferación de la célula o de una

célula en la muestra de tejido. En las formas de realización preferidas de este procedimiento, el polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo, se conjuga con un agente detectable, por ejemplo, un radionúclido, un marcador fluorescente, una enzima, una citotoxina, una citocina, o un inhibidor del crecimiento, o el polipéptido se conjuga con una etiqueta de purificación de proteína, por ejemplo, una etiqueta de purificación de proteína que puede escindirse.

5 El agente detectable puede estar constituido por un polipéptido que es específico para una célula neoplásica y un compuesto, por ejemplo, un inhibidor del crecimiento, que puede inhibir la proliferación de la célula neoplásica. El efecto de inhibición de la proliferación puede deberse completamente al compuesto unido al polipéptido, o se debe quizás a un efecto aditivo o sinérgico del compuesto y el polipéptido contenidos en el agente detectable.

10 Otras formas de realización preferidas de la invención incluyen un medicamento que contiene el anticuerpo purificado o el fragmento funcional del mismo según la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente de diagnóstico que contiene el anticuerpo purificado o el fragmento funcional del mismo según la invención.

### **DEFINICIONES**

15 Mediante “agente detectable” se hace referencia a un compuesto que se une a un agente de diagnóstico para facilitar la detección. Un “agente detectable” de este tipo puede unirse de manera covalente o no covalente a un agente de diagnóstico. Además, la unión puede ser directa o indirecta. Los ejemplos de “agentes detectables” incluyen etiquetas de purificación de proteína, citotoxinas, enzimas, marcadores paramagnéticos, sustratos enzimáticos, cofactores, inhibidores enzimáticos, colorantes, radionúclidos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores fluorescentes, inhibidores del crecimiento, citocinas, anticuerpos y biotina.

20 Mediante “agente de diagnóstico” se hace referencia a un compuesto que puede utilizarse para detectar una célula neoplásica utilizando cualquiera de los ensayos descritos en la presente memoria así como cualquier otro procedimiento que es habitual en la técnica. Un agente de diagnóstico puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a por lo menos una de las células siguientes: HT-29 (n.º de registro de la ATCC HTB-38; n.º de registro de la DSMZ ACC 299), CACO-2 (n.º de registro de la ATCC HBT-37; n.º de registro de la DSMZ ACC 169), COLO-320 (n.º de registro de la DSMZ ACC 144), COLO-206F (n.º de registro de la DSMZ ACC 21) y COLO-678 (n.º de registro de la DSMZ 194), pero no a las células que no son neoplásicas. Además, un “agente de diagnóstico” puede inhibir la proliferación celular, inducir la apoptosis, o ambos sólo cuando se une a una célula neoplásica, pero no a una célula que no es neoplásica.

30 Los ejemplos de células neoplásicas que pueden detectarse con un “agente de diagnóstico” de este tipo incluyen células de adenocarcinoma colorrectal, cáncer de ovario, carcinoma escamoso de pulmón, carcinoma lobulillar de mama, carcinoma de estómago, carcinoma de células escamosas de esófago, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma ductal de mama, adenocarcinoma uterino o adenocarcinoma de próstata. Además, un “agente de diagnóstico” puede incluir, por ejemplo, péptidos, polipéptidos, moléculas orgánicas sintéticas, moléculas orgánicas que se producen de manera natural, moléculas de ácido nucleico, y componentes de los mismos, así como uno o más agentes detectables unidos de manera covalente o no covalente al agente de diagnóstico.

35 Por un “fragmento funcional”, tal como se utiliza en la presente memoria en referencia al polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo, se entiende, por ejemplo, un fragmento  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $F_V$ ,  $F_C$ , Fab, Fab' o  $F(ab')_2$  de un anticuerpo (véanse, por ejemplo, Huston *et al.*, Cell Biophys. 22:189-224, 1993; y Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). De manera preferida, un “fragmento funcional” presenta una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a un fragmento, por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 15, 30, 50, 75 ó 100 aminoácidos contiguos, de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n.º: 1 ó 3. En las formas de realización más preferidas, un “fragmento funcional” es idéntico a un fragmento de la secuencia de la SEC ID n.º: 1 ó 3. Un “fragmento funcional” de este tipo puede contener 5, 10, 15, 20, 15, 30, 50, 75 ó 100 aminoácidos contiguos de la SEC ID n.º: 1 ó 3, o puede ser la secuencia de aminoácidos completa de la SEC ID n.º: ó 3.

40 Además, un “fragmento funcional” de un polipéptido presenta por lo menos una actividad biológica del polipéptido de longitud completa. Los ejemplos de una actividad biológica de este tipo son la capacidad para unirse a un antígeno, inducir la apoptosis, y/o inhibir la proliferación celular. Estas actividades biológicas pueden determinarse, por ejemplo, utilizando uno cualquiera de los ensayos descritos en la presente memoria.

45 Por “condiciones de hibridación de alta rigurosidad” se entiende, por ejemplo, hibridación a aproximadamente 42°C en aproximadamente formamida al 50%, ADN de esperma de salmón sometido a cizallamiento 0,1 mg/ml, SDS al 1%, SSC 2X, sulfato de dextrano al 10%, un primer lavado a aproximadamente 65°C en aproximadamente SSC 2X, SDS al 1%, seguido por un segundo lavado a aproximadamente 65°C en aproximadamente SSC 0,1X. Alternativamente, las “condiciones de hibridación de alta rigurosidad” pueden incluir hibridación a aproximadamente 42°C en aproximadamente formamida al 50%, ADN de esperma de salmón sometido a cizallamiento 0,1 mg/ml, SDS al 0,5%, SSPE 5X, disolución de Denhardt 1X, seguido por dos lavados a temperatura ambiente en SSC 2X, SDS al 0,1%, y dos lavados a entre 55-60°C en SSC 0,2X, SDS al 0,1%.

55 Un “hibridoma”, tal como se utiliza en la presente memoria, es cualquier célula que se crea de manera artificial mediante la fusión de una célula normal tal como un linfocito activado con una célula neoplásica, por ejemplo, un

mieloma. La célula híbrida, que resulta de la fusión de por lo menos dos células, puede producir un anticuerpo monoclonal o producto de célula T idénticos a los producidos por el progenitor inmunológicamente competente. Además, estas células, como el progenitor neoplásico, son inmortales.

5 La "inhibición de la proliferación celular", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una reducción en la tasa de división celular de una célula en comparación con la tasa normal de división celular de ese tipo de célula. La inhibición de la proliferación celular puede someterse a ensayo utilizando varios procedimientos convencionales en la materia, por ejemplo, el ensayo de proliferación celular MTT descrito en la presente memoria, la incorporación de BrdU y la captación de <sup>3</sup>H timidina. Tales ensayos se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nueva York, 2001; y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989. De manera deseable, la inhibición de la proliferación celular es del 20%, 40%, 50% o el 75%. En las formas de realización preferidas, la inhibición de la proliferación celular es del 80%, 90%, 95%, o incluso una inhibición completa de la proliferación celular.

15 "Inducción de la apoptosis", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la aparición de características en una célula que están bien definidas en la técnica (véanse, por ejemplo, Wyllie *et al.*, Br. J. Cancer 80 Supl. 1:34-37, 1999; Kerr *et al.*, Br. J. Cancer 26:239-257, 1972). Estas características incluyen características morfológicas, tales como formación de vesículas en la membrana, condensación del ADN, así como cambios en el contenido de F-actina, masa mitocondrial y potencial de membrana. La inducción de la apoptosis puede someterse a ensayo utilizando varios procedimientos convencionales en la técnica, por ejemplo, un ELISA de muerte celular, tinción TUNEL, tinciones de ADN, por ejemplo, Hoechst 33258, y tiñendo con varios colorantes vitales tales como naranja de acridina, tinción Mito Tracker Red<sup>®</sup> (Molecular Probes, Eugene, OR), y tinción Annexin V<sup>®</sup> (Becton Dickinson, NJ). Tal como se utiliza en la presente memoria "inducir apoptosis" se refiere a un aumento en el número de células que experimentan apoptosis en comparación con una población de células control. Por ejemplo, el aumento de la apoptosis puede ser del 10%, 20%, 40%, 50% o el 75%. En las formas de realización preferidas, la inducción de la apoptosis da lugar a un aumento de la apoptosis que es 2 veces, 3 veces, 10 veces o incluso 100 veces con respecto a lo observado en una población de células control.

25 Una "célula neoplásica", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una célula que está experimentando división celular, que no está experimentando apoptosis, o ambos, en condiciones inapropiadas. Por ejemplo, una "célula neoplásica" puede experimentar división celular cuando una célula que no es neoplásica correspondiente no experimenta división celular, o, alternativamente, una "célula neoplásica" no puede responder a controles en puntos de control del ciclo celular normal.

30 Una "enfermedad proliferativa", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier trastorno que da lugar a la proliferación anómala de una célula. Ejemplos específicos de enfermedades proliferativas son diversos tipos de neoplasmas, tales como adenocarcinomas colorrectales, cáncer de ovario, carcinomas escamosos de pulmón, carcinomas lobulillares de mama, carcinomas de estómago, carcinomas escamosos de esófago, adenocarcinomas pancreáticos, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas ductales de mama, adenocarcinomas uterinos, o adenocarcinomas de próstata. Sin embargo, las enfermedades proliferativas también pueden ser el resultado de que la célula se infecte con un virus transformante.

35 Una "etiqueta de purificación de proteína", tal como se utiliza en la presente memoria, es un péptido, por ejemplo, una etiqueta epitópica, que se añade de manera covalente o no covalente a una proteína para ayudar en la purificación de la proteína. De manera deseable, tales péptidos se unen con alta afinidad a un anticuerpo u otro péptido tal como biotina o avidina. Los ejemplos comercializados de etiquetas epitópicas incluyen colas de His, etiquetas de HA, etiquetas de FLAG<sup>®</sup> y etiquetas de c-Myc. Sin embargo, cualquier epítipo que un anticuerpo reconoce puede utilizarse también como una etiqueta de purificación de proteína. Véanse, por ejemplo, Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nueva York, 2001; y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., (1989). Las etiquetas de purificación de proteína pueden escindirse de una proteína, por ejemplo, utilizando una enzima, por ejemplo, trombina, o un compuesto químico, por ejemplo, bromuro de cianógeno.

40 Por "reconocer específicamente", tal como se utiliza en la presente memoria en referencia a un polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo, se entiende un aumento de la afinidad de un polipéptido por una proteína particular, por ejemplo, un antígeno, en relación con una cantidad igual de cualquier otra proteína. Por ejemplo, un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humano CM-1, que se une específicamente a células HT-29 (n.º de registro de la American Type Culture Collection ("ATCC") HTB-38, n.º de registro de la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures ("DSMZ") ACC 299), CACO-2 (n.º de registro de la ATCC HBT-37, n.º de registro de la DSMZ ACC 169), COLO-320 (n.º de registro de la DSMZ ACC 144), COLO-206F (n.º de registro de la DSMZ ACC 21), o COLO-678 (n.º de registro de la DSMZ 194) de manera deseable presenta una afinidad por sus antígeno que es por lo menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 30 veces o 100 veces mayor que para una cantidad igual de cualquier otro antígeno, incluyendo antígenos relacionados. La unión de un polipéptido a otro polipéptido puede determinarse tal como se describe en la presente memoria, y mediante cualquier número de procedimientos convencionales en la materia, por ejemplo, análisis de tipo Western, ELISA o coimmunoprecipitación.

60 Por "sustancialmente idéntico" se entiende un polipéptido o ácido nucleico que presenta por lo menos el 75%,

80%, 85% o el 90% de identidad con respecto a una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de referencia. En las formas de realización preferidas, la secuencia de ácido nucleico o de polipéptido es por lo menos el 95%, 98%, 99% o el 100% idéntica a una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de referencia. Para los polipéptidos, la longitud de las secuencias de comparación será generalmente de por lo menos 5, 10 ó 15 aminoácidos y de manera deseable por lo menos 20 ó 25 aminoácidos contiguos. En las formas de realización más preferidas, la longitud de las secuencias de comparación es de por lo menos 30, 50, 75, 90, 95 ó 100 aminoácidos contiguos, o incluso la secuencia de aminoácidos de longitud completa. Para los ácidos nucleicos, la longitud de las secuencias de comparación será generalmente de por lo menos 15, 30 ó 45 nucleótidos contiguos, y de manera deseable de por lo menos 60 nucleótidos contiguos. En realizaciones más deseables, la longitud de las secuencias de comparación es de por lo menos 75, 150, 225, 270, 285 ó 300 nucleótidos contiguos, o incluso la secuencia de nucleótidos de longitud completa.

La identidad de secuencia puede medirse utilizando un software de análisis de secuencias con los parámetros por defecto (por ejemplo, el software de análisis de secuencias del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Tal software puede aparear secuencias similares asignando grados de homología a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones. Las sustituciones conservativas incluyen normalmente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina.

También pueden alinearse múltiples secuencias utilizando el programa Clustal W(1.4) (producido por Julie D. Thompson y Toby Gibson del European Molecular Biology Laboratory, Alemania, y Desmond Higgins del European Bioinformatics Institute, Cambridge, R.U.) fijando el modo de alineación por parejas en "lento", incluyendo los parámetros de alineación por parejas una penalización por apertura de huecos 10,0 y una penalización por extensión de huecos de 0,1, así como fijando la matriz de similitud en "blosum". Además, los parámetros de alineación múltiple pueden incluir una penalización por apertura de huecos de 10,0, una penalización por extensión de huecos de 0,1, así como fijar la matriz de similitud en "blosum", la divergencia por retraso en el 40%, y la distancia de hueco en 8.

Por "purificado" se entiende separado de otros componentes que lo acompañan de manera natural. Normalmente, un factor es sustancialmente puro cuando es por lo menos el 50%, en peso, libre de proteínas, anticuerpos y moléculas orgánicas que se producen de manera natural con las que se asocia de manera natural. De manera deseable, el factor es por lo menos el 75%, de manera más deseable, por lo menos el 90%, y de la manera más deseable, por lo menos el 99%, en peso, puro. Un factor sustancialmente puro puede obtenerse mediante síntesis química, separación del factor de fuentes naturales, o producción del factor en una célula huésped recombinante que no produce el factor de manera natural. Un experto en la materia puede purificar proteínas, vesículas y orgánulos utilizando técnicas convencionales, tales como las descritas en Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nueva York, 2001). El factor es de manera deseable de por lo menos 2, 5 ó 10 veces tan puro como el material de partida, tal como se mide utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía en columna, densidad óptica, análisis por HPLC o análisis de tipo Western (Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nueva York, 2001). Los procedimientos deseables de purificación incluyen inmunoprecipitación, cromatografía en columna tal como cromatografía por inmovilización de afinidad y columnas de afinidad de níquel, purificación por inmovilización de afinidad en perlas magnéticas y adsorción con un anticuerpo unido a placa.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones siguientes.

#### 40 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La figura 1 es la secuencia de aminoácidos (SEC ID n°: 1) y la de ácido nucleico (SEC ID n°: 2) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano CM-1.

La figura 2 es la secuencia de aminoácidos (SEC ID n°: 3) y la de ácido nucleico (SEC ID n°: 4) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano CM-1.

45 Las figuras 3A-3C son una serie de inmunotinciones de un adenocarcinoma de ovario humano. La figura 3A representa la tinción con el anticuerpo de control positivo CAM 5.2. La figura 3B es un control negativo, y la figura 3C representa la tinción con el anticuerpo CM-1.

50 Las figuras 4A-4C son una serie de inmunotinciones de un adenocarcinoma de ovario humano. La figura 4A representa la tinción con el anticuerpo de control positivo CAM 5.2. La figura 4B es un control negativo, y la figura 4C representa la tinción con el anticuerpo CM-1.

Las figuras 5A-5C son una serie de inmunotinciones de un carcinoma lobulillar invasivo humano de mama femenina. Esta serie de imágenes representa una formación de satélite típica de las células tumorales. La figura 5A representa la tinción con el anticuerpo de control positivo CK 8. La figura 5B es un control negativo, y la figura 5C representa la tinción con el anticuerpo CM-1.

55 Las figuras 6A-6C son una serie de inmunotinciones de un carcinoma lobulillar invasivo humano de mama femenina. Esta serie de imágenes muestra la formación de satélite que rodea la diferenciación ductal del carcinoma. La figura 6A representa la tinción con el anticuerpo de control positivo CK 8. La figura 6B es un control negativo, y la

figura 6C representa la tinción con el anticuerpo CM-1.

Las figuras 7A-7C son una serie de inmunotinciones de un carcinoma de células escamosas humano del pulmón. La figura 7A representa la tinción con el anticuerpo de control positivo CK 5/6. La figura 7B es un control negativo, y la figura 7C representa la tinción con el anticuerpo CM-1.

5 La figura 8 es un gráfico de los resultados de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de muerte celular que representa que el anticuerpo monoclonal CM-1 induce la apoptosis de las células CACO-2.

10 La figura 9 es una serie de gráficos de los resultados de los ensayos de reducción con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) para detectar la actividad deshidrogenasa mitocondrial que muestra que el anticuerpo monoclonal CM-1 inhibe la proliferación celular y disminuye la supervivencia, o induce la apoptosis de células de carcinoma de colon COLO-206F tras 24 horas de incubación (figura 9A) y tras 48 horas de incubación (figura 9B).

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

15 La presente invención se refiere a polipéptidos, tales como anticuerpos, y su utilización en el tratamiento y diagnóstico de neoplasmas. Se ha caracterizado un anticuerpo monoclonal humano (CM-1) que reconoce específicamente varios carcinomas, incluyendo adenocarcinomas colorrectales, cáncer de ovario, carcinomas escamosos de pulmón, carcinomas lobulillares de mama, carcinomas de estómago, carcinomas escamosos de esófago, adenocarcinomas pancreáticos, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas ductales de mama, adenocarcinomas uterinos y adenocarcinomas de próstata. No sólo el anticuerpo monoclonal CM-1 reconoce estos neoplasmas, sino que, tras la unión a una célula, puede inducir la apoptosis de células neoplásicas, inhibir su proliferación, o incluso ambas. Por tanto, 20 el anticuerpo monoclonal CM-1, y otros anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que son específicos para el antígeno reconocido por CM-1, pueden utilizarse en una variedad de procedimientos para diagnosticar y tratar un neoplasma.

La línea celular que produce el anticuerpo monoclonal humano CM-1 se depositó el 5 de marzo de 2003 en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares ("DSMZ" - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania) bajo los términos del tratado de Budapest.

#### 25 Anticuerpos y polipéptidos

Los anticuerpos ejercen un papel esencial en el mantenimiento de la salud de un individuo. En particular, los anticuerpos están presentes en el suero y se unen a y ayudan a eliminar diversos patógenos tales como bacterias, virus y toxinas. Los anticuerpos están constituidos por estructuras proteicas en forma de Y construidas a partir de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena presenta una construcción modular: cada cadena ligera está constituida por dos dominios, y cada cadena pesada presenta por lo menos cuatro dominios. El sitio de unión a antígenos está formado por un dominio de la cadena pesada (dominio  $V_H$ ) y un dominio de la cadena ligera (dominio  $V_L$ ). De hecho, los fragmentos de unión a antígenos pequeños pueden prepararse uniendo estos dos dominios, asociados o bien de manera no covalente o bien de manera covalente mediante enlaces disulfuro o un conector peptídico. Los dominios de unión a antígeno son más variables en la secuencia de aminoácidos que los otros dominios del anticuerpo, y por tanto se denominan dominios variables (V), a diferencia de los dominios constantes (C). Los dominios constantes del anticuerpo son responsables de desencadenar los mecanismos efectores del anticuerpo, tales como lisis del complemento y destrucción mediada por células.

40 Los anticuerpos se producen por los linfocitos B en un proceso que implica la reordenación génica. Durante el desarrollo de estas células, los genes que codifican para los dominios variables se ensamblan a partir de elementos genéticos. En el caso de los dominios  $V_H$  existen tres elementos, el gen  $V_H$  no reordenado, el segmento D y el segmento  $J_H$ . En el caso de los dominios  $V_L$ , existen dos elementos, el gen  $V_L$  ( $V_Lambda$  o  $V_Kappa$ ) no reordenado y el segmento  $J_L$  ( $J_Lambda$  o  $J_Kappa$ ). La combinación aleatoria de estos segmentos genéticos y la combinación aleatoria de los dominios  $V_H$  y  $V_L$  reordenados generan un gran repertorio de anticuerpos, que pueden unirse a una gran diversidad de antígenos igualmente diversos.

45 En general, el anticuerpo descrito en la actualidad es cualquier agente que se une a una cualquiera de HT-29, CACO-2, COLO-320, COLO-206F o COLO-678, pero no se une a las células que no son neoplásicas. El polipéptido puede ser un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal humano (por ejemplo, CM-1), o un fragmento funcional del mismo. En general, el polipéptido puede unirse exclusivamente tanto a tejidos neoplásicos como a células neoplásicas, pero no a células o tejidos que no son neoplásicos. El polipéptido también puede inducir la apoptosis de una célula neoplásica a la que se une, pero no en una célula que no es neoplásica, o, alternativamente, el polipéptido puede inhibir la proliferación de la célula neoplásica a la que se une, pero no en una célula que no es neoplásica. De manera deseable, el polipéptido puede inducir simultáneamente la apoptosis e inhibir la proliferación de células neoplásicas, pero no de células que no son neoplásicas. Un polipéptido de este tipo es, por tanto, útil para la detección, monitorización, prevención y el tratamiento de cánceres en mamíferos. Cánceres a modo de ejemplo que pueden 50 tratarse con los procedimientos de la presente invención incluyen cáncer colorrectal, carcinoma de ovario, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinomas ductales y lobulillares de mama, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, tal como adenocarcinomas de pulmón, cáncer gástrico, cáncer pancreático, tal como adenocarcinomas

5 pancreáticos, glioma, sarcomas, cáncer gastrointestinal, tumor cerebral, cáncer de esófago, tal como carcinomas escamosos de esófago, cáncer de estómago, osteosarcoma, fibrosarcomas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata, tal como adenocarcinomas de próstata, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, adenocarcinomas uterinos, enfermedad de Hodgkin, linfomas y leucemias. El polipéptido es particularmente útil para la detección de un carcinoma lobulillar de mama, carcinoma de ovario, carcinoma de células escamosas de pulmón, carcinoma de estómago, carcinoma de células escamosas de esófago, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma ductal de mama, adenocarcinoma uterino y adenocarcinoma de próstata.

#### Producción

10 El polipéptido según puede producirse mediante cualquier procedimiento conocido en la materia para la producción a pequeña escala, gran escala o comercial de polipéptidos. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales, tales como CM-1, mediante líneas celulares de hibridoma. Tales líneas celulares se generan normalmente mediante la fusión de linfocitos de bazo y ganglio linfático derivados de pacientes que presentan un neoplasma, tal como carcinoma de colon, con una línea celular de heteromioma. Las líneas celulares de heteromioma a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, HAB-1 (Vollmers *et al.*, Cancer 74:1525-1532, 1994), CB-F7 (Delvig *et al.*, Hum. Antibodies Hybridomas 6:42-46, 1995), K6H6B5 (Delvig *et al.*, Hum. Antibodies Hybridomas 6:42-46, 1995), H7NS.934 (Delvig *et al.*, Hum. Antibodies Hybridomas 6:42-46, 1995), SHM-D33 (Bron *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3214-3217, 1984) y B6B11 (Borisova *et al.*, Vopr. Virusol. 44:172-174, 1999). La capacidad para generar anticuerpos monoclonales humanos a partir de linfocitos de pacientes con cáncer permite el aislamiento de anticuerpos que se generan mediante una respuesta inmunitaria al tumor en el paciente con cáncer.

25 Normalmente, las partes de los ganglios linfáticos y el bazo se extirpan quirúrgicamente de un paciente que presenta cáncer, tal como carcinoma de colon. Los linfocitos pueden prepararse como suspensiones celulares mediante medios mecánicos y posteriormente fusionarse a, por ejemplo, una razón de 1:2 ó 1:3 con una línea celular de heteromioma en condiciones que dan como resultado la fusión celular. Por ejemplo, puede utilizarse para este fin la célula de la línea de heteromioma HAB-1, que se genera mediante la fusión de un linfocito humano con el mieloma de ratón NS-0. Una proporción de linfocitos aislados del paciente con cáncer también puede mantenerse en cultivo. Estas células actúan como una fuente de células autólogas humanas útiles para la selección inicial de anticuerpos descrita a continuación.

30 Tras la fusión de los linfocitos derivados del paciente con cáncer con la línea celular de heteromioma, se genera un hibridoma o trioma que produce anticuerpos. Una vez construidos, los hibridomas son generalmente estables en el crecimiento y la producción de anticuerpos en cultivos convencionales y en masa (matraces, miniPerm, fermentadores, etc.) durante varios meses. Los niveles de producción de anticuerpos están normalmente comprendidos entre 0,01-0,1 mg/ml en matraces y entre 0,1-0,5 mg/ml en miniPerm. La fusión celular puede lograrse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, e incluye, por ejemplo, la utilización de polietilenglicol al 40%. Los hibridomas pueden cultivarse en medios que contienen HAT (hipovantina-aminopterina-timidina) y tras cuatro semanas, los sobrenadantes pueden examinarse para detectar la producción de anticuerpos utilizando un ensayo de ELISA. Los clones positivos entonces pueden someterse a prueba en ensayos de inhibición de la unión y de unión utilizando líneas celulares autólogas tal como se prepararon anteriormente. Los clones positivos además pueden someterse a prueba adicionalmente utilizando tinción con inmunoperoxidasa de tejidos tumorales y normales. Por tanto, los clones pueden seleccionarse basándose en su reactividad con células neoplásicas autólogas y alogénicas. El anticuerpo puede purificarse a partir de cultivos en masa con la utilización de cromatografía de intercambio de cationes seguido por filtración en gel tal como se describe, por ejemplo, en Vollmers *et al.*, (Oncology Reports 5: 35-40, 1998). Tras la producción de anticuerpos, pueden realizarse pruebas funcionales e inmunohistoquímicas adicionales de los anticuerpos producidos por el trioma. Por ejemplo, los anticuerpos producidos por el hibridoma pueden someterse a prueba para determinar su capacidad para inducir la apoptosis, inhibir la proliferación celular, o ambas, en relación con células control no tratadas. Los anticuerpos también pueden someterse a prueba para determinar su capacidad para unirse específicamente a las líneas celulares neoplásicas HT-29, CACO-2, COLO-320, COLO-206F o COLO-678, en relación con las células que no son neoplásicas.

50 Alternativamente, el polipéptido, incluyendo un anticuerpo, o un fragmento del mismo, puede producirse mediante la expresión del polipéptido o anticuerpo en una célula huésped tal como *E. coli* o levadura, por ejemplo, *S. cerevisiae*. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede identificarse tal como sigue. Una secuencia de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo, o un fragmento del mismo, puede insertarse en un bacteriófago filamentoso para generar bibliotecas de aproximadamente  $10^7$  o más anticuerpos. Cada fago expresa un anticuerpo en su superficie que está codificado por el ácido nucleico que contiene. Los anticuerpos de la invención, por tanto, pueden seleccionarse y detectarse mediante ensayos funcionales e histoquímicos tal como se describe en la presente memoria, y tales genes pueden seleccionarse posteriormente y expresarse en *E.coli*. Este sistema se describe, por ejemplo, en la patente US nº 5.876.691.

60 Los anticuerpos, o fragmentos funcionales de los mismos, también pueden generarse utilizando, por ejemplo, síntesis directa utilizando procedimientos recombinantes. Estos procedimientos son convencionales en la técnica. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico puede amplificarse utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. La técnica de la PCR se conoce en la materia y se describe, por ejemplo en la patente US nº 4.683.195. Utilizando

procedimientos convencionales, y tal como se describe en la presente memoria, puede obtenerse la secuencia de un anticuerpo monoclonal expresado por un hibridoma y pueden amplificarse los fragmentos funcionales del anticuerpo. Por ejemplo, el ARN completo puede aislarse de un hibridoma que expresa un anticuerpo monoclonal específico de tumor. Entonces, el ADNc puede generarse a partir del ARN utilizando transcriptasa inversa y pueden amplificarse los ADNc que contienen los fragmentos funcionales de las regiones variables de la cadena pesada y ligera utilizando PCR. Entonces, los productos de PCR pueden purificarse y clonarse en vectores de expresión. Están disponibles muchos vectores convencionales y la selección del vector apropiado dependerá de, por ejemplo, el tamaño del ADN insertado en el vector y la célula huésped que va a transformarse con el vector.

#### *Aislamiento de variantes de aminoácidos de un polipéptido*

Pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo CM-1, introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN que codifica para el anticuerpo, o mediante síntesis *in vitro* del polipéptido deseado. Tales variantes incluyen, por ejemplo, deleciones de, o inserciones o sustituciones de, residuos dentro de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo CM-1. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución puede realizarse para llegar al constructo final, siempre que el constructo final presente las características deseadas, por ejemplo, la capacidad para inducir la apoptosis de una célula neoplásica, pero no de una célula que no es neoplásica o la capacidad para inhibir la proliferación de una célula neoplásica, pero no de una célula que no es neoplásica. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar procesos postraduccionales de un anticuerpo, tal como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación, la alteración de las características de anclaje de la membrana o la modificación de su sensibilidad a la escisión proteolítica.

En el diseño de las variantes de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, tal como un anticuerpo, la ubicación del sitio de mutación y la naturaleza de la mutación dependerá de la(s) característica(s) que va(n) a modificarse. Los sitios para la mutación pueden modificarse de manera individual o en serie, por ejemplo, (1) sustituyendo en primer lugar con elecciones de aminoácidos conservativos, y a continuación con selecciones más radicales dependiendo de los resultados logrados, o (2) deleccionando el residuo diana.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones específicos para la mutagénesis en un polipéptido se denomina "mutagénesis por exploración de alanina" y se describe, por ejemplo, por Cunningham y Wells (Science 244: 081-1085, 1989). En este caso, se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (de la manera más deseable alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el entorno acuoso circundante en o fuera de la célula. Entonces se perfeccionan estos dominios que demuestran sensibilidad funcional frente a las sustituciones introduciendo variantes adicionales o distintas en o para los sitios de sustitución. Por tanto, mientras que se predetermina el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos, no es necesario predeterminar la naturaleza de la mutación. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, puede llevarse a cabo mutagénesis por exploración de alanina o al azar en el codón o la región diana y se seleccionan las variantes expresadas, por ejemplo, para detectar la capacidad para inducir la apoptosis de una célula neoplásica y no de una célula que no es neoplásica, o para inhibir la proliferación de una célula neoplásica y no de una célula que no es neoplásica.

Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen los sitios identificados como que afectan a la actividad biológica de un polipéptido. Estos sitios, especialmente los que se introducen en una secuencia de por lo menos otros tres sitios conservados de manera idéntica, pueden sustituirse de una manera relativamente conservativa. Por ejemplo, ala puede sustituirse por val, leu o ile; arg puede sustituirse por lys, gln o asn; asn puede sustituirse por gln, his, lys o arg; asp puede sustituirse por glu; cys puede sustituirse por ser; gln puede sustituirse por asn; glu puede sustituirse por asp; gly puede sustituirse por pro; his puede sustituirse por asn, gln, lys o arg; ile puede sustituirse por leu, val, met, ala o phe; leu puede sustituirse por ile, val, met, ala o phe; lys puede sustituirse por arg, gln o asn; met puede sustituirse por leu, phe o ile; phe puede sustituirse por leu, val, ile o ala; pro puede sustituirse por gly; ser puede sustituirse por thr; thr puede sustituirse por ser; trp puede sustituirse por tyr; tyr puede sustituirse por trp, phe, thr o ser; y val puede sustituirse por ile, leu, met o phe.

#### *Conjugación del anticuerpo con un agente detectable*

Si se desea, el anticuerpo reivindicado (por ejemplo, anticuerpo monoclonal, tal como CM-1), o un fragmento del mismo, pueden unirse a un agente detectable para facilitar la purificación del polipéptido así como el diagnóstico, la monitorización o el tratamiento del cáncer en un mamífero que lo necesita. La selección de un agente detectable adecuado dependerá de la utilización destinada del polipéptido y será evidente para los expertos en la materia. Los agentes detectables según la invención reivindicada incluyen, por ejemplo, etiquetas de purificación de proteína, citotoxinas, enzimas, marcadores paramagnéticos, sustratos enzimáticos, cofactores, inhibidores enzimáticos, colorantes, radionúclidos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores fluorescentes, inhibidores del crecimiento y biotina.

Una etiqueta de purificación de proteína puede conjugarse con el polipéptido descrito, para facilitar el aislamiento del polipéptido. Los ejemplos de etiquetas que pueden utilizarse incluyen colas de His, etiquetas de HA, etiquetas FLAG<sup>®</sup> y etiquetas de c-Myc. Un sitio de escisión enzimática o química puede modificarse por ingeniería

genética entre el polipéptido y el resto de la etiqueta de manera que la etiqueta pueda retirarse tras la purificación. Las toxinas adecuadas incluyen toxina diftérica, exotoxina A de *Pseudomonas*, ricina y toxina colérica. Los ejemplos de marcadores enzimáticos adecuados incluyen malato hidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa, alfa-glicerol fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Los ejemplos de marcadores radioisotópicos adecuados incluyen  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  y  $^{14}\text{C}$ . Preferentemente, el radioisótopo emitirá en el intervalo de 10-5.000 kev, más preferentemente 100-500 kev. Los isótopos paramagnéticos también pueden conjugarse con el polipéptido y utilizarse *in vivo* para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. La utilización de tales anticuerpos conjugados puede ser para la obtención de imágenes mediante resonancia magnética nuclear *in vivo*. Se ha descrito previamente un procedimiento de este tipo (véanse, por ejemplo, Schaefer *et al.*, JACC 14:472-480, 1989; Shreve *et al.*, Magn. Reson. Med. 3:336-340, 1986; Wolf, Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16:93-95, 1984; Wesbey *et al.*, Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16:145-155, 1984; y Runge *et al.*, Invest. Radiol. 19:408-415, 1984). Alternativamente, el anticuerpo radiomarcado también puede utilizarse en la cirugía radioinmunoguiada (RIGS), que implica la extirpación quirúrgica de cualquier tejido al que se une el anticuerpo marcado. Por tanto, el anticuerpo marcado guía al cirujano hacia el tejido neoplásico distinguiéndolo del tejido que no es neoplásico. Los radiomarcadores útiles para la obtención de imágenes de tumores son preferentemente radioisótopos de vida corta. Diversos metales radioactivos con semividas comprendidas entre 1 hora y 11,4 días están disponibles para la conjugación con anticuerpos, tales como escandio-47 (3,4 días), galio-67 (2,8 días), galio-68 (68 minutos), tecnecio-99m (6 horas), indio-111 (3,2 días) y radio-223 (11,4 días), de los que galio-67, tecnecio-99m e indio-111 resultan preferidos para la obtención de imágenes en cámara gamma, el galio-68 resulta preferido para la tomografía de emisión de positrones, y el escandio-47 y radio-223 (y otros radionúclidos que emiten rayos alfa) son preferibles para la terapia tumoral.

Los ejemplos de marcadores fluorescentes adecuados incluyen fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, oftaldehído y fluorescamina. Los ejemplos de marcadores quimioluminiscentes incluyen un marcador de luminal, marcador de isoluminal, marcador de éster de acridinio aromático, marcador de imidazol, marcador de sal de acridinio, marcador de éster de oxalato, marcador de luciferina, marcador de luciferasa y marcador de aecurina. Los expertos habituales en la materia conocerían otros marcadores adecuados, que pueden emplearse según la presente invención. La conjugación de estos agentes detectables con los polipéptidos reivindicados tales como anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, puede llevarse a cabo utilizando técnicas convencionales conocidas comúnmente en la técnica. Las técnicas de conjugación de anticuerpos típicas se describen en Kennedy *et al.* (Clin. Chim. Acta 70, 1-31, 1976) y Schurs *et al.* (Clin. Chim. Acta 81, 1-40, 1977) e incluyen, por ejemplo, el procedimiento con glutaraldehído, el procedimiento con peryodato, el procedimiento con dimaleimida, el procedimiento con éster de m-maleimidobencil-N-hidroxi-succinimida. Los anticuerpos pueden radiomarcarse mediante cualquiera de entre varias técnicas conocidas en la materia, descritas, por ejemplo, en la patente US nº 4.444.744.

En todos los aspectos de la presente invención, debe apreciarse que pueden utilizarse mezclas de diferentes o los mismos polipéptidos marcados específicos para diferentes antígenos o diferentes epitopos del mismo antígeno asociados con el mismo o diferente tumor o diferentes tipos de células tumorales. Una combinación de este tipo puede potenciar la detección, localización y/o la terapia en determinados casos, y también puede aumentar el intervalo de un amplio espectro para más de un neoplasma o tipo de neoplasma.

#### Polipéptidos conjugados con agentes antitumorales

Aunque el polipéptido de la invención puede inducir la apoptosis de células neoplásicas, inhibir la proliferación celular de células neoplásicas, o ambas, el polipéptido puede conjugarse, además, con un agente que destruye células neoplásicas o que inhibe su proliferación. La capacidad de direccionamiento del polipéptido, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, da lugar a la administración para administrar el agente citotóxico o antiproliferativo al tumor para potenciar la destrucción del tumor. Por tanto, el polipéptido puede utilizarse para el tratamiento y la prevención del cáncer en un mamífero, tal como un paciente humano. El agente citotóxico unido al polipéptido puede ser cualquier agente que destruye o daña una célula tumoral o tumor al que se ha unido el polipéptido. Los ejemplos de tales agentes incluyen agentes quimioterápicos o radioisótopos, enzimas que activan un profármaco o una citocina.

Resultan conocidos para los expertos en la materia los agentes quimioterápicos adecuados e incluyen, por ejemplo, taxol, mitramicina, desoxicoformicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, interferones (especialmente IFN-alfa), etopósido, tenipósido, antraciclinas (por ejemplo, daunomicina y doxorubicina), metotrexato, vindesina, neocarzinostatina, cisplatino, clorambucilo, arabinósido de citosina, 5-fluorouridina, melfalán, ricina y caliqueamicina. Los agentes quimioterápicos pueden conjugarse con el anticuerpo utilizando procedimientos convencionales conocidos en la materia.

Resultan asimismo conocidos para los expertos en la materia los radioisótopos adecuados para su utilización como agentes citotóxicos, y éstos incluyen, por ejemplo,  $^{131}\text{I}$ , o una astatina tal como  $^{211}\text{At}$ . Estos isótopos pueden unirse al polipéptido, o bien de manera covalente o bien de manera no covalente, utilizando técnicas convencionales en la materia.

Alternativamente, el agente citotóxico también puede ser una enzima, que activa un profármaco. Esto permite la conversión de un profármaco inactivo en su forma citotóxica, activa en el sitio tumoral y se denomina "terapia con

profármacos de enzimas dirigidas a anticuerpos" (ADEPT). Por tanto, el conjugado polipéptido-enzima puede administrarse al paciente y permitir que se ubique en la región del tumor que va a tratarse. Entonces, se administra el profármaco al paciente de manera que la conversión al fármaco citotóxico se ubica en la región del tumor que va a tratarse bajo la influencia de la enzima localizada. Una enzima ejemplificativa es la carboxipeptidasa bacteriana G2 (CPG2) cuya utilización se describe en, por ejemplo, el documento WO 88/07378. El conjugado polipéptido-enzima puede, si se desea, modificarse según la enseñanza del documento WO 89/00427, tal como para acelerar su aclaramiento de zonas del organismo que no están en las proximidades de un neoplasma. El conjugado polipéptido-enzima también puede utilizarse según el documento WO 89/00427, por ejemplo, proporcionando un componente adicional, que inactiva la enzima en zonas del cuerpo que no están en las proximidades del tumor.

Como otra alternativa, el agente citotóxico conjugado con el polipéptido reivindicado también puede ser una citocina tal como interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), o factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa). El polipéptido dirige la citocina al tumor de modo que la citocina media el daño a o la destrucción del tumor sin afectar a otros tejidos. La citocina puede fusionarse con el polipéptido a nivel del ADN utilizando técnicas del ADN recombinante.

Además, cualquier inhibidor de la proliferación celular, por ejemplo, genistéina, tamoxifeno o ciclofosfamida, puede conjugarse con un polipéptido de la invención.

#### *Dosificación*

Con respecto a los procedimientos terapéuticos de la invención, no se pretende que la administración del anticuerpo reivindicado a un paciente se limite a un modo particular de administración, dosificación o frecuencia de dosificación; la presente invención comprende todos los modos de administración, incluyendo la vía intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intravesicular, intraarticular, intralesional, subcutánea, o cualquier otra vía suficiente para proporcionar una dosis adecuada para disminuir el número de células neoplásicas induciendo la apoptosis de células neoplásicas, inhibiendo la proliferación de células tumorales, o ambas. El/los compuesto(s) puede(n) administrarse al paciente en una dosis única o en múltiples dosis. Cuando se administran múltiples dosis, las dosis pueden estar separadas entre sí por, por ejemplo, un día, dos días, una semana, dos semanas o un mes. Por ejemplo, el polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, tal como CM-1) puede administrarse una vez por semana durante, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20 o más semanas. Debe apreciarse que, para cualquier sujeto particular, deben ajustarse los regímenes de dosificación específicos en el tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. La dosis precisa variará dependiendo del polipéptido utilizado, la densidad, en la superficie del tumor, del ligando al que se une el polipéptido, y la tasa de aclaramiento del polipéptido. Por ejemplo, la dosificación del anticuerpo CM-1 puede aumentarse si una dosis inferior no proporciona suficiente actividad antineoplásica. Por el contrario, la dosificación del anticuerpo CM-1 puede disminuirse si se elimina el neoplasma del paciente.

Aunque el médico encargado decidirá en última instancia la cantidad apropiada y el régimen de dosificación, una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido reivindicado, tal como un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, puede estar, por ejemplo, comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg a 50 mg/kg de peso corporal/día o de 0,70 mg a 350 mg/kg de peso corporal/semana. De manera deseable, una cantidad terapéuticamente eficaz está comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,50 mg a 20,0 mg/kg, y de manera más deseable en el intervalo de aproximadamente 0,50 mg a 15,0 mg/kg por ejemplo, aproximadamente 0,2, 0,3, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0, 8,0, 8,5, 9,0, 10,0, 11,0, 12,0, 13,0,14,0 ó 15,0 mg/kg de peso corporal administrado diariamente, en días alternos o dos veces por semana.

Por ejemplo, una dosis adecuada es una cantidad del polipéptido que, cuando se administra tal como se describió anteriormente, puede inducir apoptosis, y es de por lo menos el 20% por encima del nivel inicial (es decir, no tratado). En general, un régimen de tratamiento y dosificación apropiados proporcionan el/los compuesto(s) activo(s) en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico. Una respuesta de este tipo puede monitorizarse estableciendo un resultado clínico mejorado (por ejemplo, remisiones más frecuentes, completas o parciales, o supervivencia libre enfermedad durante más tiempo) en los pacientes tratados en comparación con los pacientes no tratados. Según esta invención, la administración del polipéptido puede inducir la apoptosis de células neoplásicas en por lo menos 20%, 40%, 50% o 75% por encima de la de un control no tratado tal como se mide mediante cualquier ensayo convencional conocido en la técnica. Más preferentemente, se induce apoptosis en el 80%, 90%, 95%, o incluso el 100% por encima de la de un control no tratado. Alternativamente, la administración del polipéptido puede inhibir la proliferación celular neoplásica en por lo menos 20%, 40%, 50% o 75% inferior de la de un control no tratado tal como se mide mediante cualquier ensayo convencional conocido en la técnica. De manera más deseable, la proliferación resulta inhibida en 80%, 90%, 95% o incluso 100% por debajo de la de un control no tratado. De la manera más deseable, el polipéptido puede inhibir simultáneamente la proliferación e inducir la apoptosis de células neoplásicas en relación con las células control no tratadas. Tales respuestas pueden monitorizarse mediante cualquier técnica convencional conocida en la materia. En general, para las composiciones farmacéuticas, la cantidad de anticuerpo presente en una dosis oscila desde aproximadamente 25 µg hasta 5 mg por kg de huésped. Los tamaños de dosis adecuados variarán con el tamaño del paciente, pero estarán normalmente comprendidas entre aproximadamente 0,1 ml y aproximadamente 5 ml.

#### *Formulación de composiciones farmacéuticas*

El polipéptido descrito puede administrarse mediante cualquier medio adecuado que da lugar a una concentración que presenta propiedades antineoplásicas al alcanzar la región diana. El polipéptido puede estar contenido en cualquier cantidad apropiada en cualquier sustancia portadora adecuada, y está generalmente presente en una cantidad del 1-95% en peso del peso total de la composición. La composición puede proporcionarse en una forma farmacéutica que es adecuada para la vía de administración parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal). Las composiciones farmacéuticas pueden formularse según la práctica farmacéutica convencional (véanse, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20ª ed.), ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York).

La composición farmacéutica puede administrarse por vía parenteral mediante inyección, infusión o implantación (subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o similares) en formas farmacéuticas, formulaciones, o mediante dispositivos de administración adecuados o implantes que contienen vehículos y adyuvantes farmacéuticamente aceptables no tóxicos, convencionales. Si las células neoplásicas están en contacto directo con la sangre (por ejemplo, leucemias), o si el tumor es sólo accesible mediante el torrente sanguíneo entonces puede utilizarse la vía intravenosa (i.v.). En casos en los que los tumores crecen en espacios confinados tales como la cavidad pleural o la cavidad peritoneal, el polipéptido puede administrarse directamente en la cavidad en lugar de en el torrente sanguíneo. Los expertos en la materia conocen bien la formulación y la preparación de tales composiciones de la formulación farmacéutica. Las formulaciones pueden encontrarse en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, citado anteriormente.

#### Diagnóstico y monitorización de la evolución del cáncer

Tal como se trató anteriormente, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar o diagnosticar un neoplasma en un mamífero, preferentemente un paciente humano. Normalmente, con los procedimientos de esta invención puede tratarse cualquier neoplasma en el que la administración del polipéptido descrito produzca una inducción en la apoptosis o una reducción en la proliferación.

Los polipéptidos descritos son particularmente útiles dado que son específicos para neoplasmas o células neoplásicas, pero no para células o tejido normales. Por lo tanto, este polipéptido puede unirse a las células neoplásicas dentro del tumor, pero no al tejido circundante normal, permitiendo así la detección, el tratamiento, o ambos, de un neoplasma en un mamífero. Por ejemplo, puede utilizarse dicho polipéptido para determinar si una biopsia extirpó el tumor completo verificando que ninguna célula unida por el polipéptido permanezca en el paciente o, verificando que el tumor extirpado del paciente esté completamente rodeado por células que no están unidas por el polipéptido.

Se entiende que para mejorar la sensibilidad de detección, pueden someterse a ensayo múltiples marcadores neoplásicos dentro de una muestra o individuo dados. Por tanto, los polipéptidos tales como anticuerpos o fragmentos funcionales específicos para diferentes antígenos pueden combinarse dentro de un ensayo individual o en múltiples ensayos. Además, pueden utilizarse simultáneamente múltiples cebadores o sondas específicos para neoplasmas. La selección de marcadores puede basarse en experimentos de rutina para determinar combinaciones, lo que da lugar a una sensibilidad óptima.

#### *Detección in vitro de un neoplasma*

En general, el diagnóstico de un neoplasma en un mamífero implica obtener una muestra biológica del mamífero (por ejemplo, paciente humano), poner en contacto tal muestra con el polipéptido de la invención (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, tal como CM-1), detectar en la muestra el nivel de reactividad o unión del polipéptido a las células neoplásicas en relación con una muestra control, que corresponde a células que no son neoplásicas derivadas de tejido sano del mamífero en el que se diagnostica cáncer o de otro paciente conocido que no presenta ningún neoplasma. Por tanto, los procedimientos de esta invención son particularmente útiles para la detección de tumores de estadio temprano o metástasis, que son de otro modo indetectables. Por lo tanto, además de diagnosticar un neoplasma en un paciente, los procedimientos de esta invención también pueden utilizarse para monitorizar la evolución de un neoplasma en un mamífero. Los polipéptidos descritos en la presente memoria por tanto pueden utilizarse como marcadores para la evolución de un neoplasma. Para este fin, los ensayos descritos a continuación, que se utilizan para el diagnóstico de un neoplasma, pueden realizarse en el tiempo, y evaluarse el cambio en el nivel de polipéptido(s) reactivo(s). Por ejemplo, los ensayos pueden realizarse cada 24-72 horas durante un periodo de 6 meses a 1 año, y después de esto realizarse según sea necesario. En general, un neoplasma evoluciona en aquellos pacientes en los que el nivel de polipéptido unido detectado aumenta con el tiempo. Por el contrario, el neoplasma no progresa cuando el nivel de polipéptido unido o bien permanece constante o bien disminuye con el tiempo. Alternativamente, tal como se observó anteriormente, el polipéptido descrito también puede utilizarse para determinar la presencia de células tumorales en el mamífero tras la resección del tumor mediante intervención quirúrgica para determinar si el tumor se ha extirpado completamente del mamífero.

De manera deseable, el polipéptido se une a un agente detectable, que facilita la detección, o medición de la reactividad del polipéptido. La muestra biológica es cualquier material biológico, que puede contener células neoplásicas e incluir, por ejemplo, sangre, saliva, tejido, suero, mucosidad, esputo, orina o lágrimas. La muestra biológica también puede ser una sección de tejido, que puede ser tejido fijado, el tejido recién extraído o tejidos congelados. Un neoplasma

se detecta o se diagnostica en el mamífero a partir del que se obtuvo la muestra si existe un aumento en el nivel de reactividad del anticuerpo con la muestra biológica con respecto a la muestra control. Tal aumento es por lo menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, o más del 50% con respecto a los niveles de control. El nivel de unión o reactividad puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica y se describe con mayor detalle a continuación.

## 5 *Ensayos de diagnóstico in vitro*

El diagnóstico de neoplasmas utilizando el polipéptido descrito puede realizarse mediante cualquier procedimiento conocido para el experto habitual en la materia para utilizar un agente de unión para detectar marcadores de polipéptido en una muestra. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Por ejemplo, el polipéptido puede utilizarse para el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunotransferencia de tipo Western o detección *in situ* de células tumorales en una muestra de tejido. Por ejemplo, el ensayo de ELISA implica normalmente la utilización del polipéptido, tal como un anticuerpo, inmovilizado en un soporte sólido para unir a las células tumorales en la muestra biológica. Entonces, puede detectarse célula tumoral unida utilizando un reactivo de detección que contiene un grupo indicador y que se une específicamente al complejo anticuerpo/célula tumoral. Tales reactivos de detección incluyen, por ejemplo, cualquier agente de unión que se une específicamente al anticuerpo, tal como una antiinmunoglobulina, proteína G, proteína A o una lectina. Alternativamente, puede utilizarse un ensayo competitivo, en el que el polipéptido es un anticuerpo y en el que los antígenos, para los que el anticuerpo es específico se marcan con un grupo indicador y se permite que se unan al anticuerpo inmovilizado tras la incubación del anticuerpo con la muestra biológica. El grado en el que los componentes de la muestra inhiben la unión de los antígenos marcados al anticuerpo es indicativo de la reactividad de la muestra con el anticuerpo inmovilizado. El diagnóstico de un neoplasma en un paciente también puede determinarse mediante un ensayo de tipo sándwich de dos anticuerpos. Este ensayo puede realizarse poniendo en contacto en primer lugar un anticuerpo que se ha inmovilizado en un soporte sólido, comúnmente el pocillo de una placa de microtitulación, con la muestra, de manera que se permite que los polipéptidos dentro de la muestra se unan al anticuerpo inmovilizado. Entonces se retira la muestra no unida de los complejos polipéptido-anticuerpo inmovilizados y se añade un reactivo de detección (preferentemente un segundo anticuerpo que puede unirse a un sitio diferente en el polipéptido) que contiene un grupo indicador. Entonces, se determina la cantidad del reactivo de detección que permanece unido al soporte sólido utilizando un procedimiento apropiado para el grupo indicador específico. Por ejemplo, para determinar la presencia o ausencia de un neoplasma, tal como adenocarcinoma colorrectal, la señal detectada del grupo indicador que permanece unido al soporte sólido se compara generalmente con una señal que corresponde a un valor de corte predeterminado. El valor de corte para la detección de un neoplasma es la señal media promedio obtenida cuando se incubaba el anticuerpo con muestras de pacientes sin un neoplasma.

El procedimiento utilizado para detectar el grupo indicador depende de la naturaleza del grupo indicador. Para grupos radioactivos, pueden utilizarse métodos autorradiográficos o de recuento de centello. Los métodos espectroscópicos pueden utilizarse para detectar colorantes, grupos luminiscentes y grupos fluorescentes. La biotina puede detectarse utilizando avidina, acoplada a un grupo indicador diferente (comúnmente un grupo radiactivo o fluorescente o una enzima). Los grupos indicadores enzimáticos pueden detectarse generalmente mediante la adición del sustrato (generalmente durante un periodo de tiempo específico), seguido por análisis espectroscópico u otro análisis de los productos de reacción.

El polipéptido descrito también puede emplearse de manera histológica para la detección o determinación cuantitativa *in situ* de células tumorales, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica. La detección o determinación *in situ* puede llevarse a cabo extirpando una muestra de tejido de un paciente y permitiendo que un anticuerpo marcado se una a cualquier célula tumoral en la muestra. La utilización de un procedimiento de este tipo no sólo permite la detección de células neoplásicas en una muestra, sino que también permite la determinación de su distribución espacial. Como otro ejemplo, la muestra biológica puede ser un frotis de material biológico que contiene células neoplásicas en un portaobjetos, y la detección de las células neoplásicas en el material biológico se logra examinando el frotis con un microscopio o mediante fluorocitometría.

### *Detección in vivo de un neoplasma*

Alternativamente, el anticuerpo de la invención puede utilizarse también *in vivo* para detectar y localizar un neoplasma. Un procedimiento de este tipo puede implicar inyectarle a un mamífero, de manera deseable un sujeto humano, por vía parenteral el polipéptido de la invención, tal como CM-1, que se ha marcado con un agente detectable, y se describe, por ejemplo, en la patente US nº 4.444.744. Por ejemplo, el polipéptido puede estar radiomarcado con un radioisótopo farmacológicamente inerte y administrarse al paciente. La actividad del radioisótopo puede detectarse en el mamífero utilizando un dispositivo fotoexploración, y un aumento en la actividad en relación con un control refleja la detección y la localización de un neoplasma.

## 55 Tratamiento

Además del diagnóstico y la monitorización de neoplasmas en mamíferos, se describen procedimientos para tratar neoplasmas en un mamífero, de manera deseable un paciente humano. El procedimiento implica generalmente la administración de una cantidad biológicamente eficaz del polipéptido descrito al paciente. El polipéptido se administra normalmente al mamífero mediante inyección utilizando cualquier vía de administración tal como mediante inyección

intratecal, subcutánea, submucosa o intracavitaria así como para inyección intravenosa o intraarterial. Por tanto, el polipéptido puede inyectarse de manera sistémica, por ejemplo, mediante la inyección intravenosa del polipéptido tal como el anticuerpo CM-1 en el torrente sanguíneo del paciente o, alternativamente, el polipéptido puede inyectarse directamente en el sitio del neoplasma o en una ubicación en proximidad a las células neoplásicas.

5 En general y tal como se trató anteriormente, la unión de dicho polipéptido a células neoplásicas da lugar a una inducción de la apoptosis, una reducción de la proliferación celular o ambas en relación con la muestra control. Alternativamente, los anticuerpos también pueden activar la ruta del complemento, que produce en última instancia que se perforan orificios en la membrana celular, dando como resultado muerte celular.

10 Si se desea, los polipéptidos también pueden conjugarse con fármacos o toxinas tal como se describió anteriormente. Una vez unido a la superficie celular, el conjugado puede internalizarse en el citoplasma celular en el que enzimas celulares escinden y, por tanto, activan o liberan los fármacos o toxinas del conjugado. Una vez liberados, los fármacos o las toxinas dañan la célula e inducen de manera irreversible muerte celular. Con respecto a los anticuerpos radiomarcados, la unión a células neoplásicas y la emisión de radiación resultante, a una distancia corta del ADN celular, produce daño a este último induciendo así muerte celular en la siguiente ronda de replicación. Por ejemplo, tras haberse  
15 detectado un neoplasma y localizado en un sujeto, se inyecta una dosis superior de anticuerpo marcado, generalmente de desde 25 hasta 250 mCi para <sup>131</sup>I, y preferentemente de desde 50 mCi hasta 150 mCi por dosis, basándose en el peso de un paciente de 70 kg. La inyección puede ser intravenosa, intraarterial, intralinfática, intratecal o intracavitaria, y puede repetirse más de una vez. Puede ser ventajoso para algunas terapias administrar múltiples dosis divididas de polipéptidos o mezclas de polipéptidos radiomarcados, por ejemplo, en el intervalo de 20-120 mCi (paciente de 70 kg),  
20 proporcionando así dosis de destrucción celular superiores al neoplasma sin efectuar habitualmente un aumento proporcional de la radiación de tejidos normales.

La terapia utilizando polipéptidos marcados se utiliza de manera ventajosa como tratamiento terapéutico primario, pero también puede utilizarse en combinación con otras terapias antineoplásicas, por ejemplo, radiación y quimioterapia, y como complemento de la cirugía. La administración de tales polipéptidos conjugados es particularmente  
25 útil en el caso en el que no puedan extirparse quirúrgicamente metástasis pequeñas.

#### *Combinación de un polipéptido con otras terapias antineoplásicas*

Pueden combinarse opcionalmente agentes quimioterápicos y/o radiación y/o extirpación quirúrgica del neoplasma con cualquiera de los procedimientos de la presente invención. Las clases de compuestos que pueden utilizarse como agente quimioterápico incluyen: agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales y sus  
30 derivados, hormonas y esteroides (incluyendo análogos sintéticos), y compuestos sintéticos. Los ejemplos de agentes alquilantes (por ejemplo, mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, alquilsulfonatos, nitrosoureas y triazenos) incluyen mostaza de uracilo, clometina, ciclofosfamida (Cytosan<sup>RTM</sup>), ifosfamida, melfalán, clorambucilo, pipobroman, trietilen-melamina, trietilentioposforamina, busulfano, carmustina, lomustina, estreptozocina, dacarbazina y temozolomida. Los antimetabolitos (incluyendo antagonistas de ácido fólico, análogos de piridina, análogos de purina e  
35 inhibidores de adenosina deaminasa) pueden incluir, por ejemplo, metotrexato, 5-fluorouracilo, floxuridina, citarabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, pentostatina y gemcitabina. También pueden utilizarse productos naturales y sus derivados (incluyendo alcaloides de la vinca, antibióticos antitumorales, enzimas, linfocinas y epipodofilotoxinas) e incluyen, por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, bleomicina, dactinomomicina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, paclitaxel (paclitaxel está comercialmente disponible como taxol), mitramicina, deoxicofornicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, interferones (especialmente IFN-alfa), etopósido y tenipósido. Las  
40 hormonas y esteroides (incluyendo análogos sintéticos) incluyen, por ejemplo, 17-alfa-etinilestradiol, dietilestilbestrol, testosterona, prednisona, fluoximesterona, propionato de dromostanolona, testolactona, acetato de megestrol, tamoxifeno, metilprednisolona, metiltestosterona, prednisolona, triamcinolona, clortrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutetimida, estramustina, acetato de medroxiprogesterona, leuprolida, flutamida, toremifeno o Zoladex. Los  
45 compuestos sintéticos a modo de ejemplo (incluyendo complejos inorgánicos tales como complejos de coordinación de platino) incluyen cisplatino, carboplatino, hidroxurea, amsacrina, procarbazona, mitotano, mitoxantrona, levamisol y hexametilmelamina.

Resultan conocidos por los expertos en la materia métodos y dosificaciones para la administración segura y eficaz de la mayoría de estos agentes quimioterápicos. Además, su administración se describe en la bibliografía  
50 convencional. Por ejemplo, la administración de muchos de los agentes quimioterápicos se describe en el "Physicians' Desk Reference" (PDR) (vademécum de especialidades farmacéuticas), por ejemplo, edición de 1996 (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA).

Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo de la invención.

#### **EJEMPLO 1**

##### 55 Materiales y métodos

###### *Producción de híbridomas*

Se immortalizaron linfocitos fusionándolos con el heteromioma HAB-1 tal como sigue.

5 Se lavaron las células de heteromioma HAB-1 dos veces con RPMI 1640 (PAA, Viena, Austria) sin aditivos y se centrifugaron las células durante 5 minutos a 1.500 rpm. Entonces, se descongelaron linfocitos congelados obtenidos de o bien el bazo o bien los ganglios linfáticos y se lavaron estas células dos veces con RPMI 1640 sin aditivos y se centrifugaron estas células a 1.500 rpm durante 5 minutos. Se resuspendieron tanto los sedimentos celulares de linfocitos como los de HAB-1 en 10 ml de RPMI 1640 sin aditivos y se contaron en una cámara de recuento celular de Neubauer. Se lavaron las células de nuevo, se añadieron las células HAB-1 y los linfocitos juntos en una razón de 1:2 a 1:3, se mezclaron, y se centrifugó la mezcla durante 8 minutos a 1.500 rpm. Se calentó previamente polietilenglicol 1500 (PEG) hasta 37°C y se dejó cuidadosamente que el PEG discurriese gota a gota sobre el sedimento mientras que se rotaba ligeramente el tubo de 50 ml. A continuación, se resuspendió suavemente el sedimento y se rotó el tubo durante exactamente 90 segundos en un baño de agua a 37°C. Se lavaron las células dos veces con una pipeta de 10 ml llena de RPMI sin aditivos y se centrifugaron las células durante 5 minutos a 1.500 rpm. Se añadió 1 ml de RPMI 1640 con complemento de HAT (PAA, Viena, Austria) y FCS al 10%, glutamina al 1% y penicilina/estreptomicina al 1% ("RPMI 1640 HAT") en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Se disolvió el sedimento celular en RPMI 1640 HAT y se añadieron 0,5 ml de las células a cada pocillo de la placa de 24 pocillos. Entonces, se colocaron las placas de 24 pocillos en un incubador a 37°C y se cambió el medio RPMI 1640 HAT cada semana.

10 Utilizando este protocolo, aproximadamente del 80% al 90% de los triomas generados son viables y aproximadamente 50% secretan inmunoglobulinas.

#### *Secuenciación del anticuerpo*

20 Para obtener la secuencia del anticuerpo, se aisló el ARN completo del trioma utilizando el kit RNASE de Qiagen y se usó este ARN para generar ADNc utilizando transcriptasa inversa de VLMM (Gibco). Tras generar el ADNc, se amplificaron los genes de la región variable utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Taq polimerasa (MBI-Fermentas). Se purificaron los productos de PCR utilizando electroforesis en gel mediante la extracción del gel del producto de PCR. Entonces, se clonaron los productos de PCR utilizando el kit de clonación pCR-Script Amp SK+ (Stratagene) y se secuenciaron los clones positivos utilizando el kit de secuenciación por ciclo de terminación DyeDeoxy (Applied BioSystems). Se analizaron las secuencias utilizando el programa de comparación de secuencias Dnasis para Windows, y las bases de datos GenBank y V-base tal como se describe en Vollmers *et al.* (Oncol. Rep. 5:35-40, 1998).

#### *Tinción inmunohistoquímica de secciones en parafina*

30 Se eliminó la parafina de la sección de tejido incubando las secciones de tejido en los siguientes lavados:  
 dos lavados con xileno durante 5 minutos cada uno,  
 dos lavados con etanol al 100% durante 5 minutos cada uno,  
 dos lavados con etanol al 90% durante 5 minutos cada uno,  
 dos lavados con etanol al 70% durante 5 minutos cada uno, y  
 tres lavados en H<sub>2</sub>O destilada.

35 Se incubaron los portaobjetos que contenían las secciones de tejido en 75 ml de H<sub>2</sub>O destilada y 25 ml de disolución de desenmascaramiento (Demaskierungslösung G, Biologo, Kronshagen, Alemania) en un baño de agua precalentado a 100°C durante 20 minutos. Se pusieron los portaobjetos en Tris/NaCl (3 gramos de Tris, 40,5 gramos de NaCl en 5 litros de H<sub>2</sub>O destilada y pH ajustado a 7,4 con HCl) durante 5 minutos, se bloquearon durante 30 minutos con 150 µl de fracción V de albúmina sérica bovina al 0,5% ("BSA"; Roth, Karlsruhe, Alemania) en solución salina tamponada con fosfato ("PBS") por portaobjeto, y se lavó una vez con Tris/NaCl.

40 Se incubaron los portaobjetos con el anticuerpo primario tal como sigue: se añadieron 150 µl de una disolución que contenía el anticuerpo primario, por ejemplo, CM-1 a 25 µg/ml en PBS/BSA al 0,5%, a cada portaobjeto de microscopio y se incubaron los portaobjetos durante 2,5 horas en una cámara humidificada a 37°C. Tras el periodo de incubación, se lavaron los portaobjetos tres veces con Tris/NaCl.

45 Se incubaron las secciones de tejido en el anticuerpo secundario tal como sigue. Se añadieron 150 µl de una disolución que contenía el anticuerpo secundario (700 µl de PBS + 300 µl de suero de conejo + por ejemplo 20 µl de anticuerpo de conejo anti-IgM humana; Dako, Hamburgo, Alemania) a cada portaobjeto de microscopio. Entonces, se incubaron los portaobjetos durante 45 minutos en una cámara humidificada a temperatura ambiente.

50 Tras el periodo de incubación, se lavaron los portaobjetos tres veces con Tris/NaCl y se colocaron en PBS durante 10 minutos. Entonces, se incubaron los portaobjetos durante 10 minutos con una disolución que contenía diaminobencidina al 0,05% y peróxido de hidrógeno al 0,02% (Sigma, Taufkirchen (Munich), Alemania). Se añadieron 150 µl de esta disolución a cada portaobjeto de microscopio. Tras este periodo de incubación, se lavaron los portaobjetos tres veces con H<sub>2</sub>O, una vez con H<sub>2</sub>O destilada y se pusieron en disolución de hematoxilina (Roth, Karlsruhe, Alemania) durante 5 minutos. Entonces, se enjuagaron los portaobjetos durante 10-15 min. Bajo agua de grifo

corriente, se lavaron con H<sub>2</sub>O destilada y se cubrieron con disolución de glicerol/gelatina precalentada.

5 Los anticuerpos de control utilizados en estos ensayos incluyen los siguientes anticuerpos: un anticuerpo monoclonal de ratón contra citoqueratina humana 8 ("CK 8"; Cymbus Biotechnology Ltd., Chandlers Ford, Hants, R.U.), véase también, Moll *et al.* (Cell 31: 11-24, 1982); un anticuerpo monoclonal de ratón contra citoqueratina humana 5/6 ("CK 5/6"; Dako A/S, Dinamarca); y un anticuerpo monoclonal de ratón contra citoqueratina humana ("CAM 5.2"; Becton Dickinson, Nueva Jersey).

#### Preparación del citocentrifugado

10 Se separaron las células en crecimiento adherentes añadiendo tripsina/EDTA (PAA, Viena, Austria) seguido por una incubación de 5 minutos en un incubador humidificado (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) y centrifugación durante 5 minutos a 1.500 rpm. Entonces, se lavaron las células dos veces con 10 ml de medio de cultivo celular RPMI-1640 (PAA, Viena, Austria). Se ajustó el número de células a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/ml. A partir de esta disolución, se centrifugaron 100 µl sobre portaobjetos de microscopio con una centrifuga para citocentrifugados (CYTOSPIN 2, Shandon, R.U.) durante 2 minutos a 50 rpm. Se secaron los citocentrifugados resultantes durante por lo menos 2 horas y se tiñeron tal como se especifica a continuación.

15 *Tinción con inmunoperoxidasa de citocentrifugados y criosecciones*

20 Se secaron los citocentrifugados durante por lo menos dos horas a temperatura ambiente o se secaron las criosecciones durante por lo menos dos horas tras cortarse. Entonces se fijaron las secciones o citocentrifugados durante 10 minutos en acetona. Se secaron las criosecciones/citocentrifugados fijados durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con Tris-NaCl (3 gramos de Tris, 40,5 gramos de NaCl en 5 litros de H<sub>2</sub>O destilada y pH ajustado a 7,4 con HCl), y se pusieron en Tris/NaCl durante 5 minutos. Se bloquearon las criosecciones/citocentrifugados durante 15-30 minutos con leche en polvo al 3% en PBS (100 µl por criosección/citocentrifugado) y se lavaron tres veces con Tris-NaCl. Se incubaron las criosecciones/citocentrifugados en 100 µl de anticuerpo primario por criosección/citocentrifugado (por ejemplo, CM-1 a 20 µg/ml en PBS/BSA al 0,5%; CK 8 a 1:50 en BSA/PBS; CAM 5.2 a 1:10 en BSA/PBS; o medios RPMI 1640 (PAA, Viena, Austria) como control negativo) durante 30 minutos en una cámara humidificada a temperatura ambiente. Tras la incubación, se lavaron las criosecciones/citocentrifugados tres veces con Tris-NaCl.

25 Entonces, se incubaron las criosecciones/citocentrifugados en 100 µl de una disolución que contenía el anticuerpo secundario (PBS al 70 % + suero humano o de conejo al 30% + por ejemplo anticuerpo de conejo anti-ratón 1:50, acoplado a peroxidasa o anticuerpo de conejo anti-IgM humana 1:50, acoplado a peroxidasa; Dako, Hamburgo, Alemania) por criosección/citocentrifugado durante 30 minutos en una cámara humidificada a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con Tris-NaCl y se pusieron en PBS durante 10 minutos. Entonces se incubaron las criosecciones/citocentrifugados durante 10 minutos en 100 µl de una disolución que contenía diaminobencidina al 0,05% y peróxido de hidrógeno al 0,02% (Sigma, Taufkirchen (Munich), Alemania). Tras la incubación, se lavaron las criosecciones/citocentrifugados con H<sub>2</sub>O destilada y se pusieron en una disolución de tinción con hematoxilina (Roth, Karlsruhe, Alemania) durante 5 minutos. Entonces, se enjuagaron las criosecciones/citocentrifugados durante 15 minutos bajo agua de grifo corriente, se lavaron con H<sub>2</sub>O destilada y se cubrieron con disolución de glicerol-gelatina precalentada.

Se llevaron a cabo los experimentos siguientes utilizando los materiales y métodos anteriores.

### **EJEMPLO 2**

40 Generación de la línea celular que expresa el anticuerpo monoclonal CM-1

45 Tal como se describió anteriormente, se obtuvo el hibridoma que expresaba el anticuerpo monoclonal CM-1 fusionando linfocitos obtenidos del bazo de un paciente que presenta un adenocarcinoma colorrectal moderadamente diferenciado (estadio tumoral T2NOMx, grado 2) con la línea celular de heteromieloma HAB-1 (Faller, *et al.*, Br. J. Cancer 62:595-598, 1990). La célula resultante es un tipo de hibridoma conocido como trioma, ya que es la fusión de tres células. Al igual que los linfocitos B normales, este trioma presenta la capacidad para producir anticuerpos. La especificidad del anticuerpo se determina mediante la especificidad del linfocito original procedente del paciente que se usó para generar el trioma.

50 En la figura 1 se representan las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de la región V<sub>H</sub> del anticuerpo monoclonal CM-1 como SEC ID n°: 1 y SEC ID n°: 2, respectivamente, y en la figura 2 se muestran las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de la región V<sub>L</sub> de CM-1 como SEC ID n°: 3 y SEC ID n°: 4, respectivamente. Además, se compararon las secuencias de las cadenas de inmunoglobulina con secuencias de línea germinal en la base de datos International Immunogenetics ("IMGT"), que coordina Marie-Paule Lefranc en la Université de Montpellier, Montpellier, Francia. Se usó el programa de alineación de secuencias DNAPLOT (disponible en <http://www.dnaplot.org>) para identificar los genes de línea germinal más homólogos y para detectar mutaciones somáticas. La secuencia de V<sub>H</sub> de CM-1 es homóloga al gen de línea germinal IGHV3-30/3-30.5\*01 (IMGT n.º X92214; Medline n.º 88283641; Berman *et al.*, EMBO J. 7:727-738, 1988) y la región I<sub>H</sub> del gen de línea germinal IGHJ5\*01. La secuencia V<sub>L</sub> de CM-1 es homóloga

al gen de línea germinal IGLV3-25\*03 (IMGT-n.º L29165; Medline n.º 94216813; Fang *et al.*, J. Exp. Med. 179:1445-1456, 1994) y la región I<sub>L</sub> del gen de línea germinal IGLJ3\*01.

### EJEMPLO 3

#### Caracterización inmunohistoquímica de un anticuerpo

5 Para caracterizar el anticuerpo monoclonal secretado por un hibridoma, se sometió a prueba frente a un panel de tejidos normales y tumorales utilizando un ensayo con inmunoperoxidasa tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Este ensayo proporcionó una visión general de qué tejidos se tiñeron con el anticuerpo y de la distribución del antígeno.

10 Se caracterizaron adicionalmente anticuerpos que son específicos para células tumorales y no para tejido normal. En primer lugar, se sometieron a prueba estos anticuerpos frente a los mismos tipos de tumores de diferentes pacientes. Entonces, se sometieron a prueba estos anticuerpos frente a tumores de otros órganos y, finalmente, frente a tejidos normales. Utilizando estos ensayos, se identificó el anticuerpo monoclonal humano CM-1.

15 El anticuerpo monoclonal CM-1 tiñe específicamente células neoplásicas, tales como células de carcinoma colorrectal. Se tiñeron muestras de tejido obtenidas de 21 tumores colorrectales diferentes con el anticuerpo monoclonal CM-1. 10 de estos tumores (47,6%) procedían de pacientes femeninos y 11 (52,4%) procedían de pacientes masculinos. De las 21 preparaciones de tejido, 20 eran adenocarcinomas, de los que 2 también contenían células en anillo de sello. Además, uno de los tumores era de manera histológica un carcinoma de células escamosas, y tres carcinomas estaban ubicados en el ciego, dos en el colon sigmoideo, cinco en el recto y once en otras partes del colon. Los resultados de la tinción se proporcionan en la tabla 1, a continuación.

20 Tabla 1:

Anticuerpo	Teñidos	Resultado negativo	Positivo débil	Positivo fuerte	Porcentaje de teñidos
CM-1	21	2	11	8	90,5

25 Además, se determinó que el anticuerpo CM-1 tiñe específicamente los adenocarcinomas de ovario (figura 3A-3C y figura 4A-4C), carcinomas lobulillares de mama invasivos (figura 5A-5C y figura 6A-6C) y carcinomas de células escamosas del pulmón (figura 7A-7C). Además, se determinó que el anticuerpo CM-1 también tiñe específicamente células de carcinoma de estómago, carcinoma de células escamosas de esófago, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma ductal de mama, adenocarcinoma uterino y adenocarcinoma de próstata.

30 Además, el anticuerpo monoclonal CM-1 también tiñe específicamente varias líneas celulares de carcinoma colorrectal y de colon. En particular, el anticuerpo CM-1 se une a células de la línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29 (n.º de registro de la American Type Culture Collection ("ATCC") HTB-38, n.º de registro de la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures ("DSMZ") ACC 299), la línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano CACO-2 (n.º de registro de la ATCC HBT-37, n.º de registro de la DSMZ ACC 169), la línea celular de carcinoma de colon humano COLO-320 (n.º de registro de la DSMZ n.º ACC 144), la línea celular de carcinoma de colon humano COLO-206F (n.º de registro de la DSMZ ACC 21), y la línea celular de carcinoma de colon humano COLO-678 (n.º de registro de la DSMZ 194). Se tiñeron portaobjetos de estas células según el protocolo de citocentrifugado descrito en la sección de materiales y métodos.

### EJEMPLO 4

#### Determinación de si un anticuerpo induce apoptosis

40 Pueden utilizarse varios ensayos convencionales en la materia para determinar si un anticuerpo induce la apoptosis de una célula.

45 Por ejemplo, se usó CELL DEATH DETECTION ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche, Mannheim, Alemania) para analizar el grado en el que el anticuerpo CM-1 induce apoptosis. El ELISA de detección de muerte celular se basa en un principio de inmunoensayo enzimático de tipo sándwich cuantitativo utilizando anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra ADN e histonas, respectivamente. Este ensayo permite la determinación específica de mono y oligonucleosomas que se liberan en el citoplasma de células que mueren por apoptosis.

En particular, se utilizaron 100 µl de una suspensión celular (1,0 x 10<sup>5</sup>/ml) para cada línea celular y se diluyó esto uno a uno con 100 µl del sobrenadante que contenía el anticuerpo monoclonal en una placa de 96 pocillos y se incubó la placa a 37°C y en 7% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Tras el periodo de incubación, se centrifugaron las células a

200 g durante 10 minutos, se aspiró el sobrenadante y se añadieron 200  $\mu$ l del tampón de lisis, lo que dio como resultado la lisis de las células tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Tras centrifugar de nuevo, se añadieron 20  $\mu$ l del sobrenadante a placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina y se añadieron 80  $\mu$ l del inmunorreactivo (anticuerpo anti-ADN-peroxidasa (anti-ADN-POD) 1/20 que reacciona con los componentes de ADN de los nucleosomas, biotina anti-histona 1/20, tampón de incubación 18/20). Además, se usó el control positivo y el blanco incluido en el kit de prueba del fabricante. Tras incubarse las placas durante 2 horas mientras que se mezclaban a aproximadamente 250 rpm, se lavó cada pocillo tres veces con 250  $\mu$ l de tampón de incubación. Entonces, se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ l de la disolución ABTS™ (1 comprimido de ABTS™ (2,2'-azino-di[3-etil-benz-tiazolin-sulfonato) en 5 ml de tampón de sustrato). Se mezclaron las placas de nuevo y la intensidad de la apoptosis inducida por anticuerpos se ve reflejada en el precipitado intensamente verde. Se determinó la intensidad del color utilizando un lector de ELISA a una longitud de onda de 415 nm contra una longitud de onda de referencia de 490 nm. Basándose en esta intensidad de color, se calculó la intensidad de la apoptosis inducida por anticuerpos.

Tal como se muestra en la figura 8, CM-1 induce la apoptosis de células de carcinoma colorrectal humano CACO-2 tras una incubación de 24 horas. El eje Y en esta figura es la diferencia entre la absorbancia a 415 nm y a la longitud de onda de referencia de 490 ( $A_{415}-A_{490}$ ). El control negativo es medio RPMI 1460. Tal como se muestra en la figura 8, tanto un anticuerpo CD95 Fas comercialmente disponible a 2  $\mu$ g/ml como el sobrenadante que contenía el anticuerpo monoclonal CM-1 (45  $\mu$ g/ml) inducen apoptosis en comparación con el control negativo. El efecto observado con el anticuerpo monoclonal CM-1 es 1,46 veces el del control negativo.

### **EJEMPLO 5**

#### **Determinación de si un anticuerpo inhibe la proliferación celular**

Puede someterse a ensayo la proliferación celular mediante varios procedimientos que son convencionales en la materia, por ejemplo, mediante la reducción de sales de tetrazolio. Las células metabólicamente activas reducen la sal de tetrazolio amarilla bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio ("MTT") (Sigma, St. Louis, MO), en parte por la acción de enzimas deshidrogenasas mitocondriales para generar equivalentes de reducción tales como NADH y NADPH. El formazán púrpura intracelular resultante puede solubilizarse y cuantificarse por medios espectrofotométricos. El ensayo de proliferación celular de MTT mide la tasa de proliferación celular y, cuando los acontecimientos metabólicos conducen a la apoptosis, la reducción de la viabilidad celular.

Para el ensayo de MTT, se tripsinizaron células y se resuspendieron las células en 10 ml de medio RPMI-1460 que contiene suero de ternero fetal (FCS) al 10%, glutamina al 1% y penicilina/estreptomina al 1% (medio completo). Entonces se contaron las células y se diluyeron hasta  $1 \times 10^6$  células/ml. Se pipetearon 50  $\mu$ l de esta suspensión en pocillos de una placa de 96 pocillos, dando como resultado aproximadamente  $5 \times 10^4$  células/pocillo. Se dejó vacía la primera fila de pocillos. Entonces, se añadieron 50  $\mu$ l del anticuerpo diluido en medio completo a cada pocillo. Entonces, se incubó la placa de 96 pocillos durante 24 ó 48 horas en un incubador a 37°C. Tras el periodo de incubación, se añadieron 50  $\mu$ l de disolución de MTT (5 mg/ml en PBS) a cada pocillo. Se incubó la placa de 96 pocillos durante 20 minutos a 37°C y se centrifugó durante 10 minutos a 2800 rpm. Se aspiró el sobrenadante, se añadieron 150  $\mu$ l de DMSO a cada pocillo y se resuspendió el sedimento celular. Se determinó la absorción a una longitud de onda de 540 nm y a una longitud de onda de referencia de 690 nm en un lector de ELISA.

Se representan resultados a título de ejemplo de tales experimentos en las figuras 9A y 9B. En este caso, se incubaron células de carcinoma de colon humano COLO-206F con el anticuerpo monoclonal CM-1, con sobrenadante reducido, o sin anticuerpo durante 24 horas (figura 9A) o 48 horas (figura 9B). El eje y muestra la diferencia en la absorbancia a 540 nm y 690 nm ( $A_{540}-A_{690}$ ). Tal como resulta evidente a partir de estos gráficos, el anticuerpo CM-1, tanto a 22  $\mu$ g/ml como a 44  $\mu$ g/ml dio como resultado una disminución de la proliferación celular y viabilidad celular tras un periodo de incubación tanto de 24 horas como de 48 horas.

### **EJEMPLO 6**

#### **Obtención de imágenes *in vivo* de un neoplasma**

Puede administrarse a un paciente que se sospecha que presenta un neoplasma, tal como un carcinoma colorrectal, una dosis de anticuerpo CM-1 radioyodado, u otro polipéptido específico de tumor, y anticuerpo no específico radiomarcado utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria. La localización del tumor para la obtención de imágenes puede efectuarse según el procedimiento de Goldenberg *et al.* (N. Engl. J. Med., 298:1384, 1978). Por vía i.v., puede administrarse a un paciente una infusión de volúmenes iguales de disoluciones de anticuerpo  $^{131}\text{I}$ -CM-1 y anticuerpo no específico marcado con Tc-99m. Antes de la administración de los reactivos i.v., normalmente el paciente se somete a prueba previamente para detectar hipersensibilidad a la preparación de anticuerpo (no marcado) o al anticuerpo de la misma especie que la preparación de anticuerpo. Para bloquear la captación por el tiroides de  $^{131}\text{I}$ , se administra por vía oral disolución de lugol, comenzando uno o más días antes de la inyección del anticuerpo radioyodado, a una dosis de 5 gotas dos o tres veces al día. Pueden tomarse imágenes de diversas vistas y regiones del cuerpo a las 4, 8 y 24 horas tras la inyección de las preparaciones marcadas. Si esta presente, el neoplasma, por ejemplo, un carcinoma colorrectal, se detecta mediante la obtención de imágenes en cámara gamma con resta de los recuentos de Tc-99m de los de  $^{131}\text{I}$ , tal como se describe para anticuerpo anti-CEA marcado con  $^{131}\text{I}$  y albúmina sérica

humana marcada con Tc-99m por DeLand *et al.* (Cancer Res. 40:3046, 1980). A las 8 horas tras la inyección, la obtención de la imagen es habitualmente clara, mejorando con el tiempo hasta las exploraciones a las 24 horas.

#### EJEMPLO 7

##### Tratamiento de un neoplasma utilizando mezclas de anticuerpos marcados

5 Puede tratarse un paciente diagnosticado con un neoplasma, por ejemplo, una mujer diagnosticada con un carcinoma de mama, con los polipéptidos de la invención tal como se expone a continuación. Puede administrarse disolución de lugol, por ejemplo, 7 gotas 3 veces al día, al paciente. Posteriormente, puede administrarse una dosis terapéutica de anticuerpo <sup>131</sup>I-CM-1 al paciente. Por ejemplo, puede administrarse una dosis de <sup>131</sup>I de 50 mCi  
10 semanalmente durante 3 semanas, y entonces se repite a intervalos ajustados en una base individual, por ejemplo, cada tres meses, hasta que la toxicidad hematológica interrumpa la terapia. El régimen de tratamiento exacto lo determina generalmente el médico encargado o la persona que supervisa el tratamiento. Pueden administrarse anticuerpos radioyodados como infusiones i.v. lentas en 50 ml de solución salina fisiológica estéril. Tras la tercera dosis de inyección, puede observarse una reducción en el tamaño del tumor primario y las metástasis, particularmente tras el segundo ciclo de terapia, o 10 semanas tras el inicio de la terapia.

15

#### EJEMPLO 8

##### Tratamiento utilizando anticuerpos conjugados

20 Puede tratarse un paciente diagnosticado con un neoplasma, por ejemplo, una mujer con cáncer de mama que ha metastatizado al pecho y los pulmones, con disoluciones de <sup>131</sup>I-CM-1, <sup>10</sup>B-CM-1 y un anticuerpo no específico marcado con Tc-99m. Puede administrarse al paciente una cantidad de anticuerpo CM-1 marcado con <sup>131</sup>I (en 50 ml de solución salina fisiológica estéril) suficiente para proporcionar 100 mCi de actividad de <sup>131</sup>I basándose en el peso de un paciente de 70 kg. Esta dosificación es igual a 3,3 mg de un anticuerpo que presenta 40-80 átomos de boro y 8-16 átomos de boro-10 por molécula de anticuerpo. El neoplasma se localiza de manera precisa en primer lugar utilizando el procedimiento del ejemplo 6. Además, debe administrarse disolución de lugol de manera continua al paciente, tal como  
25 en el ejemplo anterior. Entonces, puede enfocarse un haz bien colimado de neutrones térmicos sobre las ubicaciones de tumores definidas. Se efectúa la irradiación con una dosis de haz de neutrones externo de 400-800 rads, suministrada en un periodo de desde 8-20 min., para cada sitio tumoral, y se repite opcionalmente con la administración del anticuerpo que ubica el tumor, con o sin el radiomarcador, a intervalos ajustados en una base individual, pero que habitualmente no excede una dosis total de 3200 rads a menos que se indique terapia de irradiación externa simultánea. Si se desea, también puede administrarse al paciente, además de esta terapia, un agente antitumoral tal como un agente quimioterápico.  
30

##### Otras formas de realización

35 Aunque se ha descrito la invención haciendo referencia a sus formas de realización específicas, debe apreciarse que pueden introducirse modificaciones adicionales y la presente solicitud pretende comprender cualquier variación, utilización o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo que tales desviaciones de la presente descripción se encuentren dentro de la práctica conocida o habitual en la técnica a la que la invención pertenece y puedan aplicarse a las características esenciales expuestas anteriormente en la presente memoria.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo purificado o fragmento funcional del mismo, en el que dicho anticuerpo o fragmento funcional se une específicamente a por lo menos una de las células HT-29 (n.º de registro de la ATCC HTB-38; n.º de registro de la DSMZ ACC 299), CACO-2 (n.º de registro de la ATCC HBT-37; n.º de registro de la DSMZ ACC 169), COLO-320 (n.º de registro de la DSMZ ACC 144), COLO-206F (n.º de registro de la DSMZ ACC 21), o COLO-678 (n.º de registro de la DSMZ 194), dicho anticuerpo o fragmento funcional del mismo induce apoptosis o inhibe la proliferación de las células neoplásicas, y en el que dicho anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que es por lo menos 95% idéntica a la SEC ID n.º: 1 y una secuencia de región variable de cadena ligera que es por lo menos 95% idéntica a la SEC ID n.º: 3.
- 10 2. Anticuerpo purificado o fragmento funcional según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento funcional comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que es por lo menos 98% idéntica a la SEC ID n.º: 1 y una secuencia de región variable de cadena ligera que es por lo menos 98% idéntica a la SEC ID n.º: 3.
3. Anticuerpo purificado o fragmento funcional según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho anticuerpo o fragmento funcional comprende las secuencias de aminoácidos de las SEC ID n.º: 1 y 3.
- 15 4. Anticuerpo purificado o fragmento funcional según la reivindicación 1 a 3, en el que dicho anticuerpo o fragmento funcional es humano.
5. Anticuerpo purificado o fragmento funcional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo o fragmento funcional es monoclonal.
- 20 6. Anticuerpo purificado o fragmento funcional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo o fragmento funcional es seleccionado de entre el grupo constituido por F<sub>v</sub>, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>.
7. Célula que produce un anticuerpo o fragmento funcional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Célula según la reivindicación 7, en la que dicha célula es una célula de hibridoma.
9. Célula según la reivindicación 7, en la que dicha célula es una célula de levadura o *E. coli*.
- 25 10. Procedimiento de generación de la célula según la reivindicación 8, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:
- (a) poner en contacto los linfocitos con una línea celular de heteromiéloma en condiciones que dan lugar a la fusión de un linfocito con una célula de heteromiéloma, dando dicha fusión lugar a un hibridoma, y
- (b) determinar si dicho hibridoma produce un anticuerpo o fragmento funcional del mismo que se une específicamente a por lo menos una de las células HT-29 (n.º de registro de la ATCC HTB-38; n.º de registro de la DSMZ ACC 299), CACO-2 (n.º de registro de la ATCC HBT-37; n.º de registro de la DSMZ ACC 169), COLO-320 (n.º de registro de la DSMZ ACC 144), COLO-206F (n.º de registro de la DSMZ ACC 21), o COLO-678 (n.º de registro de la DSMZ 194).
- 30 11. Utilización del anticuerpo purificado o fragmento funcional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en un procedimiento de diagnóstico *in vitro* de un neoplasma en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:
- (a) poner en contacto una célula o muestra de tejido de dicho mamífero con dicho anticuerpo purificado o fragmento funcional y
- (b) detectar si dicho anticuerpo purificado o fragmento funcional se une a dicha célula o muestra de tejido, en la que la unión de dicho anticuerpo purificado o fragmento funcional a dicha célula o muestra de tejido es indicativa de que dicho mamífero presenta un neoplasma.
- 40 12. Utilización según la reivindicación 11, en la que dicho mamífero es un ser humano.
13. Utilización según la reivindicación 11, en la que dicho neoplasma es un adenocarcinoma colorrectal, un cáncer de ovario, un carcinoma escamoso de pulmón, o un carcinoma lobulillar de mama.
- 45 14. Utilización según la reivindicación 11, en la que dicho anticuerpo o fragmento funcional está conjugado con un agente detectable seleccionado de entre el grupo constituido por un radionúclido, un marcador fluorescente, una enzima, una citotoxina, una citocina y un inhibidor del crecimiento.
15. Utilización según la reivindicación 11, en la que dicho anticuerpo o fragmento funcional está conjugado con una etiqueta de purificación de proteína.
16. Utilización según la reivindicación 15, en la que dicha etiqueta de purificación de proteína puede

escindirse.

- 5 17. Anticuerpo purificado o fragmento funcional según las reivindicaciones 1 a 6 para su utilización como medicamento destinado al tratamiento de un trastorno proliferativo en un mamífero, en el que la unión de dicho anticuerpo purificado o fragmento funcional a una célula o tejido da lugar a la inducción de la apoptosis de dicha célula o tejido.
18. Utilización según la reivindicación 17, en la que dicho mamífero es un ser humano.
19. Utilización según la reivindicación 17, en la que dicho trastorno proliferativo es un adenocarcinoma colorrectal, un cáncer de ovario, un carcinoma escamoso de pulmón o un carcinoma lobulillar de mama.
- 10 20. Utilización según la reivindicación 17, en la que dicho anticuerpo o fragmento funcional está conjugado con un agente detectable seleccionado de entre el grupo constituido por un radionúclido, un marcador fluorescente, una enzima, una citotoxina, una citocina y un inhibidor del crecimiento.
21. Utilización según la reivindicación 20, en la que dicho agente detectable puede inducir la apoptosis de dicha célula o tejido.
- 15 22. Utilización según la reivindicación 17, en la que dicho anticuerpo o fragmento funcional está conjugado con una etiqueta de purificación de proteína.
23. Utilización según la reivindicación 21, en la que dicha etiqueta de purificación de proteína puede escindirse.
- 20 24. Utilización del anticuerpo purificado o fragmento funcional según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, en la que la unión de dicho anticuerpo purificado o fragmento funcional a una célula o tejido da lugar a una reducción en la proliferación de dicha célula o de una célula en dicho tejido.
25. Medicamento que comprende el anticuerpo purificado o fragmento funcional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
26. Agente de diagnóstico que comprende el anticuerpo purificado o fragmento funcional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

VH de CM-1

```

agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat ggc atg cac      60
Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His 20
1      5      10      15
tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt ata tca tat gat gga      120
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly 40
25      30      35
agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc      180
Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser 60
45      50      55
aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac      240
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr 80
65      70      75
tgt gcg aaa gac cgg tct tcg ggc tac tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggc acc ctg      300
Cys Ala Lys Asp Arg Ser Ser Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu 100
85      90      95
gtc acc
Val Thr
306

```

FIG. 1

VL de CM-1

1 tcc tat gtg ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga cag acg gcc agg atc 60  
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile 20  
 5 10 15 20  
 120 acc tgc tct gga gat gca ttg cca aag caa tat gct tat tgg tac cag cag aag cca ggc  
 Thr Cys Ser Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly 40  
 25 30 35 40  
 180 cag gcc cct gtg ctg gtg ata tat aaa gac agt gag agg ccc tca ggg atc cct gag cga  
 Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Ser Gly Ile Pro Glu Arg 60  
 45 50 55 60  
 240 ttc tct ggc tcc agc tca ggg aca aca gtc acg ttg acc atc agt gga gtc cag gca gaa  
 Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu 80  
 65 70 75 80  
 300 gac gag gct gac tat tac tgt caa tca gca gac agc agt ggt act tat gtg gta ttc ggc  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Ser Gly Thr Tyr Val Val Phe Gly 100  
 85 90 95 100  
 327 gga ggg acc aag ctg acc gtc cta ggt  
 Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly 105

FIG. 2

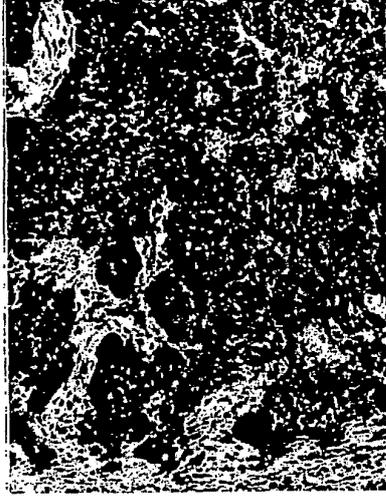


FIG. 3C



FIG. 3B

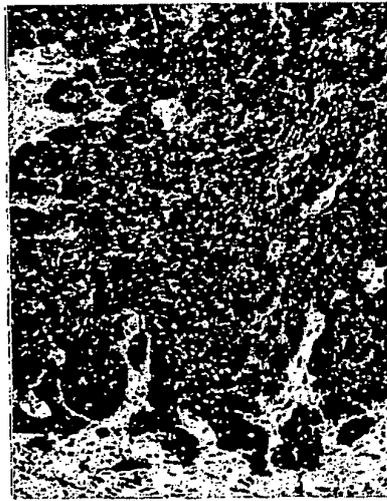


FIG. 3A



FIG. 4C

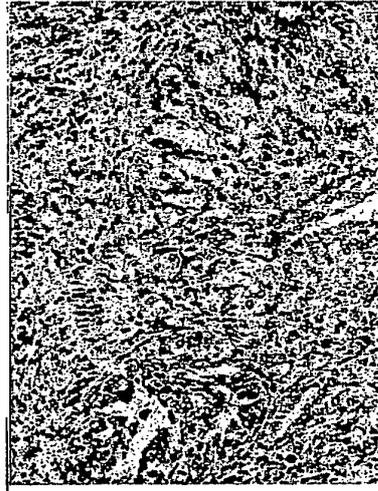


FIG. 4B



FIG. 4A



FIG. 5C



FIG. 5B



FIG. 5A

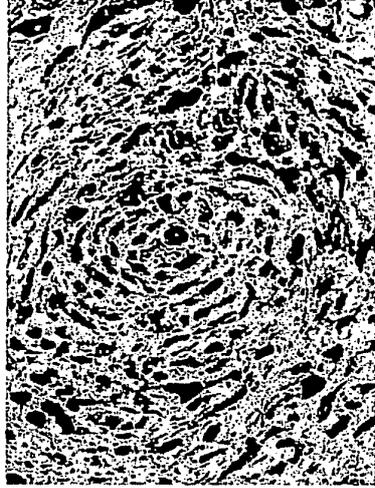


FIG. 6C

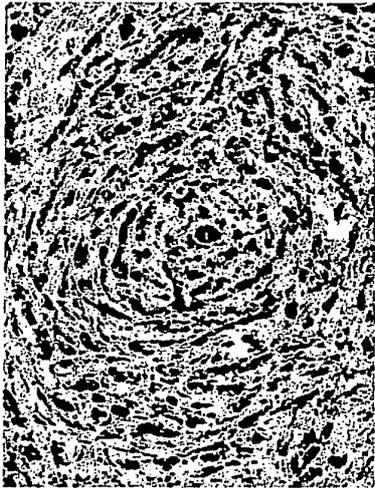


FIG. 6B

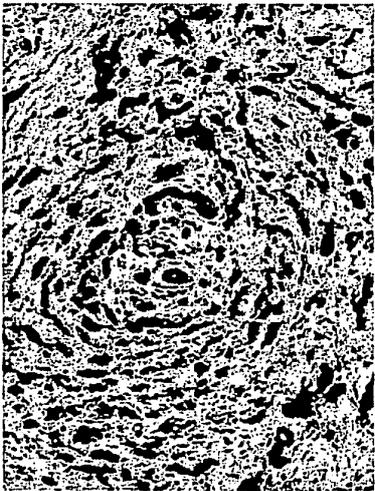


FIG. 6A



FIG. 7C

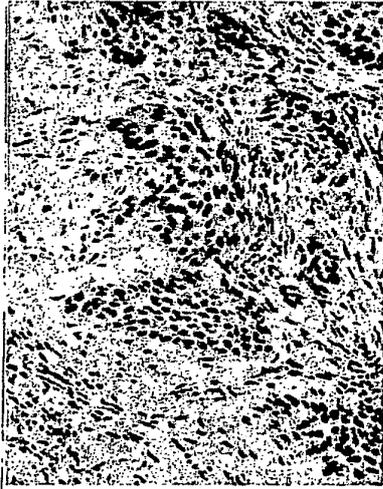


FIG. 7B



FIG. 7A

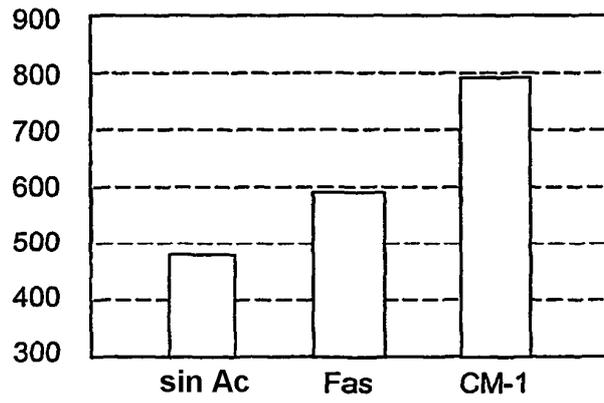


FIG. 8

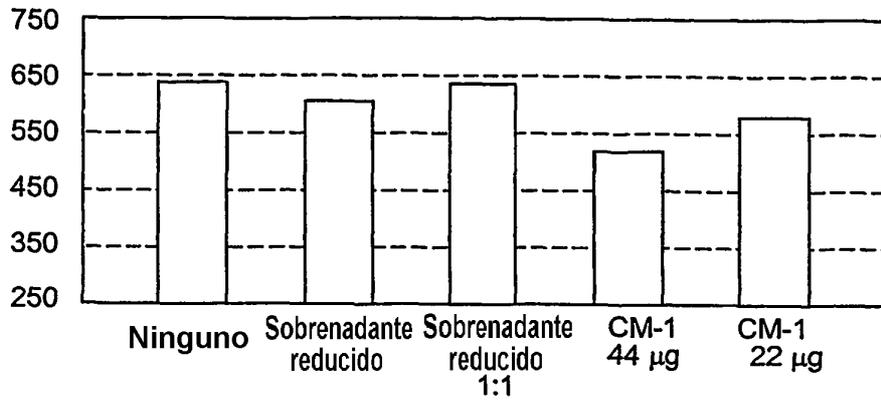


FIG. 9A

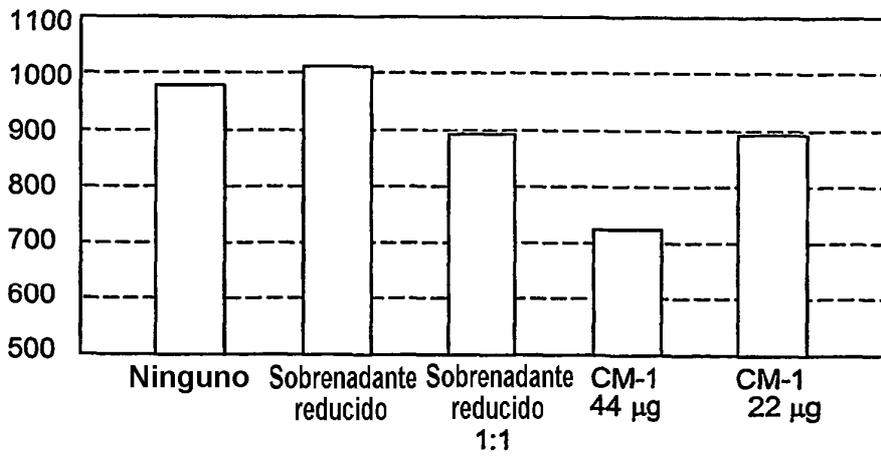


FIG. 9B