



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 696**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07858450 .5**

96 Fecha de presentación : **15.10.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2079482**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.07.2009**

54 Título: **Utilización de un anticuerpo anti-CD151 para el tratamiento del cáncer.**

30 Prioridad: **18.10.2006 FR 06 09135**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.06.2011**

73 Titular/es: **Pierre Fabre Médicament  
45 Place Abel Gance  
92100 Boulogne-Billancourt, FR**

72 Inventor/es: **Haeuw, Jean-François y  
Goetsch, Liliane**

74 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

ES 2 361 696 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

Utilización de un anticuerpo anti-cd151 para el tratamiento del cáncer

5 La presente solicitud se refiere a una nueva utilización de anticuerpos anti-CD151 capaces de inhibir el crecimiento tumoral, siendo dichos anticuerpos principalmente monoclonales de origen murino, quimérico y humanizado. Según un aspecto particular, la solicitud tiene por objeto la utilización de estos anticuerpos, o sus fragmentos funcionales, como medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de los cánceres. La solicitud comprende finalmente los productos y/o las composiciones que comprenden dichos anticuerpos en asociación, por ejemplo, con anticuerpos y/o agentes anticancerosos o conjugados con toxinas y su utilización para la prevención y/o el tratamiento de determinados cánceres.

10 CD151, también denominada PETA-3 o SFA-1, es una proteína de membrana que pertenece a la familia de las tetraspaninas (Boucheix y Rubinstein, 2001, Cell Mol. Life Sci. 58, 1189-1205 ; Hemler, 2001, J. Cell Biol. 155, 1103-1107). En el ser humano, CD151 posee 253 aminoácidos y contiene 4 fragmentos de membrana y 2 dominios extracelulares EC1 (18 aminoácidos, secuencia [40-57]) y EC2 (109 aminoácidos, secuencia [113-221]), también denominados bucles extracelulares. Sin embargo, debe indicarse que a nivel de la secuencia nucleotídica, se han identificado hasta la fecha dos variantes para CD151, a saber una que comprende los nucleótidos A y C respectivamente en las posiciones 395 y 409 (SEQ ID No. 1) [Fitter *et al.*, 1995, Blood 86(4), 1348-1355] y la otra que comprende para las mismas posiciones los nucleótidos G y T en lugar y en el sitio de los nucleótidos A y C [Hasegawa *et al.*, 1996, J. Virol. 70(5), 3258-3263]. Debido a esto, puede observarse una mutación a nivel de la secuencia peptídica, a saber una mutación de los restos K (Lys) y P (Pro) respectivamente en las posiciones 132 y 137 en los restos R (Arg) y S (Ser) [Fitter *et al.*, 1995, Blood 86(4), 1348-1355 / Hasegawa *et al.*, 1996, J. Virol. 70(5), 3258-3263].

20 CD151 está sobreexpresada en numerosos cánceres, como por ejemplo los cánceres de pulmón [Tokuhara *et al.*, 2001, Clin. Cancer Res. 7, 4109-4114], de colon [Hashida *et al.*, 2003, Br. J. Cancer 89, 158-167], de próstata [Ang *et al.*, 2004, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 13, 1717-1721] o de páncreas [Gesierich *et al.*, 2005, Clin. Cancer Res. 11, 2840-2852].

25 La utilización de ratones knock-out que no expresan CD151, y de anticuerpos anti-CD151 y de ARNs para bloquear *in vitro* la funcionalidad y la expresión de CD151 en diferentes tipos celulares ha permitido mostrar que CD151 está implicada en varios fenómenos asociados con el cáncer, como la adhesión celular (Nishiuchi *et al.*, 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 1939-1944 ; Winterwood *et al.*, 2006, Mol. Biol. Cell 17, 2707-2721), la motilidad celular (Kohno *et al.*, 2002, Int. J. Cancer 97, 336-343), la migración celular (Yauch *et al.*, 1998, Mol. Biol. Cell 9, 2751-2765 ; Testa *et al.*, 1999, Cancer Res. 59, 3812-3820 ; Penas *et al.*, 2000, J. Invest. Dermatol. 114, 1126-1135 ; Klosek *et al.*, 2005, Biochem. Biophys. Res. Commun. 336, 408-416), la invasión celular (Kohno *et al.*, 2002, Int. J. Cancer 97, 336-343 ; Shiomi *et al.*, 2005, Lab. Invest. 85, 1489-1506 ; Hong *et al.*, 2006, J. Biol. Chem. 281, 24279-24292) y la angiogénesis (Yanez-Mo *et al.*, 1998, J. Cell Biol. 141, 791-804 ; Sincock *et al.*, 1999, J. Cell Sci. 112, 833-844 ; Takeda *et al.*, 2006, Blood).

30 Una de las propiedades notables de las tetraspaninas es su capacidad para asociarse entre ellas, así como a un número importante de otras moléculas de superficie para formar complejos macromoleculares estructurados. En estos complejos, cada tetraspanina está asociada específicamente a una o varias moléculas de superficie formando así complejos primarios, constituidos por una tetraspanina y una molécula asociada. Las tetraspaninas pueden organizar microdominios particulares de la membrana plásmica en los cuales reclutarán a sus moléculas asociadas que podrían estar acopladas funcionalmente. El conjunto de las interacciones que implican a las tetraspaninas se ha denominado « red de tetraspaninas » o « Tetraspanin Web ».

35 CD151 interacciona en la superficie de las células con diferentes proteínas de membrana. Se han puesto de manifiesto complejos muy estables, resistentes a la acción de determinados detergentes, principalmente con las integrinas receptoras de las lamininas, y más particularmente con las integrinas  $\alpha 3 \beta 1$  o  $\alpha 6 \beta 4$  cuyo ligando preferente es la laminina 5 (Yauch *et al.*, 1998, Mol. Biol. Cell 9, 2751-2765 ; Lammerding *et al.*, 2003, Proc. Natl. Acad. Sci USA 100, 7616-7621). Esta asociación implica los dominios extracelulares de CD151 y de las integrinas. La secuencia QRD [194-196] de CD151, localizada en el bucle EC2, es muy importante en esta asociación ya que la mutación de este sitio provoca la pérdida de la interacción con determinadas integrinas (Kazarov *et al.*, 2002, J. Cell Biol. 158, 1299-1309). Por otra parte, los complejos ternarios funcionales CD151/integrina  $\alpha 6 \beta 4$ /c-Met (receptor de HGF) se han puesto de manifiesto en células tumorales (Klosek *et al.*, 2005, Biochem. Biophys. Res. Commun. 336, 408-416). La inhibición de la expresión de CD151 por tratamiento de las células con un ARN de interferencia provoca una inhibición del crecimiento y de la migración celular inducida por HGF.

40 Las interacciones en una misma célula de CD151 con otras tetraspaninas, necesarias para la formación de la red de tetraspaninas, dependerá de las regiones de membrana y citoplásmicas de CD151 ya que se ha mostrado que la delección del bucle EC2 no rompe la asociación de CD151 con otras tetraspaninas (Berditchevski, 2001, J. Cell Sci. 114, 4143-4151).

45 CD151 es capaz de regular los fenómenos de adhesión, de migración y de invasión celular por la modulación de diferentes vías de señalización, como por ejemplo la vía de los fosfoinosítidos a través de una asociación con la PI4-quinasa (Yauch *et al.*, 1998, Mol. Biol. Cell 9, 2751-2765), la vía de señalización de c-Jun a través de la fosforilación de FAK, Src, p38-MAPK y JNK (Hong *et al.*, 2006), la fosforilación de las integrinas por la PKC (Zhang *et al.*, 2001, J. Biol. Chem. 276, 25005-25013), la activación de GTPasas de la familia Rho (Shigeta *et al.*, 2003, J. Cell Biol. 163, 165-176).

Las interacciones de tipo homófilo entre células son también responsables de un aumento de la motilidad celular y de la expresión de la metaloproteínasa MMP-9 (Hong *et al.*, 2006). Estas interacciones intercelulares CD151-CD151 provocan la activación de c-Jun a través de la fosforilación de FAK, Src, p38-MAPK y JNK

Hasta la fecha, a pesar del interés de la proteína CD151, sólo se ha generado un anticuerpo con fines terapéuticos, a saber el anticuerpo monoclonal 50-6.

El anticuerpo monoclonal 50-6 (isotipo IgG1) dirigido contra CD151 se ha generado en el ratón por inmunizaciones sustractivas con células humanas de carcinoma epidermoide HEP-3 (Testa *et al.*, 1999, Cancer Res. 59, 3812-3820).

El anticuerpo 50-6 es capaz de inhibir *in vitro* la migración de las células humanas de carcinoma cervical HeLa transfectadas con el fin de sobreexpresar CD151 y de las células HEP-3, y la angiogénesis en un modelo de neovascularización de membrana corioalantoica inducida por bFGF (basic fibroblast growth factor). Inhibe *in vivo* las metástasis inducidas por la inoculación de células HEP-3 en 2 modelos de embrión de pollo (Testa *et al.*, 1999, Cancer Res. 59, 3812-3820). En estos modelos, la actividad inhibidora del anticuerpo 50-6 se determina por la medida de la actividad de la proteína huPA (human urokinase-type plasminogen activator) en extractos de pulmones. Según los autores, esta dosificación constituye el reflejo de la presencia de células humanas en los pulmones. Después de la dosificación, se estima la reducción de las metástasis (diseminación de las células HEP-3 en los pulmones de los embriones de pollo) inducida por el anticuerpo 50-6, por comparación con un anticuerpo control, en 74% en un modelo denominado de « metástasis espontánea » en el que la inoculación de las células está seguida de una inyección del anticuerpo y en 57% en un modelo denominado de « metástasis experimental » en el que las células y el anticuerpo se inoculan conjuntamente. Según los autores, las propiedades anti-tumorales del anticuerpo 50-6 observadas *in vivo* no parecen estar asociadas a un efecto citostático o citotóxico ya que no se ha mostrado ningún efecto sobre la proliferación *in vitro* de las células HEP-3.

El hibridoma que produce el anticuerpo 50-6 está disponible en la ATCC con la referencia CRL-2696 (hibridoma depositado inicialmente con la referencia 50-6 [PTA-227]).

Según un aspecto general, la presente invención pretende la utilización de al menos un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de unirse a la proteína CD151 e inhibir así el crecimiento tumoral para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de tumores primarios.

Varios estudios experimentales han mostrado el papel importante de las tetraspaninas en la formación de metástasis, actuando bien como supresores o bien como promotores de las metástasis. Así, la transfección de tetraspaninas como CD9, CD63 o CD82 reduce el potencial metastásico de líneas cancerosas. En cambio, la expresión de las tetraspaninas CD151 y Co-029 parece producir el efecto inverso. Estas 2 tetraspaninas serían por lo tanto promotores de la metástasis. Estos resultados son coherentes con diferentes estudios clínicos que han demostrado que, en varios cánceres (mama, pulmón, esófago, estómago, hígado, páncreas, colon, próstata, melanoma...), CD9 y CD82 se expresan menos en los tumores primitivos cuando hay metástasis y que su bajada de expresión predice una tasa de supervivencia inferior. En el cáncer de pulmón, la disminución combinada de la expresión de CD9 y de CD82 se ha correlacionado con un potencial metastásico más importante que cuando se reduce la expresión de uno solo de estos dos antígenos.

Varios estudios retrospectivos han mostrado que la sobreexpresión de CD151 estaba asociada a la agresividad de determinados cánceres, como los cánceres de pulmón, de colon y de próstata, y podía considerarse como un factor de mal pronóstico (Tokuhara *et al.*, 2001, Clin. Cancer Res. 7, 4109-4114 ; Hashida *et al.*, 2003, Br. J. Cancer 89, 158-167 ; Ang *et al.*, 2004, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 13, 1717-1721). En estos casos, la media de supervivencia está en efecto disminuida en los pacientes cuyo tumor expresa CD151, comparativamente con aquellos cuyo tumor no expresa CD151.

La sobreexpresión de CD151 en diferentes líneas tumorales humanas (HeLa, RPMI14788, A172, HT1080), inducida por transfección del gen correspondiente, provoca un aumento de la motilidad, de la migración y de la invasión de las células transfectadas (Testa *et al.*, 1999, Cancer Res. 59, 3812-3820 ; Kohno *et al.*, 2002, Int. J. Cancer 97, 336-343). Estos fenómenos se inhiben en presencia de anticuerpos anti-CD151.

Según otro aspecto, los fragmentos funcionales de anticuerpo según la invención consisten, por ejemplo, en fragmentos Fv, scFv (sc para cadena sencilla), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc o fragmentos divalentes, o cualquier fragmento cuya duración de vida media estaría aumentada por modificación química, como la adición de poli(alquilen)glicol tal como poli(etilen)glicol ("PEGilación") (fragmentos PEGilados denominados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')<sub>2</sub>-PEG o Fab'-PEG) (« PEG » según la nomenclatura inglesa Poly(Ethylene) Glycol), o por incorporación en un liposoma, microesferas o PLGA, siendo capaces dichos fragmentos de ejercer de manera general una actividad incluso parcial del anticuerpo del que proceden.

Preferentemente, dichos fragmentos funcionales estarán constituidos o comprenderán una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del que se derivan, siendo suficiente dicha secuencia parcial para retener la misma especificidad de unión que el anticuerpo del que procede y una afinidad suficiente, preferentemente al menos igual a 1/100, de manera más preferida al menos 1/10 de la del anticuerpo del que procede.

Dicho fragmento funcional contendrá como mínimo 5 aminoácidos, preferentemente 10, 15, 25, 50 y 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia del anticuerpo del que procede.

Preferentemente, estos fragmentos funcionales serán fragmentos de tipo Fv, scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab'), scFv-Fc o fragmentos divalentes, que poseen generalmente la misma especificidad de fijación que el anticuerpo del que proceden. Según la presente invención, los fragmentos de anticuerpo de la invención pueden obtenerse a partir de anticuerpos tales como los descritos anteriormente por métodos tales como digestión con enzimas, como la pepsina o la papaína y/o por escisión de los puentes disulfuro por reducción química. De otra manera, los fragmentos de anticuerpo comprendidos en la presente invención pueden obtenerse por técnicas de

recombinaciones genéticas muy conocidas igualmente por el experto en la técnica o por síntesis peptídica mediante por ejemplo sintetizadores automáticos de péptidos tales como los suministrados por la empresa Applied.

Según un aspecto de la invención, el anticuerpo utilizado consiste en un anticuerpo monoclonal murino.

5 Están comprendidos igualmente por anticuerpos según la presente invención, los anticuerpos quiméricos o humanizados.

Por anticuerpo quimérico, se entiende designar un anticuerpo que contiene una región variable (cadena ligera y cadena pesada) natural derivada de un anticuerpo de una especie dada en asociación con las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo de una especie heteróloga a dicha especie dada.

10 Los anticuerpos o sus fragmentos de tipo quimérico utilizados según la invención pueden prepararse utilizando las técnicas de recombinación genética. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico podrá realizarse clonando un ADN recombinante que contiene un promotor y una secuencia que codifica la región variable de un anticuerpo monoclonal no humano, principalmente murino, según la invención y una secuencia que codifica la región constante de anticuerpo humano. Un anticuerpo quimérico de la invención codificado por dicho gen recombinante será por ejemplo una quimera ratón-ser humano, estando determinada la especificidad de este anticuerpo por la región variable derivada del ADN murino y su isotipo determinado por la región constante derivada del ADN humano. Para los métodos de preparación de anticuerpos quiméricos, se podrá hacer referencia por ejemplo al documento Verhoeyn et al. (BioEssays, 8:74, 1988).

20 Por anticuerpos humanizados, se entiende designar un anticuerpo que contiene las regiones CDRs derivadas de un anticuerpo de origen no humano, derivándose las demás partes de la molécula de anticuerpo de uno (o varios) anticuerpos humanos. Además, algunos de los restos de los segmentos del esqueleto (denominados FR) pueden modificarse para conservar la afinidad de unión (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986 ; Verhoeyn et al., Science, 239:1534-1536, 1988 ; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988).

25 Los anticuerpos humanizados o sus fragmentos funcionales pueden prepararse por técnicas conocidas por el experto en la técnica (como por ejemplo las descritas en los documentos Singer et al., J. Immun. 150:2844-2857, 1992 ; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992 ; o Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992). Dichos anticuerpos humanizados se prefieren para su utilización en los métodos de tratamiento profiláctico y/o terapéutico *in vivo*. Otras técnicas de humanización son igualmente conocidas por el experto en la técnica como por ejemplo la técnica de « *CDR Grafting* » descrita por PDL que es el objeto de las patentes EP 0 451 261, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 o EEUU 5.530.101, EEUU 6.180.370, EEUU 5.585.089 y EEUU 5.693.761. Se pueden citar igualmente las patentes EEUU 5.639.641 ó 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293.

30 De manera sorprendente, y contra toda previsión por parte del experto en la técnica, la presente invención describe por primera vez la utilización de un anticuerpo anti-CD151 tal como se ha descrito más arriba, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de inhibir la proliferación de las células tumorales y el desarrollo del tumor primario, independientemente de su capacidad de inhibir la angiogénesis y/o la formación de metástasis.

35 Los anticuerpos descritos en la solicitud presentan, por lo tanto, la capacidad de inhibir primeramente el desarrollo de los tumores.

Esta actividad anti-tumoral de los anticuerpos objeto de la presente invención constituye una propiedad nueva e inesperada para un anticuerpo dirigido contra CD151, ya que ningún anticuerpo anti-CD151 descrito hasta la fecha posee este tipo de actividad. Los anticuerpos objeto de la presente invención presentan, por lo tanto, una propiedad diferente, y suplementaria, respecto a los anticuerpos descritos anteriormente, y principalmente respecto al anticuerpo 50-6 ya que las propiedades anti-tumorales de este anticuerpo no están ligadas a un efecto sobre la proliferación de las células tumorales.

40 Este resultado también constituye la primera manifestación de un vínculo entre CD151 y el desarrollo del tumor primario, incluso de la proliferación de las células tumorales *in vivo*. En efecto, hasta la fecha sólo se habían descrito las actividades pro-metastásicas y pro-angiogénicas de CD151.

45 La proliferación desordenada de las células de un órgano o de un tejido constituye una de las primeras etapas del cáncer. Las células tumorales son células que ya no tienen la capacidad de someterse a los controles normales del crecimiento celular en el órgano o tejido referido. El crecimiento tumoral es exponencial, y las células tumorales se multiplican de forma excesiva bajo el efecto de factores de crecimiento y angiogénicos.

50 Según un aspecto principal, la invención se refiere a la utilización de al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de inhibir el desarrollo del tumor primario y la proliferación de las células tumorales.

55 Más particularmente, la presente invención se refiere a la utilización de al menos un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de unirse a la proteína CD151, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los tumores primarios.

Además, la solicitante avanza, sin querer estar asociada a ninguna teoría, que la utilización de anticuerpos anti-CD151 en el marco del tratamiento del cáncer presentará un interés, no únicamente debido a una inhibición de la angiogénesis, sino igualmente debido a la inhibición de la actividad promotora de metástasis de CD151.

60 La presente invención describe, por lo tanto, la utilización de un anticuerpo tal como se ha descrito más arriba, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de inhibir la actividad promotora de metástasis de dicha proteína CD151 en las células tumorales.

Más particularmente, la solicitante piensa que esta inhibición se traduce en una inhibición de las diferentes etapas del proceso metastásico, y principalmente de la adhesión celular, de la migración celular y/o de la invasión celular.

65 Las etapas clásicas de dicha actividad promotora, y más particularmente de la diseminación tumoral y del proceso metastásico, son las siguientes :

1/ invasión del tejido de sostén por las células del tumor primario que necesita una degradación por enzimas proteolíticas (tales como las metaloproteinasas) de la membrana basal y de la matriz extracelular constituidas por proteínas estructurales como la laminina, el colágeno o la fibronectina,

2/ migración de las células tumorales a través de los tejidos y en la circulación sanguínea,

3/ adhesión a la pared vascular y parada en un órgano,

4/ salida del vaso (nueva etapa de invasión) y adaptación al nuevo entorno (proliferación y angiogénesis).

La migración celular es esencial durante el desarrollo embrionario. Aunque la migración de las células sea menos importante en el adulto, determinados tipos celulares, tales como los linfocitos, los macrófagos y los fibroblastos, continuarán desplazándose durante la respuesta inmunitaria, la inflamación y la curación de heridas en el adulto para mantener la hemostasis. Sin embargo, a nivel patológico, la migración de las células tumorales, contribuye de forma importante a la progresión de los tumores al estadio metastásico. Un determinado número de factores quimiotácticos son responsables de esta migración, factores derivados bien de las células tumorales o del anfitrión. Entre estos factores, se citan los factores de crecimiento (principalmente los que estimulan la angiogénesis), los péptidos de degradación del colágeno, las proteínas de adhesión como la laminina y la fibronectina.

Según un aspecto particular, la solicitud se refiere a la utilización de al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de inhibir la migración celular de las células tumorales.

La invasión es el signo principal de la malignidad de un tumor : éste sobrepasa su centro de origen para extenderse a los tejidos cercanos y a distancia. El carácter invasivo traduce la pérdida de las propiedades habituales de una célula : normalmente las células de la mayoría de los tejidos se adhieren las unas a las otras mediante estructuras denominadas desmosomas, por moléculas adhesivas; en un epitelio, también se adhieren a la membrana basal que lo limita en profundidad. Las células tumorales pierden estas propiedades normales para adquirir las nuevas. Los vínculos entre ellas se relajan y las células se liberan las unas de las otras. Adquieren una movilidad que les permite liberarse del foco primitivo, introducirse en (invadir) los tejidos vecinos, implicando a veces a las fibras del tejido conjuntivo. Para los epitelios flanqueados principalmente por una membrana basal y para los carcinomas que se derivan, esta membrana es el primer obstáculo a franquear. Ésta resulta alterada y disuelta por las enzimas (proteasas, catepsina) secretadas por las células tumorales. Esta destrucción de la membrana basal se ve a veces acentuada por las enzimas normalmente secretadas por los glóbulos blancos y desprovistas de sus actividades habituales. Todas estas modificaciones biológicas y moleculares del comportamiento celular son la condición de la invasión.

Según otro aspecto, la solicitud se refiere a la utilización de al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de inhibir la invasión celular de las células tumorales.

Las células del organismo se adhieren las unas a las otras así como a la matriz extracelular que las rodea. La adhesión celular es un mecanismo ubicuo implicado en la mayoría de los fenómenos celulares fisiológicos, tales como la supervivencia, la proliferación o la diferenciación de las células, pero también en las diferentes situaciones patológicas como por ejemplo el cáncer y el fenómeno de metástasis. Diferentes proteínas de la superficie celular están implicadas en la adhesión celular, tales como las cadherinas o las integrinas.

De manera preferida, la utilización según la invención se basa principalmente en la inhibición de la adhesión celular.

Según otro aspecto más, la invención se refiere a la utilización de al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de inhibir la adhesión celular de las células tumorales.

Como se ha dicho más arriba, la proteína CD151 forma parte de la familia de las tetraspaninas y, como tal, comprende 2 dominios extracelulares EC1 (18 aminoácidos, secuencia [40-57]) y EC2 (109 aminoácidos, secuencia [113-221]), denominados también bucles extracelulares.

Según la presente invención, los anticuerpos utilizados son capaces de unirse al menos a un epítipo situado en el dominio extracelular. De manera preferida, dicho anticuerpo se fijará a nivel de los bucles EC1 y/o EC2.

Más particularmente, según una forma de ejecución preferida de la invención, se describe la utilización de al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de unirse a un epítipo comprendido en el bucle extracelular 1 (EC1) y/o 2 (EC2), preferentemente EC2, correspondiente respectivamente a los aminoácidos 40-57 (SEQ ID No. 6) y 113-221 (SEQ ID No. 4) de la proteína CD151.

El bucle EC1 [40-57] comprende 18 aminoácidos y presenta una masa teórica de 2.002,2 Da.

El bucle EC2 [113-221] posee un sitio de N-glicosilación (resto Asn159) y 6 restos Cisteína que forman 3 puentes disulfuro. Se ha propuesto un modelo estructural del bucle EC2 de las tetraspaninas, y principalmente de CD151, a partir de la estructura tridimensional del bucle EC2 de la tetraspanina CD81 (Seigneuret *et al.*, 2001, J. Biol. Chem. 276, 40055-40064). Según este modelo, las tetraspaninas poseen un armazón común, relativamente conservado y constituido por 3 hélices  $\alpha$ , y un dominio específico variable. Para CD151, este armazón estará constituido por las regiones [113-157] y [209-221], y el dominio variable por la región [158-208].

El dominio variable del bucle EC2 estará más particularmente implicado en las interacciones específicas de CD151 con las proteínas de la familia de las integrinas. Los experimentos de mutación dirigida han mostrado principalmente la importancia de la región [193-208], y más precisamente del tripéptido QRD [194-196] y del resto Cisteína en posición 192, en la asociación de CD151 con determinadas integrinas receptores de la laminina, tales como las integrinas  $\alpha 3 \beta 1$  o  $\alpha 6 \beta 4$  (Kazarov *et al.*, 2002, J. Cell Biol. 158, 1299-1309).

De manera aún más preferida, la presente invención pretende la utilización de al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de unirse a un epítipo de la región EC2 que comprende al menos los aminoácidos Glutamina, Arginina y Aspartato respectivamente en las posiciones 194, 195 y 196 (QRD<sup>194-196</sup>) de la proteína CD151.

Según otro aspecto, debe comprenderse que la invención consiste principalmente en la utilización de al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, que consiste en un anticuerpo monoclonal.

Debe entenderse por « anticuerpo monoclonal » un anticuerpo procedente de una población de anticuerpos sensiblemente homogéneos. Más particularmente, los anticuerpos individuales de una población son idénticos con la excepción de algunas mutaciones opcionales que pueden producirse naturalmente que pueden encontrarse en proporciones mínimas. En otros términos, un anticuerpo monoclonal consiste en un anticuerpo homogéneo resultante de la proliferación de un solo clon celular (por ejemplo un hibridoma, una célula anfitriona eucariota transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, una célula anfitriona procariota transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, etc.) y que se caracteriza generalmente por cadenas pesadas de una sola y misma clase y sub-clase, y cadenas ligeras de un solo tipo. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y están dirigidos contra un solo antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que comprenden clásicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes, o epítipos, cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo epítipo del antígeno.

Según un modo de realización particular de la invención, el anticuerpo monoclonal utilizado se elige entre los anticuerpos TS151 y TS151r. En lo que sigue de la descripción, las expresiones TS151r y TS151R son intercambiables.

La presente invención describe, por lo tanto, la utilización de al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, consistiendo dicho anticuerpo en el anticuerpo TS151 y/o el anticuerpo TS151r.

Más particularmente, el anticuerpo TS151 se define porque comprende al menos :

- las 3 CDRs de la cadena pesada CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 respectivamente de secuencia SEQ ID No. 7, 8 y 9 ; y
- las 3 CDRs de la cadena ligera CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 respectivamente de secuencia SEQ ID No. 11, 12 y 13.

Según otra forma de realización, el anticuerpo TS151 se caracteriza porque comprende una cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID No. 10 y una cadena ligera que comprende la secuencia SEQ ID No. 14.

La tabla 1 siguiente recoge estos elementos.

Anticuerpo	Cadena ligera	Cadena pesada	SEQ ID N°
TS151		CDR-H1	7
		CDR-H2	8
		CDR-H3	9
	CDR-L1		11
	CDR-L2		12
	CDR-L3		13
		Completa (dominio variable)	10
	Completa (dominio variable)		14

Tabla 1

En lo que se refiere al anticuerpo TS151r, este último se define porque comprende al menos :

- las 3 CDRs de la cadena pesada CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 respectivamente de secuencia SEQ ID No. 15, 16 y 17 ; y
- las 3 CDRs de la cadena ligera CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 respectivamente de secuencia SEQ ID No. 19, 20 y 21.

Según otra forma de realización, el anticuerpo TS151r se caracteriza porque comprende una cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID No. 18 y una cadena ligera que comprende la secuencia SEQ ID No. 22.

La tabla 2 siguiente resume estos elementos.

Anticuerpo	Cadena ligera	Cadena pesada	SEQ ID N°
TS151r		CDR-H1	15
		CDR-H2	16
		CDR-H3	17
	CDR-L1		19
	CDR-L2		20
	CDR-L3		21
		Completa (dominio variable)	18
	Completa (dominio variable)		22

Tabla 2

5 Según otra forma de realización, la tabla 3 siguiente reagrupa las secuencias nucleotídicas de los anticuerpos TS151 y TS151r.

Anticuerpo	Cadena ligera	Cadena pesada	SEQ ID N°
TS151		CDR-H1	23
		CDR-H2	24
		CDR-H3	25
	CDR-L1		27
	CDR-L2		28
	CDR-L3		29
		Completa (dominio variable)	26
	Completa (dominio variable)		30
TS151r		CDR-H1	31
		CDR-H2	32
		CDR-H3	33
	CDR-L1		35
	CDR-L2		36
	CDR-L3		37
		Completa (dominio variable)	34
	Completa (dominio variable)		38

Tabla 3

10 La generación de dichos anticuerpos se detalla a nivel del ejemplo 1. Estos 2 anticuerpos están dirigidos contra epítomos diferentes ya que TS151 reconoce CD151 tanto cuando está asociada a las integrinas como libre en la superficie de la célula (Chometon *et al.*, 2006, Exp. Cell Res. 312, 983-995), mientras que TS151r no reconoce los complejos CD151-integrinas (Serru *et al.*, 1999, Biochem. J. 340, 103-111 ; Geary *et al.*, 2001, Tissue Antigen 58, 141-153 ; Kazarov *et al.*, 2002, J. Cell Biol. 158, 1299-1309 ; Sterk *et al.*, 2002, J. Cell Sci. 115, 1161-1173). El epítomo reconocido por TS151r está localizado en el bucle EC2 y contiene los restos Q194, R195 y D196 (Kazarov *et al.*, 2002, J. Cell Biol. 158, 1299-1309). Este anticuerpo está dirigido, por lo tanto al menos en parte, contra el sitio de CD151 implicado en las interacciones contra las integrinas. El resto C192 también estará implicado en el reconocimiento de CD151 por TS151r (Kazarov *et al.*, 2002, J. Cell Biol. 158, 1299-1309). El epítomo del anticuerpo TS151, aunque sea diferente del de TS151r, no se ha determinado con precisión.

15 El tratamiento de queratinocitos humanos (línea epitelial HaCaT) con el anticuerpo TS151r provoca una pérdida del contacto célula-célula, una redistribución del citoesqueleto, una redistribución intracelular de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  y un aumento de la migración de las células sobre la laminina 1 (Chometon *et al.*, 2006, Exp. Cell Res. 312, 983-995).

20 Más particularmente, el anticuerpo utilizado preferido consiste en el anticuerpo TS151.

25 De manera preferida, la utilización de los anticuerpos anti-CD151 en el marco del tratamiento del cáncer se justifica muy particularmente en los cánceres que sobreexpresan este mismo receptor CD151.

30 Dichos cánceres consisten en cáncer de colon [Hashida *et al.*, Br. J. Cancer 89 (2003) :158-167], cáncer de pulmón, preferiblemente de pulmón de células no pequeñas [Tokuhara *et al.*, Clin. Cancer Res. 7 (2001) :4109-4114], cáncer de próstata [Ang *et al.*, Cancer Epidemiol. Biomarkers 13 (2004) :17] y cáncer de páncreas [Gesierich *et al.*, Clin. Cancer Res. 11 (2005) :2840-2852].

La presente solicitud reivindica, por lo tanto, la utilización de un anticuerpo tal como se ha descrito más arriba para el tratamiento del cáncer, consistiendo dicho cáncer preferiblemente en los cánceres de colon, de pulmón, de próstata o de páncreas.

5 La invención se refiere igualmente a una composición farmacéutica que comprende como principio activo un compuesto que consiste en un anticuerpo, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, al que se añade preferiblemente un excipiente y/o un vehículo aceptable farmacéuticamente.

Más particularmente, la invención pretende la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica que comprende, además, al menos un vehículo aceptable farmacéuticamente

10 En la presente descripción, se entiende designar por vehículo aceptable farmacéuticamente, un compuesto o una combinación de compuestos que forma parte de una composición farmacéutica que no provocan reacciones secundarias y que permite por ejemplo la facilitación de la administración de o de los compuestos activos, el aumento de la duración de su vida y/o de su eficacia en el organismo, el aumento de su solubilidad en disolución o la mejora de su conservación. Estos vehículos aceptables farmacéuticamente son muy conocidos y serán adaptados por el experto en la técnica en función de la naturaleza y del modo de administración de o de los compuestos activos elegidos.

15 Preferentemente, estos compuestos se administrarán por vía sistémica, en particular por vía intravenosa, por vía intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea, o por vía oral. De manera más preferida, la composición que comprende los anticuerpos según la invención, se administrará en varias tomas, de manera escalonada en el tiempo.

Sus modos de administración, posologías y formas galénicas óptimas pueden determinarse según los criterios que se tienen generalmente en cuenta en el establecimiento de un tratamiento adaptado a un paciente como por ejemplo la edad o el peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios constatados.

20 Según la solicitud, se describe una composición para el tratamiento del cáncer, caracterizada porque comprende como principio activo al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de unirse a la proteína CD151.

Según la solicitud, se describe una composición para el tratamiento del cáncer, caracterizada porque comprende como principio activo al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de unirse a la proteína CD151 y/o de inhibir su actividad promotora de metástasis.

30 Según la solicitud, se describe igualmente una composición para el tratamiento del cáncer, caracterizada porque comprende como principio activo al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de inhibir el desarrollo de tumores primarios.

35 Según otro aspecto de la invención, se describe una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, siendo dicho al menos un anticuerpo un anticuerpo monoclonal seleccionado entre los anticuerpos TS151 o TS151r.

Según un aspecto más de la invención, se reivindica una composición que comprende una combinación de los anticuerpos TS151 y TS151r, o de sus fragmentos funcionales.

40 Se deduce de la bibliografía que la proteína CD151 está sobreexpresada en los cánceres y, muy particularmente, en los carcinomas de colon [Hashida *et al.*, *Br. J. Cancer* 89 (2003): 158-167], los cánceres de pulmón de células no pequeñas [Tokuhara *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001): 4109-4114], los cánceres de próstata [Ang *et al.*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers* 13 (2004): 1717-1721] y los cánceres de páncreas [Gesierich *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005): 2840-2852].

45 Evidentemente, la lista anterior se proporciona sólo a título ilustrativo y debe comprenderse que cualquier cáncer sobreexpresa la proteína CD151 y, por lo tanto, es susceptible de tratarse según la presente invención.

Otra forma de ejecución complementaria de la invención consiste en una composición tal como se ha descrito más arriba que comprende, además, como producto de combinación para una utilización simultánea, separada o escalonada en el tiempo, un agente citotóxico/citostático y/o un anticuerpo monoclonal.

50 La presente invención se refiere, por lo tanto, igualmente a una composición tal como se ha descrito más arriba, caracterizada porque comprende, además, como producto de combinación para una utilización simultánea, separada o escalonada en el tiempo, al menos un agente citotóxico/citostático y/o una toxina celular y/o un radioelemento y/o un anticuerpo monoclonal.

Se entiende por "utilización simultánea", la administración de los dos compuestos de la composición según la invención comprendidos en una sola y misma forma farmacéutica.

55 Se entiende por "utilización separada", la administración, al mismo tiempo, de los dos compuestos de la composición según la invención, comprendidos en formas farmacéuticas distintas.

Se entiende por "utilización escalonada en el tiempo", la administración sucesiva de los dos compuestos de la composición según la invención, comprendido cada uno en una forma farmacéutica distinta.

60 De una forma general, la composición según la invención aumenta considerablemente la eficacia del tratamiento del cáncer. En otros términos, el efecto terapéutico del anticuerpo según la invención se potencia de manera inesperada por la administración de un agente citotóxico. Otra ventaja subsecuente principal producida por una composición según la invención, se refiere a la posibilidad de utilizar dosis eficaces del principio activo más bajas, lo que permite evitar o reducir los riesgos de aparición de efectos secundarios, en particular el efecto del agente citotóxico. Además, esta composición según la invención permitirá alcanzar el efecto terapéutico que se espera más rápidamente.

65 Por « agentes terapéuticos anti-cáncer » o « agentes citotóxicos », se entiende una sustancia que, cuando se administra a un paciente, trata o previene el desarrollo del cáncer en el paciente. A título de ejemplo no

limitativo para dichos agentes, pueden mencionarse los agentes « alquilantes », los antimetabolitos, los antibióticos anti-tumorales, los inhibidores mitóticos, los inhibidores de la función cromatina, los agentes anti-angiogénesis, los anti-estrógenos, los anti-andrógenos o los inmunomoduladores.

5 Dichos agentes se citan, por ejemplo, en el VIDAL, en la página dedicada a los compuestos unidos a la cancerología y la hematología columna « Citotóxicos », estos compuestos citotóxicos citados por referencia a este documento se citan aquí como agentes citotóxicos preferidos.

10 Los « agentes alquilantes » hacen referencia a cualquier sustancia que puede acoplarse de manera covalente o alquilar cualquier molécula, preferentemente un ácido nucleico (ej.: ADN), en una célula. Como ejemplos de dichos agentes alquilantes, se pueden citar las mostazas de nitrógeno como mecloretamina, clorambucilo, melfalan, hidroclicloruro, pipobroman, prednimustina, fosfato disódico o estramustina; oxazafosforinas como ciclofosfamida, altretamina, trofosfamida, sulfosofamida o ifosfamida; aziridinas o etilen-iminas como tiotepa, trietilenamina o altetramina; nitrosoureas como carmustina, estreptozocina, fotemustina o lomustina; sulfonatos de alquilo como busulfan, treosulfan o improsulfan; triacenos como dacarbazina; o los complejos de platino como cisplatino, oxaliplatino o carboplatino.

15 Los « antimetabolitos » hacen referencia a sustancias que bloquean el crecimiento y/o el metabolismo celular interfiriendo con determinadas actividades, generalmente la síntesis de ADN. A título de ejemplo de antimetabolito, se puede mencionar metotrexato, 5-fluorouracilo, floxuridina, 5-fluorodesoxiuridina, capecitabina, citarabina, fludarabina, citosina arabinósido, 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG), clordesoxiadenosina, 5-azacitidina, gemcitabina, cladribina, deoxicofuridina y pentostatina.

20 Los « antibióticos anti-tumorales » hacen referencia a los compuestos que pueden prevenir o inhibir la síntesis de ADN, de ARN y/o de proteínas. Los ejemplos de dichos antibióticos anti-tumorales comprenden doxorubicina, daunorubicina, idarrubicina valrubicina, mitoxantrona, dactinomicina, mitramicina, plicamicina, mitomicina C, bleomicina y procarbazona.

25 Los « inhibidores mitóticos » previenen la progresión normal del ciclo celular y de la mitosis. En general, los inhibidores de los microtúbulos o « taxoides » como paclitaxel y docetaxel son capaces de inhibir la mitosis. Los alcaloides de vinca, como vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina son igualmente capaces de inhibir la mitosis.

30 Los « inhibidores de función cromatina » o « inhibidores de topo-isomerasas » hacen referencia a sustancias que inhiben la función normal de las proteínas que modelan la cromatina como las topo-isomerasas I y II. Los ejemplos de dichos inhibidores comprenden, para la topo-isomerasa I, camptotecina así como sus derivados como irinotecan o topotecan y, para la topo-isomerasa II, etopósido, fosfato de etipósido y tenipósido.

35 Los « agentes anti-angiogénesis » hacen referencia a cualquier fármaco, compuesto, sustancia o agente que inhibe el crecimiento de los vasos sanguíneos. Los ejemplos de agentes anti-angiogénesis comprenden, sin ninguna limitación, razoxin, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS-27023A, halofuginona, COL-3, neovastat, BMS-275291, talidomida, CDC 501, DMXAA, L-651582, escualamina, endostatina, SU5416, SU6668, interferón-alfa, EMD121974, interleuquina-12, IM862, angiostatina y vitaxina.

40 Los « anti-estrógenos » o « agentes anti-estrogénicos » hacen referencia a cualquier sustancia que disminuye, antagoniza o inhibe la acción de los estrógenos. Los ejemplos de dichos agentes son tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, anastrozol, letrozol y exemestano.

Los « anti-andrógenos » o « agentes anti-andrógeno » hacen referencia a cualquier sustancia que reduce, antagoniza o inhibe la acción de un andrógeno. Los ejemplos de anti-andrógenos son flutamida, nilutamida, bicalutamida, esprironolactona, acetato de ciproterona, finasteride y cimitidina.

45 Los inmunomoduladores son sustancias que estimulan el sistema inmunitario. Los ejemplos de dichos inmunomoduladores comprenden interferones, interleuquinas como aldesleuquina, OCT-43, denileuquin diflitox o interleuquina-2, factores de necrosis tumoral como tasonermina u otros tipos de inmunomoduladores como lentinan, esizofiran, roquinimex, pidotimod, pegademasa, timopentina, poli I:C, o levamisol en combinación con 5-fluorouracilo.

50 Para más detalles, el experto en la técnica podrá remitirse al manual editado por la Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique titulado « traité de chimie thérapeutique, Vol. 6, Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, edición TEC & DOC, 2003 ».

55 Los anticuerpos monoclonales preferidos se eligen entre los anticuerpos capaces de inhibir específicamente la actividad tirosina quinasa de los receptores IGF-IR, EGFR, HER2/neu, cMET, VEGFR, VEGF, etc., (o cualquier otro anticuerpo anti-tumoral conocido por el experto en la técnica), aislados, o sus fragmentos funcionales y compuestos derivados, capaces de inhibir la actividad proliferativa y/o anti-apoptótica y/o angiogénica y/o inductora de diseminación metastásica promovidas por dichos receptores.

En un modo de realización particularmente preferido, dicha composición como producto de combinación según la invención se caracteriza porque dicho agente citotóxico está acoplado químicamente a dicho anticuerpo para una utilización simultánea.

60 En un modo de realización particularmente preferido, dicha composición según la invención se caracteriza porque dicho agente citotóxico/citostático se elige entre los agentes inhibidores o estabilizadores del huso, preferentemente vinoerlbina y/o vinflunina y/o vincristina.

65 Con el fin de facilitar el acoplamiento entre dicho agente citotóxico y dicho anticuerpo según la invención, se podrán introducir principalmente moléculas espaciadoras entre los dos compuestos a acoplar, tales como poli(alquilenos)glicoles como polietilenglicol o aminoácidos o, en otro modo de realización, utilizar derivados activos de dichos agentes citotóxicos en los que se introducirán funciones capaces de reaccionar con dicho anticuerpo según la invención. Estas técnicas de acoplamiento son muy conocidas por el experto en la técnica y no se desarrollarán en la presente descripción.

La invención se refiere, bajo otro aspecto, a una composición caracterizada porque uno, al menos, de dichos anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, está conjugado con una toxina celular y/o un radioelemento

Preferentemente, dicha toxina o dicho radioelemento es capaz de impedir el crecimiento o la proliferación de la célula tumoral, principalmente de inactivar totalmente dicha célula tumoral.

Preferentemente, dicha toxina es una toxina de enterobacterias, principalmente la exotoxina A de *Pseudomonas*.

Los radioelementos (o radio-isótopos) conjugados preferentemente con el anticuerpo empleados en terapia son radio-isótopos que emiten rayos gamma y preferentemente yodo<sup>131</sup>, itrio<sup>90</sup>, oro<sup>199</sup>, paladio<sup>100</sup>, cobre<sup>67</sup>, bismuto<sup>217</sup> y antimonio<sup>211</sup>. Los radio-isótopos que emiten rayos beta y alfa pueden utilizarse igualmente en terapia.

Por toxina o radioelemento conjugado al menos a un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según la invención, se entiende designar cualquier medio que permita unir dicha toxina o dicho radioelemento a dicho al menos un anticuerpo, principalmente por acoplamiento covalente entre los dos compuestos, con o sin la introducción de molécula de unión.

Entre los agentes que permiten una unión química (covalente), electrostática o no covalente de todo o parte de los elementos del conjugado, puede mencionarse muy particularmente benzoquinona, carbodiimida y más particularmente EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-[3-dimetil-aminopropil]-carbodiimida), dimaleimida, ácido ditiobis-nitrobenzoico (DTNB), tio-acetato de N-succinimidil S-acetilo (SATA), los agentes denominados de « bridging » que presentan uno o varios grupos, que tienen uno o varios grupos fenilásido, que reaccionan con los ultravioletas (U.V.) y muy preferentemente N-[4-(azidosalicilamino)butil]-3'-(2'-piridilditio)propionamida (APDP), 3-(2'-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) y 6-hidrazino-nicotinamida (HYNIC).

Otra forma de acoplamiento, muy especialmente para los radioelementos, puede consistir en la utilización de un quelante de iones bifuncional.

Entre estos quelantes, es posible mencionar los quelatos derivados de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o de DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético) que han sido desarrollados para unir metales, particularmente metales radiactivos e inmunoglobulinas. Así, el DTPA y sus derivados pueden sustituirse con diferentes grupos en la cadena de carbonos con el fin de aumentar la estabilidad y la rigidez del complejo ligando-metal (Krejcarek et al. (1977); Brechbiel et al. (1991); Gansow (1991); patente EEUU 4 831 175).

Por ejemplo, el DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético) y sus derivados, que se han utilizado muy ampliamente en medicina y en biología durante mucho tiempo bien en su forma libre o bien en la forma de un complejo con un ión metálico, presenta la característica notable de formar quelatos estables con iones metálicos y acoplarse a proteínas de interés terapéutico o diagnóstico como anticuerpos para el desarrollo de radio-inmunoconjugados en la terapia del cáncer (Meases et al., (1984); Gansow et al. (1990)).

La presente invención comprende además la utilización de la composición según la invención para la preparación de un medicamento.

La presente solicitud pretende, por lo tanto, más particularmente la utilización de una composición tal como se ha descrito más arriba para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer. Entre los cánceres que pueden prevenirse y/o tratarse, se prefiere el cáncer de colon, de pulmón, de próstata o de páncreas.

Además, según un aspecto particularmente innovador y ventajoso, la presente invención pretende la utilización de una composición tal como se ha descrito más arriba para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los tumores primarios.

La invención tiene igualmente por objeto la utilización de un anticuerpo según la invención, para la preparación de un medicamento destinado a la selección específica como diana de un compuesto activo biológicamente frente a las células que expresan o sobreexpresan el receptor CD151.

Se entiende designar aquí por compuesto activo biológicamente cualquier compuesto capaz de modular, principalmente inhibir, la actividad celular, en particular su crecimiento, su proliferación, la transcripción o la traducción de genes.

Otras características y ventajas de la invención aparecerán en lo que sigue de la descripción con los ejemplos y las figuras cuyas leyendas se representan a continuación.

## LEYENDAS DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra las secuencias nucleotídicas y proteicas de la proteína CD151, secuencias sobre las cuales se resaltan los bucles EC1 y EC2.

La figura 2 es un esquema que ilustra la estructura de las tetraspaninas de las que forma parte la proteína CD151, y muy particularmente los dos bucles extracelulares EC1 y EC2.

La figura 3 representa la comparación PBS / anticuerpo control en el modelo ortotópico A549.

La figura 4 representa la evaluación de la actividad antitumoral del anticuerpo TS151 *in vivo* en el modelo ortotópico. Se injertan ratones inmunodeprimidos (n=10) por vía intrapleural con 1.10<sup>6</sup> células A549. Siete días después del injerto, los ratones se tratan por vía intraperitoneal con una dosis de inducción de 500 µg de anticuerpo TS151 seguido de un tratamiento, dos veces a la semana, durante 5 semanas, con una dosis de 250 µg de anticuerpo por ratón. Se inyecta al lote testigo PBS según el mismo esquema de administración.

La figura 5 ilustra la expresión de la molécula CD151 en pacientes que padecen cáncer de próstata. Cada letra corresponde al estudio de un paciente y para cada paciente el panel superior corresponde al tejido normal adyacente al tumor y el panel inferior corresponde al tejido tumoral.

La figura 6 ilustra la expresión de la molécula CD151 en pacientes que padecen cáncer de pulmón. Cada letra corresponde al estudio de un paciente y para cada paciente el panel superior corresponde al tejido normal adyacente al tumor y el panel inferior corresponde al tejido tumoral.

La figura 7 ilustra la actividad *in vivo* de los anticuerpos TS151 y TS151R en el modelo de xenoinjerto PC3. Se injertaron ratones Swiss Nude (n=6) por vía subcutánea con células PC3. Cinco días después del injerto de las células, los ratones reciben, por vía i.p., una dosis de inducción de 2 mg/ratón de los anticuerpos a ensayar seguido de dos administraciones a la semana de una dosis de 1 mg/ratón de estos anticuerpos. El volumen tumoral se evalúa por la fórmula  $\pi/6 \times \text{Longitud} \times \text{ancho} \times \text{espesor}$  y se efectúa un ensayo de Mann y Whitney para la evaluación estadística de los resultados.

La figura 8 ilustra la evaluación de la especificidad de los anticuerpos TS151 y TS151r para la forma humana de CD151 por transferencia western.

La figura 9 ilustra la inhibición de la adhesión de las células A549 sobre la laminina 5. A/ Inhibición de la adhesión celular por diferentes anticuerpos anti-integrinas. B/ Inhibición de la adhesión celular por una combinación TS151/anticuerpo anti-integrina  $\alpha 3$ .

### **Ejemplo 1 : Generación de los anticuerpos TS151r y TS151**

#### **Generación del anticuerpo TS151r**

Para generar el anticuerpo TS151r, se inmunizaron ratones BALB/c por vía intraperitoneal por medio de  $10^7$  células HeLa. Después de 3 inmunizaciones y una inyección de refuerzo final, las células del bazo de un ratón se fusionaron con células de mieloma P3X63AG8 por las técnicas clásicamente descritas por Kohler y Milstein ( $5 \cdot 10^7$  células de bazo /  $3 \cdot 10^7$  células de mieloma). Los sobrenadantes de los hibridomas resultantes de la fusión se cribaron para evaluar su capacidad de reconocimiento de las células HeLa por citometría de flujo, y su capacidad de inmunoprecipitar CD151 a partir de un lisado de células HeLa preparado en presencia del detergente Brij 97 y que conlleva la co-inmunoprecipitación de CD9. Se comprueba que el anticuerpo TS151r posee estas diferentes propiedades.

#### **Generación del anticuerpo TS151**

Para generar el anticuerpo TS151, se inmunizaron ratones BALB/c por vía intraperitoneal por medio de  $10^7$  células Jurkat y  $10^7$  HEL (2 inmunizaciones). Después de una inyección de refuerzo final por medio de complejos proteicos que contienen la proteína ADAM10 obtenidos a partir de lisados de células Jurkat y HEL, las células del bazo se fusionaron con células de mieloma P3X63AG8 por las técnicas clásicamente descritas por Kohler y Milstein ( $5 \cdot 10^7$  células de bazo /  $3 \cdot 10^7$  células de mieloma). Los sobrenadantes de los hibridomas resultantes de la fusión se criban en primer lugar para evaluar su capacidad de reconocimiento de las células Jurkat y HEL por citometría de flujo. El anticuerpo TS151 se seleccionó tomando como base su capacidad de inmunoprecipitar CD151 a partir de un lisado celular preparado en presencia del detergente Brij 97 y que conlleva la co-inmunoprecipitación de otras tetraspaninas.

### **Ejemplo 2 : Evaluación *in vivo* de la actividad anti-tumoral de los anticuerpos TS151 y TS151r en un modelo ortotópico A549**

#### **Material y Método**

Después de verificar la expresión de la proteína CD151 (datos no mostrados), las células A549 originarias de la ATCC se cultivan rutinariamente en medio F12K, 10 mM de glutamina, 10% de SVF. Estas células se dividen 2 días antes del injerto con el fin de que estén en la fase exponencial de crecimiento. Para el injerto, se anestesian ratones inmunodeprimidos de 7 semanas antes de recibir  $1 \cdot 10^6$  células A549 por vía intrapleural. El tumor primario se desarrolla rápidamente e invade en 4 días las estructuras adyacentes al sitio de inyección incluyendo el mediastino, los pulmones y el diafragma. Para mimetizar mejor la enfermedad, el inicio del tratamiento no comienza hasta 7 días después del implante de las células, por vía intraperitoneal. Después de inyectar una dosis de inducción de 500  $\mu\text{g/ratón}$ , se administra el anticuerpo TS151 purificado 2 veces a la semana, durante 5 semanas, a la dosis de 250  $\mu\text{g/ratón}$ . Un grupo de ratones que recibe PBS se introduce como control habida cuenta de que los experimentos efectuados anteriormente han mostrado que la administración de un isotipo control IgG1 no tenía ningún impacto sobre la supervivencia de los animales.

La figura 3, obtenida a partir de datos preliminares, demuestra la especificidad de la actividad observada con el anticuerpo anti-CD151. En efecto, el tratamiento de los animales con una IgG1 murina (mIgG1) utilizada como isotipo control muestra que esta última no tiene ningún impacto sobre la supervivencia de los animales inyectados con el PBS utilizado como vehículo de estos anticuerpos.

El parámetro de evaluación de este modelo es la supervivencia de los animales y la actividad anti-tumoral se expresa por el cálculo de  $T/C\% = \text{mediana de supervivencia de los animales tratados} / \text{mediana de supervivencia de los animales del grupo control} \times 100$ . Se estableció que un T/C% superior o igual a 125 % significa una actividad del producto.

#### **Resultados**

La Figura 4 muestra una actividad antitumoral del anticuerpo TS151 con un T/C% calculado de 140%

### **Ejemplo 3 : Comparación de la actividad anti-tumoral *in vivo* de los anticuerpos TS151 y 50-6 en un modelo ortotópico A549**

#### **Material y Método**

El protocolo aplicado es idéntico al del ejemplo 2 anterior.

#### Resultados

Los datos obtenidos ponen claramente de manifiesto que el anticuerpo TS151 presenta una actividad anti-tumoral claramente superior a la mostrada por el anticuerpo 50-6 que no presenta, en cuanto a él, más que un T/C% de 118, es decir, inferior al valor umbral de 125% (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos, a saber el T/C% calculado como se ha definido más arriba, se representan en la tabla 4 siguiente.

T/C%	Anticuerpo TS151	Anticuerpo 50-6
	140	118

Tabla 4

#### **Ejemplo 4 : Estudio de la expresión de la molécula CD151**

La expresión de la proteína CD151 se investigó por inmunohistoquímica en muestras de tejidos humanos procedentes de pacientes que padecen cánceres de próstata o cáncer de pulmón. En estos pacientes estaban disponibles láminas de tejidos normales adyacentes al tumor y por lo tanto se incluyeron para calibrar el nivel de expresión en los tejidos tumorales frente a los normales.

Para estos experimentos, se utilizan láminas de tipo « Tissue array » comerciales. Después de la desparafinización, se efectuó un desenmascaramiento antigénico a 30°C por medio de una disolución enzimática que contiene pepsina (Labvision ref. AP-9007-005). Esta etapa fue seguida por una etapa de eliminación de las peroxidases endógenas por incubación de los cortes en una disolución de peróxido de hidrógeno (Sigma) al 0,3% en agua. Se efectuó una saturación de los sitios no específicos con una disolución de Ultra-V-Block (Labvision, ref. TA-125-UB) y el marcaje se efectuó mediante un anticuerpo murino anti-CD151 comercial (Serotech, Ref. MCA 1856) utilizado a una concentración final de 5 µg/ml. Un anticuerpo isotipo control IgG1 murino (DakoCytomation, Ref. X0931) se utiliza como control negativo del experimento. El revelado del marcaje se hace con el sistema de revelado Envision Dual Link (DakoCytomation, Ref. K4061) y la referencia de DAB, sustrato de las peroxidases es S3309 de DakoCytomation.

Los resultados presentados en la figura 5 muestran que varios pacientes que desarrollan tumores de próstata presentan una sobreexpresión de la molécula CD151. Esta sobreexpresión puede ser muy significativa para el 20% de los pacientes estudiados (pacientes A y C) o moderada (pacientes A y D). Debe indicarse que, excepto a nivel de las células endoteliales, los tejidos normales prostáticos correspondientes no expresan o expresan poco CD151 y que, en caso de expresión, ésta parece estar limitada a las estructuras de tipo glandular. El paciente E presenta un ejemplo de tumor que no expresa CD151.

En el caso del cáncer de pulmón (Figura 6), se observa una expresión moderada (paciente A) a fuerte (paciente B) a nivel de determinadas células del tejido pulmonar normal. Sin embargo, el tejido tumoral presenta una densidad muy grande de células fuertemente marcadas (pacientes A y B). El paciente C presenta un ejemplo de tumor que no expresa CD151.

#### **Ejemplo 5 : Efecto de los anticuerpos TS151 y TS151R sobre el crecimiento *in vivo* del tumor PC3 implantado por vía subcutánea en el ratón Nude.**

Dados los resultados obtenidos en inmunohistoquímica sobre los « tissue array » de próstata, se consideró una evaluación de los anticuerpos anti-CD151 sobre un xenoinjerto de tumor PC3. La línea PC3 es una línea prostática independiente de andrógenos originaria de la ATCC y cultivada en medio F12K+10% SVF+L-Glutamina. Para la evaluación, se implantan 5.10<sup>6</sup> células PC3 en el flanco derecho de ratones Swiss Nude. Cinco días después del implante, los animales se aleatorizan sobre la base del volumen tumoral y se reparten en 3 grupos comparables. El volumen tumoral del lote de animales injertados seleccionado está comprendido entre 41 y 47 mm<sup>3</sup> (volumen calculado con la fórmula  $\pi/6 \times \text{Longitud} \times \text{ancho} \times \text{espesor}$ ) en el día 0 del tratamiento. Los animales reciben los anticuerpos purificados a ensayar o PBS. Las dosis de anticuerpo y la frecuencia de las inyecciones son las siguientes : dosis de inducción 2 mg/dosis de anticuerpo ; dosis de mantenimiento 1 mg/dosis 2 veces a la semana.

Los resultados presentados en la figura 7 muestran que los dos anticuerpos ensayados (TS151 y TS151R) se comportan de forma comparable e inhiben muy significativamente el crecimiento del tumor PC3 implantado en posición subcutánea en el ratón Swiss Nude. La tabla 5 siguiente resume los análisis estadísticos de estos resultados.

		J0	J3	J7	J10	J14	J17	J20	J24	J28	J31	J35
Control/TS151	Mann-Whitney (Wilcoxon)	p=0,132	p=0,937	p=0,065	p=0,589	p=0,002						
Control/TS151R	Mann-Whitney (Wilcoxon)	p=0,485	p=0,180	p=0,180	p=0,589	p=0,240	p=0,026	p=0,004	p=0,002	p=0,002	p=0,002	p=0,002

Tabla 5

Los estudios realizados en paralelo y presentados en la figura 8 muestran que los anticuerpos TS151 y TS151R reconocen específicamente la molécula CD151 humana sin ninguna reacción cruzada con el receptor

murino. Esta observación sugiere, por lo tanto, que la actividad observada en el modelo de xenoinjerto en el ratón nude no puede atribuirse más que a un efecto directo sobre el tejido humano injertado y excluye, consecuentemente, cualquier interferencia de los anticuerpos TS151 y TS151R con las células del estroma del tumor o las células endoteliales murinas. Por otra parte, TS151 y TS151R son dos IgG1 murinas y debido a ello y como conoce el experto en la técnica, es poco probable que la actividad observada esté ligada a las funciones efectoras de tipo ADCC y CDC que están mediadas muy particularmente por los anticuerpos de tipo IgG2a murino en el ratón.

El conjunto de estos resultados está de acuerdo, por lo tanto, con un mecanismo de acción directamente ligado a la inhibición de la proliferación celular tumoral *in vivo* por los anticuerpos TS151 y TS151R.

#### **Ejemplo 6 : Especificidad de los anticuerpos TS151 y TS151r**

La especificidad de los anticuerpos TS151 y TS151r se evaluó por transferencia western. Se depositaron lisados de tejidos humanos y murinos de pulmón, páncreas y colon (Biochain, 10 µg de proteínas totales), así como cantidades crecientes de lisado celular de HT-29 (10, 20 y 50 µg de proteínas totales) en un gel de acrilamida 4-12 % (BioRad). Después de la electroforesis (condiciones no reductoras), las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se transferencia se incubaron con los anticuerpos TS151 y TS151r purificados y después con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Ig de ratón acoplado a la peroxidasa (GE Healthcare) antes de revelado de tipo ECL.

Los anticuerpos TS151 y TS151r presentan una especificidad para la forma humana de CD151 como demuestra el reconocimiento por transferencia western de CD151 en los lisados de células HT-29 y de diferentes tejidos de origen humano (figura 8). La ausencia de reactividad con la CD151 murina en los lisados de diferentes tejidos extraídos del ratón confirma la especificidad de los anticuerpos TS151 y TS151r para la forma humana de CD151.

#### **Ejemplo 7 : Inhibición de la adhesión celular**

Los experimentos de adhesión de células tumorales sobre la laminina 5, ligando de las integrinas  $\alpha 3\beta 1$  y  $\alpha 6\beta 4$  con las que puede asociarse CD151, se realizan en placas de 96 pocillos. Después de inmovilización de la laminina 5 (Chemicon, 200 µl a 1 µg/ml) durante 1 hora a 37°C, los pocillos se saturan con BSA a 2 mg/ml (200 µl, 1 h a 37°C). Las células A549 en suspensión se marcan con diacetato de 5-clorometilfluoresceína (CMFDA, Invitrogen) y se añaden a razón de 100.000 células (100 µl) por pocillo en presencia o ausencia de anticuerpo (100 µl). Después de incubar a 37°C durante 15, 30 ó 60 minutos, las células que no se hayan adherido se eliminan. Después de leer la quimioluminiscencia con un luminómetro (Mithras, Berthold), se determina el porcentaje de células que se han adherido mediante una gama de células marcadas con CMFDA. El anticuerpo anti-CD151 TS151 y los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 3$  P1B5, anti- $\alpha 6$  NKI-Go3 y anti- $\beta 4$  ASC-3 (Chemicon) se evalúan a la concentración final de 20 µg/ml. El anticuerpo 9G4, dirigido contra una proteína de la membrana de *Escherichia coli*, se utiliza como control isotópico.

El anticuerpo anti-integrina  $\alpha 3$  P1B5 inhibe la adhesión de las células A549 sobre la laminina 5 (Figura 9A), mientras que los anticuerpos anti-integrina  $\alpha 6$  NKI-Go3 y anti-integrina  $\beta 4$  ASC-3 no inhiben la adhesión de las células A549 sobre este mismo ligando. Se constata, sin embargo, una pérdida de inhibición en función del tiempo. La inhibición inducida por P1B5 es en efecto superior a 90% a 15 min, pero cae a aproximadamente 20% después de 1 h. La asociación del anticuerpo P1B5 con el anticuerpo anti-integrina  $\alpha 6$  NKI-Go3 o el anticuerpo anti-integrina  $\beta 4$  ASC-3 permite mantener una fuerte inhibición de adhesión después de 1 h : ésta es superior a 90% para la asociación con el anticuerpo anti- $\alpha 6$ , y de aproximadamente 70% para la combinación con el anticuerpo anti- $\beta 4$ . Estos resultados demuestran que las células A549 se adhieren sobre la laminina 5 en primer lugar por medio de la integrina  $\alpha 3\beta 1$  y en segundo lugar por medio de la integrina  $\alpha 6\beta 4$ .

El anticuerpo anti-CD151 TS151 no inhibe la adhesión de las células A549 sobre la laminina 5 cuando se utiliza solo (Figura 9B). El efecto de una combinación de TS151 con P1B5 sobre la adhesión de las células A549 se evaluó y comparó con las combinaciones mencionadas anteriormente. Esta combinación TS151/P1B5 proporciona un resultado comparable a la asociación del anticuerpo anti- $\alpha 6$ /anti- $\alpha 3$  y anti- $\beta 4$ /anti- $\alpha 3$ . Se observa en efecto un mantenimiento de la inhibición de adhesión, del orden de 80% después de 1 h. El anticuerpo TS151 será, por lo tanto, capaz de inhibir la adhesión de las células A549 por medio de un efecto antagonista sobre la integrina  $\alpha 6\beta 4$ .

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Pierre Fabre Médicament

<120> Utilización de un anticuerpo anti-CD151 para el tratamiento del cáncer

10 <130> cas 640

<150> FR 06/09135

<151> 2006-10-18

15 <160> 38

<170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1

<211> 759

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

25	atgggtgagt	tcaacgagaa	gaagacaaca	tgtggcaccg	tttgccctcaa	gtacctgctg	60
	tttacctaca	attgctgctt	ctggctggct	ggcctggctg	tcatggcagt	gggcatctgg	120
	acgctggccc	tcaagagtga	ctacatcagc	ctgctggcct	caggcaccta	cctggccaca	180
	gcctacatcc	tgggtgggtggc	gggcaactgtc	gtcatggtga	ctgggggtctt	gggctgctgc	240
	gccaccttca	aggagcgtcg	gaacctgctg	cgctgtact	tcatcctgct	cctcatcatc	300
	tttctgctgg	agatcatcgc	tggatctctc	gcctacgcct	actaccagca	gctgaacacg	360
30	gagctcaagg	agaacctgaa	ggacaccatg	accaagcgt	accaccagcc	gggccatgag	420
	gctgtgacca	gcgctgtgga	ccagctgcag	caggagtcc	actgctgtgg	cagcaacaac	480
	tcacaggact	ggcgagacag	tgagtggatc	cgctcacagg	aggccggtgg	ccgtgtggtc	540
	ccagacagct	gctgcaagac	gggtgggtggct	ctttgtgggc	agcgagacca	tgctccaac	600
	atctacaagg	tggagggcgg	ctgcatcacc	aagttggaga	ccttcatcca	ggagcacctg	660
35	aggggtcattg	gggctgtggg	gatcggcatt	gcctgtgtgc	aggtctttgg	catgatcttc	720
	acgtgctgcc	tgtacaggag	tctcaagctg	gagcactac			759

40 <210> 2

<211> 253

<212> PRT

<213> homo sapiens

45 <400> 2

50	Met Gly Glu Phe Asn Glu Lys Lys Thr Thr Cys Gly Thr Val Cys Leu	
	1 5 10 15	
	Lys Tyr Leu Leu Phe Thr Tyr Asn Cys Cys Phe Trp Leu Ala Gly Leu	
	20 25 30	
50	Ala Val Met Ala Val Gly Ile Trp Thr Leu Ala Leu Lys Ser Asp Tyr	
	35 40 45	
	Ile Ser Leu Leu Ala Ser Gly Thr Tyr Leu Ala Thr Ala Tyr Ile Leu	
	50 55 60	
55	Val Val Ala Gly Thr Val Val Met Val Thr Gly Val Leu Gly Cys Cys	
	65 70 75 80	
	Ala Thr Phe Lys Glu Arg Arg Asn Leu Leu Arg Leu Tyr Phe Ile Leu	
	85 90 95	
	Leu Leu Ile Ile Phe Leu Leu Glu Ile Ile Ala Gly Ile Leu Ala Tyr	
	100 105 110	
60	Ala Tyr Tyr Gln Gln Leu Asn Thr Glu Leu Lys Glu Asn Leu Lys Asp	
	115 120 125	
	Thr Met Thr Lys Arg Tyr His Gln Pro Gly His Glu Ala Val Thr Ser	
	130 135 140	
	Ala Val Asp Gln Leu Gln Gln Glu Phe His Cys Cys Gly Ser Asn Asn	



ES 2 361 696 T3

<213> homo sapiens  
 <400> 6

5 Trp Thr Leu Ala Leu Lys Ser Asp Tyr Ile Ser Leu Leu Ala Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Tyr

10  
 <210> 7  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

15  
 <400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser  
 1 5

20  
 <210> 8  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

25  
 <400> 8

Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro  
 1 5

30  
 <210> 9  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

35  
 <400> 9

40 Ala Arg Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Tyr Gly Met Glu Tyr  
 1 5 10

45  
 <210> 10  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

50  
 <400> 10

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

ES 2 361 696 T3

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

5 <210> 11  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

10 <400> 11

Gln Ser Val Ser Thr Ser Thr Phe Ser Tyr  
 1 5 10

15 <210> 12  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

20 <400> 12

Ser Ala Ser  
 1

25 <210> 13  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 30 <213> mus musculus

<400> 13

35 Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 14  
 <211> 111  
 40 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 14

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

60 <210> 15  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

ES 2 361 696 T3

<400> 15  
 5 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Trp  
 1 5

<210> 16  
 <211> 8  
 10 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 16  
 15 Ile His Pro Asn Ser Gly Asn Thr  
 1 5

<210> 17  
 20 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 17  
 25 Ala Arg Gly Asp Asp Ala Tyr Tyr Ser Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10 15

<210> 18  
 30 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 18  
 40 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Val Val Val Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser  
 20 25 30  
 Trp Met His Trp Ala Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Gln Ile His Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 45 Lys Val Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Val Asp Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gly Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 50 Ala Arg Gly Asp Asp Ala Tyr Tyr Ser Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 19  
 55 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 19  
 60 Gln Ser Val Ser Thr Ser Arg Tyr Ser Tyr  
 1 5 10

ES 2 361 696 T3

<210> 20  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 5 <213> mus musculus  
  
 <400> 20  
  
 Tyr Ala Ser  
 10 1  
  
 <210> 21  
 <211> 9  
 15 <212> PRT  
 <213> mus musculus  
  
 <400> 21  
  
 20 Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr  
 1 5  
  
 <210> 22  
 <211> 111  
 25 <212> PRT  
 <213> mus musculus  
  
 <400> 22  
 30 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 35 Arg Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Ile Gln Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 50 55 60  
 40 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 65 70 75 80  
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr His Cys Gln His Ser Trp  
 85 90 95  
 Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 45  
  
 <210> 23  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 50 <213> mus musculus  
  
 <400> 23  
 gggttataacct tcacagacta ttca 24  
  
 55  
 <210> 24  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus  
 60  
 <400> 24  
 ataaacactg agactggtga gccca 24

# ES 2 361 696 T3

```

<210> 25
<211> 39
<212> ADN
<213> mus musculus
5
<400> 25
gctagaaggg agtatggtaa ctactatggt atggagtac 39

10
<210> 26
<211> 360
<212> ADN
<213> mus musculus

15
<400> 26
cagatccagt tggatgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca gactattcaa tgcactgggt gaagcaggct 120
ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacactg agactgggtga gccaacatat 180
acagatgact tcaagggacg gtttgccctc tctttggaaa cctctgcaa cactgcctat 240
20
ttgctgatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgc tagaaggag 300
tatggtaact actatggtat ggagtactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcgtca 360

25
<210> 27
<211> 30
<212> ADN
<213> mus musculus

30
<400> 27
caaagtgtca gtacatctac ctttagttat 30

35
<210> 28
<211> 9
<212> ADN
<213> mus musculus

40
<400> 28
tctgcatcc 9

45
<210> 29
<211> 27
<212> ADN
<213> mus musculus

50
<400> 29
cagcacagtt gggagattcc gctcacg 27

55
<210> 30
<211> 333
<212> ADN
<213> mus musculus

60
<400> 30
gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60
atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctacct ttagttatat aactgggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaacctc ctcatcaagt ctgcatccaa cctagaatct 180
ggggtccttg ccagggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatccat 240
cctgtggagg aggaggatag tgcaacatat ttctgtcagc acagttggga gattccgctc 300
acgttcgggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa 333

```

# ES 2 361 696 T3

	<210> 31		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> mus musculus		
5	<400> 31		
	ggctacacct tcaccagctc ctgg		24
10	<210> 32		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> mus musculus		
15	<400> 32		
	attcatccta atagtggtaa tact		24
20	<210> 33		
	<211> 48		
	<212> ADN		
	<213> mus musculus		
25	<400> 33		
	gcaagagggg atgatgctta ctacagcggg ctctatgcta tggactac		48
30	<210> 34		
	<211> 369		
	<212> ADN		
	<213> mus musculus		
35	<400> 34		
	cagggtccaac tgcagcagcc tgggtctgtg gtgggtgaggc ctggagcttc agtgaaaactg		60
	tctctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctcctgga tgcactgggc gaagcagagg		120
	cctggacaag gccttgagtg gattggacag attcatccta atagtggtaa tactaattac		180
	aatgagaagt tcaaggtcaa ggccacactg actatagaca catcctccag cacagcctac		240
	gtggatctca acagcctgac atctggggac tctgcggtct attactgtgc aagaggggat		300
	gatgcttact acagcgggct ctatgctatg gactactggg gtcagggaac ctcagtcacc		360
40	gtctcctca		369
45	<210> 35		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> mus musculus		
50	<400> 35		
	caaagtgtca gtacatctag gtatagttat		30
55	<210> 36		
	<211> 9		
	<212> ADN		
	<213> mus musculus		
60	<400> 36		
	tatgcatcc		9
60	<210> 37		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> mus musculus		

# ES 2 361 696 T3

<400> 37  
caacacagtt gggagattcc gtacacg 27

5  
<210> 38  
<211> 333  
<212> ADN  
<213> mus musculus

10  
<400> 38  
gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60  
atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctaggt atagttatat gcaactggtac 120  
caacagatac aaggacagcc acccaactc ctcatcaagt atgcatccaa cctagaatct 180  
15 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240  
cctgtggagg aggaggatac tgcaacatat cactgtcaac acagttggga gattccgtac 300  
acgttcggag gggggaccac gctggaaata aaa 333

20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de al menos un anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de unirse a la proteína CD151 y de inhibir así el crecimiento tumoral para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los tumores primarios.
2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, es capaz de inhibir la proliferación de las células tumorales.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque dicho al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, es capaz de inhibir la actividad promotora de metástasis de dicha proteína CD151 en las células tumorales.
- 15 4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, es capaz de inhibir la migración celular de las células tumorales.
5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, es capaz de inhibir la adhesión celular de las células tumorales.
- 20 6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, consiste en un anticuerpo monoclonal.
7. Uso según la reivindicación 6, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende:
- 25 - las 3 CDRs de la cadena pesada CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 respectivamente de secuencias SEQ ID No.7, 8 y 9; y
- las 3 CDRs de la cadena ligera CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 respectivamente de secuencias SEQ ID No. 11, 12 y 13.
- 30 8. Uso según la reivindicación 7, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID No. 10 y una cadena ligera que comprende la secuencia SEQ ID No. 14.
9. Uso según la reivindicación 6, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende:
- 35 - las 3 CDRs de la cadena pesada CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 respectivamente de secuencias SEQ ID No. 15, 16 y 17; y
- las 3 CDRs de la cadena ligera CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 respectivamente de secuencias SEQ ID No.19, 20 y 21.
- 40 10. Uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID No. 18 y una cadena ligera que comprende la secuencia SEQ ID No.22.
- 45 11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dichos cánceres consisten en los cánceres de colon, de pulmón, de próstata o de páncreas.
12. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la preparación de una composición farmacéutica que comprende, además, al menos un vehículo aceptable farmacéuticamente.
- 50 13. Composición caracterizada porque comprende como principio activo al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de unirse a la proteína CD151 e inhibir el desarrollo de tumores primarios.
14. Composición según la reivindicación 13 para su utilización en el tratamiento de tumores primarios, caracterizada porque dichos anticuerpos anti-CD151 o uno de sus fragmentos funcionales, es un anticuerpo monoclonal seleccionado entre los anticuerpos:
- 55 - TS151 que comprende las 3 CDRs de la cadena pesada CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 respectivamente de secuencias SEQ ID No. SEQ ID No. 7, 8 y 9; y las 3 CDRs de la cadena ligera CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 respectivamente de secuencias SEQ ID No. 11, 12 y 13; o
- 60 - TS151r que comprende las 3 CDRs de la cadena pesada CDR-H1, CDR-H2 y CDRH3 respectivamente de secuencias SEQ ID No. 15, 16 y 17; y las 3 CDRs de la cadena ligera CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 respectivamente de secuencias SEQ ID No. 19, 20 y 21.
- 65 15. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14 para su utilización en el tratamiento de tumores primarios, caracterizada porque comprende, además, como producto de combinación para una uso simultáneo, separada o escalonada en el tiempo, al menos un agente citotóxico/citostático y/o una toxina celular y/o

un radioelemento y/o un anticuerpo monoclonal.

1/6

CD 151

## - Secuencia nucleotídica

atgggtgagt tcaacgagaa gaagacaaca tgtggcaccg tttgcctcaa gtacctgctg  
 tttacctaca attgctgctt ctggctggct ggcttgctg tcatggcagt gggcatctgg  
acgctggccc tcaagagtga ctacatcagc ctgctggcct caggcaccta cctggccaca  
*EC1*  
 gcctacatcc tgggtggggc gggcactgtc gtcattggtga ctggggcttt gggetgctgc  
 gccaccttca aggagcgtcg gaacctgctg cgctgtact tcatcctgct cctcatcctc  
 tttctgctgg agatcatcgc tggtatcctc gcctacgcct actaccagca gctgaacacg  
gagctcaagg agaacctgaa ggacaccatg accaagcgt accaccagcc gggccatgag  
gctgtgacca gcgctgtgga ccagctgcag caggagtcc actgctgtgg cagcaacaac  
*EC2*  
tcacaggact ggcgagacag tgagtggatc cgctcacagg aggccggtgg ccgtgtggtc  
ccagacagct gctgcaagac ggtgggtggct ctttgtgggc agcgagacca tgcctccaac  
atctacaagg tggagggcgg ctgcatcacc aagtggaga cttcatcca ggagcacctg  
agggtcattg gggctgtggg gatcggcatt gcctgtgtgc aggtctttgg catgatcttc  
 acgtgctgcc tgtacaggag tctcaagctg gagcactac

- Secuencia proteica (código 1 letra)

MGEFNEKKT CGTVCLKYLL FTYNCCFWLA GLAVMAVGIW TLALKSDYIS  
*EC1*  
LLASGTYLAT AYILVVAGTV VMVTGVLGCC ATKERRNLL RLYFILLII  
 FLLEIIAGIL AYAYYQQLNT ELKENLKDTM TKRYHQPGHE AVTSAVDQLQ  
QEFHCCGSNN SQDWRDSEWI RSQEAGGRVV PDSCKTVVA LCGQRDHASN  
*EC2*  
IYKVEGGCIT KLETFIQEHL RVIGAVGIGI ACVQVFGMIF TCCLYRSCLK  
 EHY

Figura 1



3/6

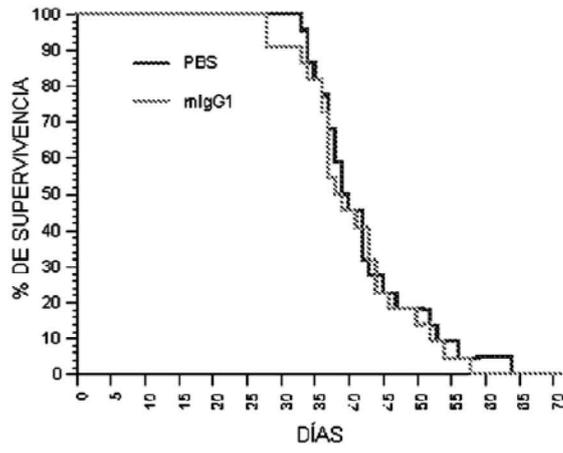


Figura 3

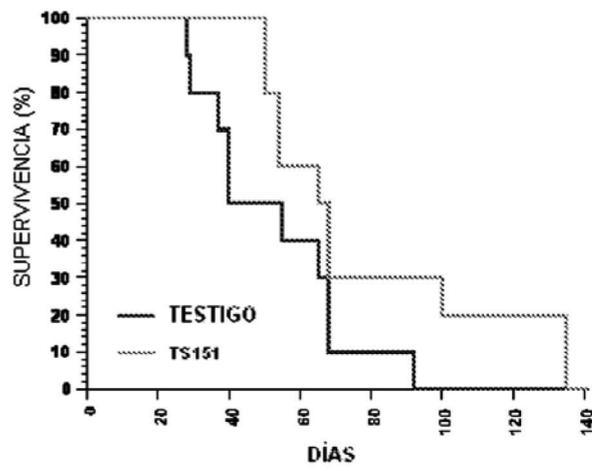


Figura 4

4/6

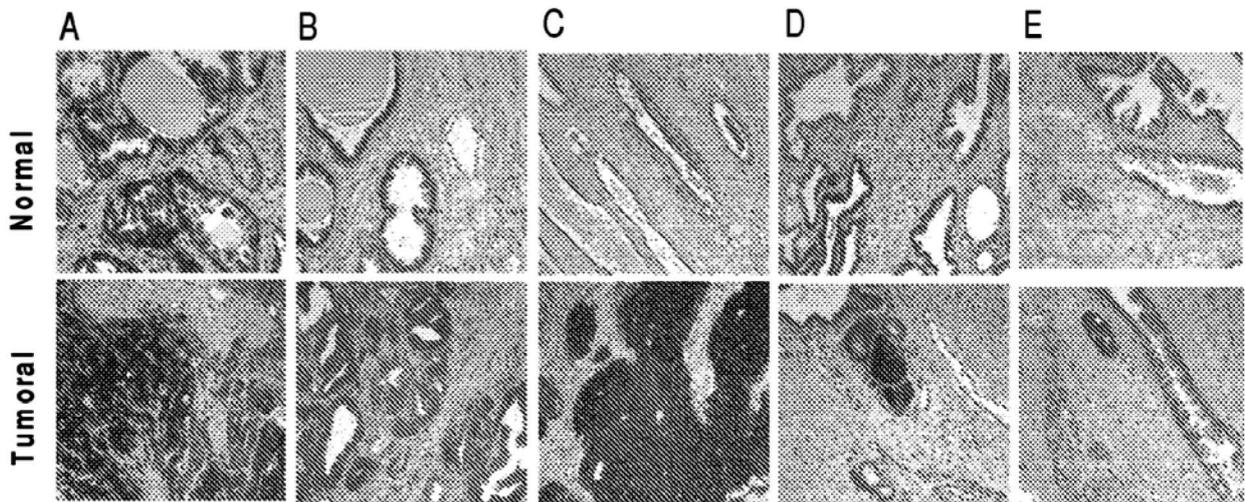


Figura 5

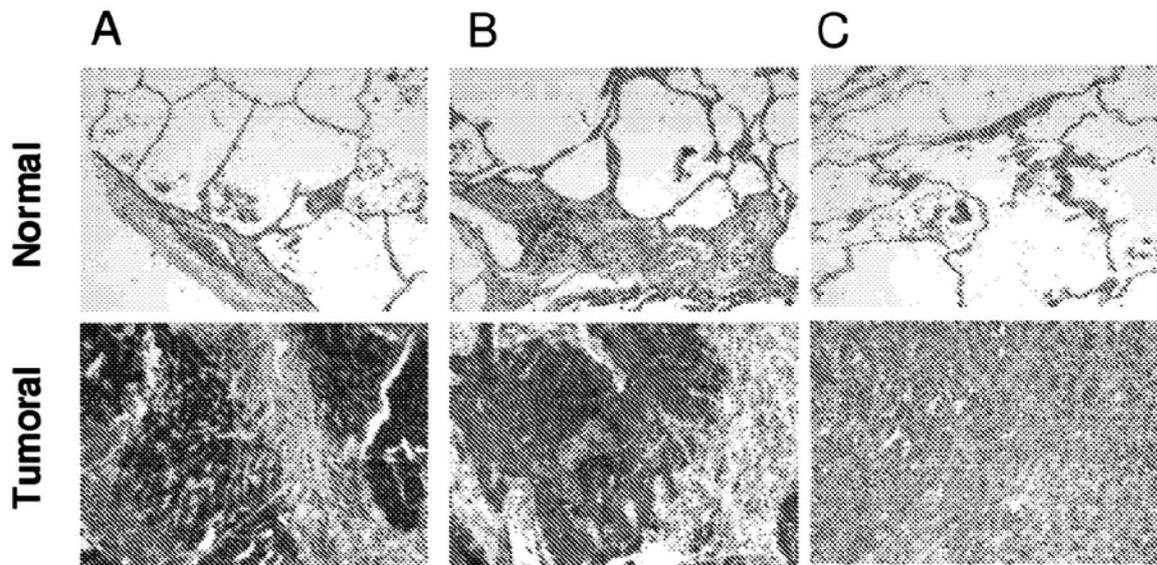


Figura 6

5/6

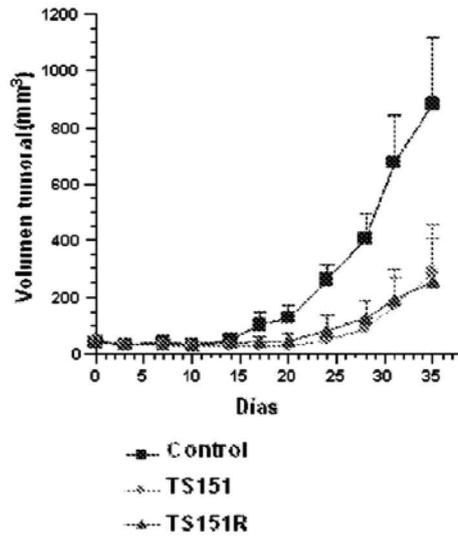


Figura 7

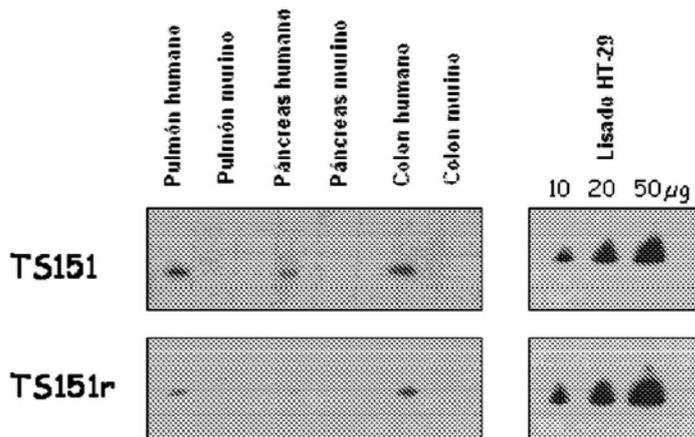
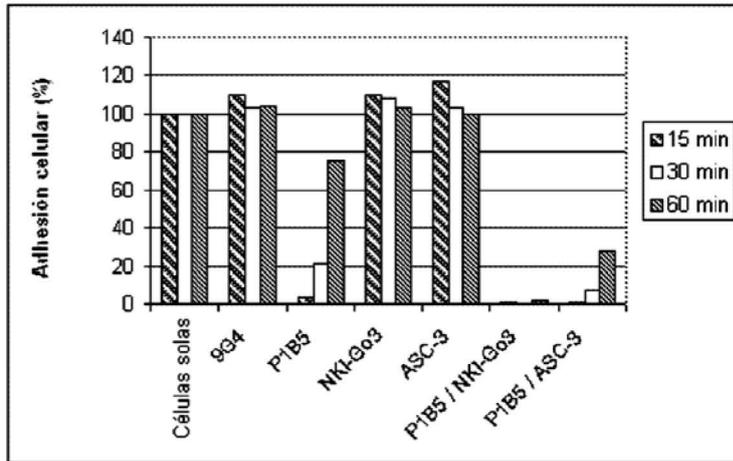


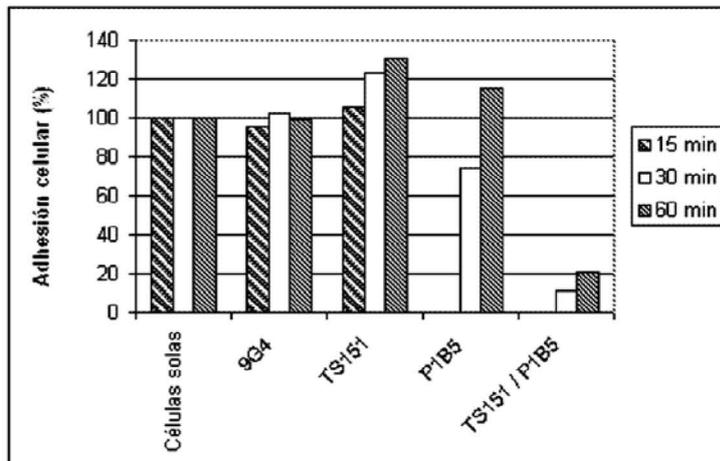
Figura 8

a

6/6



A



B

Figura 9