



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 379 155**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04761710 .5**

96 Fecha de presentación : **20.08.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1667716**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2006**

54

Título: **Mediación de la citotoxicidad de células que muestran expresión superficial de CD44.**

30

Prioridad: **22.08.2003 US 647818**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.04.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.04.2012

73

Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse, 124
4070 Basel, CH

72

Inventor/es: **Young, David S. F.;**
Hahn, Susan, E. y
Findlay, Helen, P.

74

Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 379 155 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

Mediación de la citotoxicidad de células que muestran expresión superficial de CD44.

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere al diagnóstico y el tratamiento de enfermedades cancerosas, en particular a la mediación de la citotoxicidad de células tumorales; y lo más particularmente, al uso de anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa (CDMAB), opcionalmente en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos, como medio para iniciar la respuesta citotóxica. La invención se refiere además a ensayos de unión que utilizan el CDMAB de la presente invención.

Antecedentes de la invención

La obtención de anticuerpos monoclonales contra leucocitos humanos dio lugar al descubrimiento del antígeno CD44; una glucoproteína monocatenaria que une ácido hialurónico (HA) expresada en una amplia variedad de tejido normal y en todos los tipos de células hematopoyéticas. Originalmente, se asoció con la activación y la migración de linfocitos. Actualmente, su papel fisiológico supuesto incluye también la activación de genes inflamatorios, la modulación del ciclo celular, la inducción de la proliferación celular, la inducción de la diferenciación y el desarrollo, la inducción de la reorganización del citoesqueleto y la migración celular y la supervivencia/resistencia celular a la apoptosis.

En seres humanos, la única copia del gen CD44 se sitúa en el brazo corto del cromosoma 11, 11p13. El gen contiene 19 exones; los primeros 5 son constantes, los 9 siguientes son variantes, los 3 siguientes son constantes y los 2 últimos son variantes. El ajuste diferencial puede dar lugar a más de 1000 isoformas diferentes. Sin embargo, actualmente, sólo se han identificado varias docenas de variantes naturales.

La glucoproteína CD44 estándar consta de un dominio N-terminal extracelular (que incluye una secuencia líder de 20 a.a. y una región próxima a la membrana (85 a.a.) (270 a.a.), una región transmembranaria (21 a.a.) y una cola citoplásmica (72 a.a.). La región extracelular contiene también un módulo de enlace en el extremo N-terminal. Esta región tiene 92 a.a. de longitud y muestra homología con otras proteínas de enlace que unen HA. Existe una gran homología entre las formas humana y de ratón de CD44. Las formas variantes de la proteína se insertan en el extremo carboxi del exón 5 y se sitúan extracelularmente cuando se expresan.

También se produce de forma natural una forma soluble en suero de CD44 y puede surgir, bien de un codón de terminación (dentro de la región variable) o bien de la actividad proteolítica. La activación de células a partir de una variedad de estímulos, incluido TNF- α , da como resultado la propagación del receptor de CD44. La propagación del receptor también se ha observado con células tumorales y puede dar como resultado un incremento de la concentración de CD44 en el suero humano de hasta 10 veces. Una concentración en suero elevada de CD44 sugiere una neoplasia maligna (siendo el cáncer de ovario la excepción).

La forma estándar de CD44 existe con un peso molecular de aproximadamente 37 kD. Las modificaciones postraduccionales incrementan el peso molecular hasta 80-90 kD. Estas modificaciones incluyen glucosilaciones enlazadas en N del extremo amino del dominio extracelular en residuos de asparagina, glucosilaciones enlazadas en O en residuos de serina/treonina en el extremo carboxi del dominio extracelular y adiciones de glucosaminoglucanos. Las variantes de ajuste pueden variar de tamaño entre 80-250 kD.

Se cree que el HA, un polisacárido situado en la matriz extracelular (MEC) en mamíferos, es el ligando principal de CD44. Sin embargo, también se ha descubierto que CD44 une proteínas tales como colágeno, laminina, etc. Parece haber una correlación entre la glucosilación y la unión de HA. El CD44 inactivo (no une HA) tiene los niveles de glucosilación más elevados, el CD44 activo (unido a HA) los más bajos, mientras que el CD44 inducible (no une HA o lo hace de forma débil a no ser que se active por citocinas, anticuerpos monoclonales, factores de crecimiento, etc.) tiene niveles de glucosilación en algún punto entre las formas activa e inactiva.

CD44 puede mediar algunas de sus funciones a través de las rutas de transducción de señales que dependen de la interacción de la célula, el estímulo y el entorno. Algunas de estas rutas incluyen la cascada de señalización de NF κ B (implicada en la respuesta inflamatoria), la ruta de transducción de señales de Ras-MAPK (implicada en la activación de la proliferación y el ciclo celular), la familia de proteínas Rho (implicada en la reorganización del citoesqueleto y la migración celular) y la ruta de señalización relacionada con PI3-K (relacionada con la supervivencia celular). Todas las funciones mencionadas anteriormente están estrechamente relacionadas con el inicio y la progresión de enfermedades tumorales. También se ha implicado a CD44 en el desempeño de un papel en el cáncer a través de una variedad de mecanismos adicionales. Éstos incluyen la presentación de factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas mediante proteoglucanos de superficie celular presentes en la superficie celular de CD44 a receptores implicados en las neoplasias malignas. Asimismo, la degradación intracelular de HA por hialuronidasas lisosómicas tras la internalización del complejo CD44-HA puede incrementar potencialmente la probabilidad de la invasión del tumor y la inducción de la angiogénesis a través de la MEC. Además, se ha demostrado que la transmisión de señales de supervivencia o apoptóticas se produce a través del receptor de CD44 estándar o variable. También se ha sugerido que CD44 está implicado en la diferenciación y la migración celular.

Muchos de estos mecanismos, si no todos, dependen del entorno y de las células y varios dan lugar a resultados variables. Por lo tanto, se requiere más investigación antes de que pueden sacarse conclusiones.

5 Con el fin de confirmar un potencial papel funcional de CD44 en el cáncer, se llevaron a cabo estudios de la expresión de CD44 para determinar si la expresión diferencial del receptor se correlaciona con la progresión de la enfermedad. Sin embargo, se observaron resultados contradictorios en la mayoría de tipos de tumores y esto se debe probablemente a una combinación de diferencias de reactivos, técnica, clasificación patológica y tipo celular entre los investigadores. El carcinoma de células renales y el linfoma no hodgkiniano parecen ser la excepción en cuanto que los pacientes con tumores que expresan mucho CD44 mostraron, de forma coherente, tiempos de supervivencia menores
10 que sus equivalentes que expresan poco o nada de CD44.

Debido a su asociación con el cáncer, CD44 ha sido la diana del desarrollo de tratamientos antineoplásicos. Todavía existe controversia en cuanto a si son necesarias las formas estándar o variantes de CD44 para la progresión del tumor. Hay datos de animales *in vivo* para respaldar ambos puntos de vista y, de nuevo, puede depender del tipo de tumor e incluso del tipo celular. Los diferentes enfoques terapéuticos han incluido la inyección de proteínas CD44
15 solubles, ADNc de hialuronano sintasa, hialuronidasa, el uso de anticuerpos específicos frente a CD44 y CD44 en antisentido. Cada enfoque ha dado lugar a cierto grado de éxito, proporcionando así el respaldo para los tratamientos antineoplásicos anti-CD44.

20 Se han generado de forma experimental anticuerpos monoclonales específicos frente a CD44, tanto variante como estándar, pero en su mayoría estos anticuerpos no tienen actividad biológica intrínseca, sino que se unen específicamente al tipo de CD44 que reconocen. No obstante, existen algunos que son activos bien *in vitro* o bien *in vivo*, pero, en general, no ambos. Se ha demostrado que varios anticuerpos anti-CD44 median acontecimientos celulares. Por ejemplo, se demostró que el anticuerpo murino A3D8, dirigido contra la forma estándar del antígeno CD44
25 luterano de eritrocito humano, potencia la activación de linfocitos T mediada por CD2 (anticuerpo 9-1) y CD3 (anticuerpo OKT3); otro anticuerpo anti-CD44 tuvo efectos similares. A3D8 indujo también la liberación de IL-1 desde monocitos y la liberación de IL-2 desde linfocitos T. Curiosamente, el uso de A3D8 junto con fármacos tales como daunorrubicina, mitoxantrona y etopósido, inhibió la inducción de la apoptosis en células HL60 y NB4 de LMA anulando la generación del segundo mensajero ceramida. El anticuerpo J173, que no tiene actividad intrínseca
30 y se dirige contra un epítipo similar a CD44s, no inhibió la apoptosis inducida farmacológicamente. El anticuerpo NIH44-1, dirigido contra una forma de CD44 de 85-110 kD y una de 200 kD, aumentó la proliferación de linfocitos T a través de una ruta que los autores especularon como de entrecruzamiento o de agregación de CD44. En conjunto, no existen pruebas de que los anticuerpos tales como éstos sean adecuados para su uso como tratamiento para el cáncer, ya que, o bien no se dirigen contra el cáncer (p. ej., activan linfocitos), inducen la proliferación celular o, cuando se usaron con agentes citotóxicos, inhibieron la muerte de células cancerosas inducida farmacológicamente.
35

Se han descrito varios anticuerpos anti-CD44 que demuestran efectos antitumorales *in vivo*. Se ha demostrado que el anticuerpo 1.1ASML, una IgG1 anti-rata de ratón dirigida a la variante v6 de CD44, reduce la metástasis en los ganglios linfáticos y pulmonar del adenocarcinoma pancreático de rata BSp73ASML. La supervivencia de los animales tratados se incrementó de forma concomitante. El anticuerpo sólo fue eficaz si se administraba antes de la colonización de los ganglios linfáticos, y se postuló que interfiere con la proliferación celular en el ganglio linfático. No se observó citotoxicidad directa del anticuerpo sobre las células tumorales *in vitro*, y el anticuerpo no potenció la citotoxicidad mediada por el complemento o la función inmunitaria de las células efectoras. No se describió la utilidad
45 del anticuerpo contra células humanas.

Breyer y col. describieron el uso de un anticuerpo frente a CD44s comercialmente disponible para alterar la progresión de un glioblastoma de rata implantado de forma ortotópica. Se implantó la línea celular C6 de glioblastoma de rata en el lóbulo frontal y, después de una semana, se les suministraron 3 tratamientos con anticuerpo a las ratas mediante inyección cerebral. Las ratas tratadas mostraron una disminución del crecimiento tumoral y un peso corporal mayor que las ratas tratadas con tampón o control de isotipo. El anticuerpo fue capaz de inhibir la adhesión de células
50 *in vitro* a cubreobjetos recubiertos con componentes de la matriz extracelular, pero no tuvo ningún efecto citotóxico directo sobre las células. Este anticuerpo no se probó contra células humanas.

55 Se llevó a cabo un estudio que comparó la eficacia de un anticuerpo frente a CD44s (IM-7.8.1) con un anticuerpo frente a CD44v10 (K926). Se implantó i.v. en ratones la línea murina de melanoma altamente metastásico B16F10, que expresa ambas isoformas de CD44. Después de 2 días, se administraron los anticuerpos cada tres días durante la duración del estudio. Ambos anticuerpos provocaron una reducción significativa de más del 50% en la cantidad de metástasis de pulmón; no se observaron diferencias significativas en la eficacia entre los dos anticuerpos. El anticuerpo no afectó a la proliferación *in vitro*, y los autores, Zawadzki y col., especularon que la inhibición del crecimiento tumoral se debió a que el anticuerpo bloquea la interacción de CD44 con su ligando. En otro estudio usando IM-7.8.1, Zahalka y col., demostraron que el anticuerpo y su fragmento F(ab')₂ eran capaces de bloquear la infiltración del ganglio linfático por los LB de linfoma de linfocitos T murino. Esto confirió a los ratones un beneficio de supervivencia significativo. Wallach-Dayana y col. mostraron que la transfección de LB-TR de linfoma murino, que no forma tumores espontáneamente, con CD44v4-v10 confería la capacidad para formar tumores. La administración de IM-7.8.1 redujo el tamaño del tumor de las células transfectadas implantadas en comparación con el anticuerpo de control de isotipo.
65 Ninguno de estos estudios demostró la utilidad de este anticuerpo en seres humanos.

GKW.A3, una IgG2a de ratón, es específico frente a CD44 humano y evita la formación y la metástasis de un xenoinjerto de melanoma humano en ratones SCID. El anticuerpo se mezcló con la línea celular humana metastásica SMMU-2 y después se inyectó por vía subcutánea. Los tratamientos se continuaron durante las 3 semanas siguientes. Después de 4 semanas, sólo 1 de 10 ratones desarrolló un tumor en el sitio de inyección, comparado con el 100% de los animales no tratados. Los fragmentos F(ab')₂ del anticuerpo demostraron la misma inhibición de la formación del tumor, lo que sugiere que el mecanismo de acción no dependía de la citotoxicidad celular dependiente del complemento o de anticuerpos. Si las células tumorales se inyectaban una semana antes de la primera inyección de anticuerpo, el 80% de los animales desarrollaban tumores en el sitio primario. Sin embargo, se observó que el tiempo de supervivencia se incrementaba aún de forma significativa. Aunque la administración de anticuerpo retardada no tuvo ningún efecto sobre la formación del tumor primario, evitó por completo las metástasis en el pulmón, riñón, glándula suprarrenal, hígado y peritoneo que estaban presentes en los animales no tratados. Este anticuerpo no tiene ninguna citotoxicidad directa sobre la línea celular *in vitro* ni interfiere con la proliferación de células SMMU-2, y parece tener su principal efecto sobre la formación de tumores afectando a la metástasis o al crecimiento. Una característica destacable de este anticuerpo es que reconoció todas las isoformas de CD44, lo que sugiere posibilidades limitadas para uso terapéutico.

Strobel y col. describen el uso de un anticuerpo anti-CD44 (clon 515) para inhibir la implantación peritoneal de células de cáncer ovárico humano en un modelo de xenoinjerto de ratón. Se implantó i.p. la línea celular ovárica humana 36M2 en ratones en presencia del anticuerpo anti-CD44 o anticuerpo de control, y después se administraron tratamientos durante los 20 días siguientes. Después de 5 semanas, se observaron significativamente menos nódulos en la cavidad peritoneal en el grupo tratado con anticuerpo. Los nódulos tanto de los grupos tratados con anti-CD44 como con el control eran del mismo tamaño, lo que sugiere que una vez se habían implantado las células, el anticuerpo no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento tumoral. Cuando las células se implantaron por vía subcutánea, tampoco se produjo ningún efecto sobre el crecimiento del tumor, lo que indica que el anticuerpo en sí no tuvo un efecto antiproliferativo o citotóxico. Además, no hubo ningún efecto del anticuerpo sobre el crecimiento celular *in vitro*.

VFF-18, también denominado BIWA 1, es un anticuerpo de alta afinidad por la variante v6 de CD44 específico frente a la región 360-370 del polipéptido. Este anticuerpo se ha usado como conjugado marcado con ^{99m}tecnecio en un ensayo clínico de fase 1 en 12 pacientes. Se probaron la seguridad y el potencial para dirigir el anticuerpo en pacientes con carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello. Cuarenta horas después la inyección, el 14% de la dosis inyectada fue incorporada por el tumor, con una acumulación mínima en otros órganos, incluyendo el riñón, el bazo y la médula ósea. La unión altamente selectiva al tumor sugiere un papel para este anticuerpo en el radioinmunotratamiento, aunque la afinidad excepcionalmente alta de este anticuerpo evitó la penetración en capas más profundas del tumor. También limitan la aplicación de BIWA 1 la inmunogenicidad del anticuerpo murino (11 de 12 pacientes desarrollaron anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA)), la acumulación heterogénea en el tumor y la formación de complejos de anticuerpo-CD44 soluble. El documento WO 02/094879 divulga una versión humanizada de VFF-18 diseñada para superar la respuesta de HAMA, denominada BIWA 4. Se descubrió que BIWA 4 tiene una afinidad de unión significativamente menor que el anticuerpo VFF 18 original. Sorprendentemente, el anticuerpo de afinidad menor BIWA 4 mostró características de incorporación al tumor superiores a las del anticuerpo VFF-18 humanizado de afinidad mayor BIWA 8. Se evaluó el anticuerpo BIWA 4 marcado tanto con ^{99m}tecnecio como con ¹⁸⁶renio en un ensayo de fase 1 con 33 pacientes para determinar la seguridad, la tolerabilidad, la acumulación en el tumor y la dosis máxima tolerada, en el caso de BIWA 4 marcado con ¹⁸⁶Re. Pareció producirse una incorporación de BIWA 4 marcado con ^{99m}Tc relacionada con el tumor. No se observaron respuestas tumorales con ninguna dosis de BIWA 4 marcado con ¹⁸⁶Re, aunque algunos mostraron enfermedad estable; la toxicidad limitante de la dosis se produjo a 60 mCi/m². Se observó una tasa del 50-65% de acontecimientos adversos, considerándose que 12 de los 33 pacientes tenían acontecimientos adversos graves (trombocitopenia, leucopenia y fiebre), y 6 de ellos, todos tratados con BIWA 4 marcado con ¹⁸⁶Re, murieron durante el curso del tratamiento o el seguimiento debido a la progresión de la enfermedad. Dos pacientes desarrollaron anticuerpos anti-humanos de humano (HAMA). Se llevó a cabo un ensayo de fase 1 de aumento de dosis de BIWA 4 marcado con ¹⁸⁶Re en 20 pacientes. Se observaron mucositis oral y leucocitopenia y trombocitopenia limitante de dosis; un paciente desarrolló una respuesta de HAMA. Se observó enfermedad estable en 5 pacientes tratados con la dosis más alta de 60 mCi/m². Aunque se consideraron admisibles tanto en seguridad como en tolerabilidad para la eficacia lograda, estos estudios tienen tasas de acontecimientos adversos mayores que otros tratamientos biológicos de estudios clínicos no conjugados con radioisótopos. La solicitud de patente de EE. UU. US 2003/0103985 divulga una versión humanizada de VFF-18 conjugada con un maitansinoide, denominada BIWI 1, para su uso en el tratamiento de tumores. Se descubrió que un anticuerpo VFF 18 humanizado, BIWA 4, cuando se conjugaba con una toxina, es decir, BIWI 1, tiene efectos antitumorales significativos en modelos de ratón de carcinoma epidermoide humano de la vulva, carcinoma de células escamosas de la faringe o carcinoma de mama. La versión no conjugada, BIWA 4, no mostró efectos antitumorales y la versión conjugada, BIWI1, no tiene pruebas de seguridad o eficacia en seres humanos.

Mab U36 es un anticuerpo de IgG murino generado por inmunización y selección por especificidad cancerosa y tisular de células de carcinoma hipofaríngeo humano UM-SCC-22B. La caracterización antigénica mediante clonación de ADNc y análisis de secuencia identificó como la diana de Mab U36 el dominio v6 de la variante de ajuste de CD44 específica de queratinocitos epicano. Los estudios de inmunohistoquímica muestran que el epítopo se restringe a la membrana celular. Además, Mab U36 marcó fuertemente el 94% de los carcinomas de células escamosas de la cabeza y cuello (HNSCC) y, dentro de estos tumores, se observó uniformidad en la tinción celular. Un estudio de 10 pacientes de Mab U36 marcado con ^{99m}Tc mostró la acumulación selectiva del anticuerpo frente a cánceres HNSCC (20,4 +/-12,4% de la dosis/kg inyectada a los dos días); no se informó de efectos adversos, pero dos pacientes desarrollaron HAMA. En un estudio de Mab U36 murino radioyodado se produjeron 3 casos de HAMA en 18 pacientes

e incorporación selectiva homogénea en HNSCC. Con el fin de reducir la antigenicidad de Mab U36 y reducir la tasa de HAMA, se construyó un anticuerpo quimérico. Ni el anticuerpo quimérico ni el Mab U36 murino original tienen actividad ADCC. No hay pruebas de la actividad funcional nativa de Mab U36. Se usó Mab U36 quimérico marcado con ^{186}Re para determinar la utilidad de Mab U36 como un agente terapéutico. En este ensayo de fase 1 con aumento de dosis, 13 pacientes recibieron una dosis de exploración de Mab U36 quimérico marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ seguida de Mab U36 quimérico marcado con ^{186}Re . No se informó de acontecimiento adversos agudos, pero después del tratamiento, se observaron mielotoxicidad limitante de dosis (1,5 GBq/m²) en 2 pacientes de 3 y trombocitopenia en un paciente tratado con la dosis máxima tolerada (1,0 GBq/m²). Aunque se observaron algunos efectos sobre el tamaño del tumor, estos efectos no cumplieron los criterios para las respuestas objetivas al tratamiento. Otro estudio de Mab U36 quimérico marcado con ^{186}Re empleó una estrategia de usar la reinfusión de sangre completa estimulada con factor estimulante de colonias de granulocitos para doblar la actividad máxima tolerada hasta 2,8 Gy. En este estudio de nueve pacientes con diversos tumores de la cabeza y el cuello, 3 necesitaron transfusiones por anemia relacionada con fármacos. Otras toxicidades incluyen mielotoxicidad de grado 3 y mucositis de grado 2. No se informó de respuestas tumorales objetivas, aunque se logró enfermedad estable durante 3-5 meses en cinco pacientes. Por tanto, puede observarse que, aunque Mab U36 es un anticuerpo altamente específico, la desventaja de que requiera un radioinmunoconjugado para lograr efectos antineoplásicos limita su utilidad debido a la toxicidad asociada con el tratamiento en relación con los efectos clínicos obtenidos.

En resumen, se ha demostrado que anticuerpos monoclonales frente a CD44v6 (1.1ASML) y CD44v10 (K926) reducen la actividad metastásica en ratas inyectadas con un adenocarcinoma de páncreas metastásico o en ratones inyectados con un melanoma maligno, respectivamente. Otro anticuerpo anti-CD44v6 (VFF-18 y sus derivados), sólo cuando se conjuga con un maitansinoide o un radioisótopo, ha demostrado tener efectos antitumorales. También se ha demostrado que anticuerpos monoclonales anti-CD44 estándar suprimen la progresión intracerebral del glioblastoma de rata (anti-CD-44s), la invasión de los ganglios linfáticos por linfoma de linfocitos T de ratón (IM-7.8.1), así como inhiben la implantación de una célula de cáncer oválico humano en ratones atímicos (clon 515), la metástasis pulmonar de una línea celular de melanoma de ratón (IM-7.8.1) y la metástasis de una línea celular de melanoma en ratones SCID (GKW.A3). El anticuerpo Mab U36 anti-CD44v6 conjugado con radioisótopo y sus derivados mostraron actividad antitumoral en ensayos clínicos acompañada por una toxicidad significativa. A pesar de ser alentadores y respaldar el desarrollo de anticuerpos monoclonales anti-CD44 como tratamiento potencial para el cáncer, estos resultados demuestran una eficacia, seguridad o aplicabilidad limitada para cánceres humanos.

Por tanto, si se aislara una composición de anticuerpo que media la citotoxicidad de células cancerosas, como una función de su atracción por la expresión de CD44 en la superficie celular en dichas células, se desarrollaría un procedimiento de diagnóstico y terapéutico valioso.

La asociación de CD44 con el proceso maligno es conocida (Naor y col., *Adv Cancer Res.* 1997;71:241-319). Se conocen varios anticuerpos monoclonales anti-CD44 que incrementan la adherencia de células colonogénicas (Oostendorp y col., *Br J Haematol.* 1998 jun; 101(3):436-45).

40 Patentes anteriores

La patente de EE. UU. N.º 5.750.102 divulga un procedimiento en el que se transfectan células del tumor de un paciente con genes MHC que pueden clonarse a partir de células o tejidos del paciente. Estas células transfectadas se utilizan después para vacunar al paciente.

La patente de EE. UU. N.º 4.861.581 divulga un procedimiento que comprende las etapas de obtener anticuerpos monoclonales que son específicos frente a un componente celular interno de células neoplásicas y normales del mamífero pero no frente a componentes externos, marcar el anticuerpo monoclonal, poner en contacto el anticuerpo marcado con tejido de un mamífero que ha recibido tratamiento para destruir células neoplásicas y determinar la eficacia del tratamiento midiendo la unión del anticuerpo marcado al componente celular interno de las células neoplásicas que degeneran. En la preparación de anticuerpos dirigidos frente a antígenos intracelulares humanos, el titular de la patente reconoce que las células malignas representan una fuente adecuada de tales antígenos.

La patente de EE. UU. N.º 5.171.665 proporciona un anticuerpo y un procedimiento para su producción novedosos. Específicamente, la patente enseña la formación de un anticuerpo monoclonal que posee la propiedad de unirse fuertemente a un antígeno proteico asociado con tumores humanos, p. ej., los del colon y el pulmón, a la vez que se une a células normales en un grado mucho menor.

La patente de EE. UU. N.º 5.484.596 proporciona un procedimiento de tratamiento del cáncer que comprende eliminar quirúrgicamente el tejido tumoral de un paciente humano con cáncer, tratar el tejido tumoral para obtener células tumorales, irradiar las células tumorales para que sean viables pero no tumorigénicas y usar estas células para preparar una vacuna para el paciente capaz de inhibir la recidiva del tumor primario a la vez que inhibe la metástasis. La patente enseña el desarrollo de anticuerpos monoclonales que son reactivos frente a antígenos de superficie de células tumorales. Como se describe en la columna 4, líneas 45 y siguientes, los titulares de la patentes utilizan células tumorales autóctonas en el desarrollo de anticuerpos monoclonales que expresan inmunotratamiento específico activo en neoplasia humana.

ES 2 379 155 T3

La patente de EE. UU. N.º 5.693.763 enseña un antígeno glucoproteico característico de carcinomas humanos y no dependiente del tejido epitelial de origen.

5 La patente de EE. UU. N.º 5.783.186 se refiere a anticuerpos anti-Her2 que inducen la apoptosis en células que expresan Her2, líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos, procedimientos de tratamiento del cáncer usando los anticuerpos y composiciones farmacéuticas que incluyen dichos anticuerpos.

10 La patente de EE. UU. N.º 5.849.876 describe líneas celulares de hibridoma nuevas para la producción de anticuerpos monoclonales frente a antígenos de mucina purificados a partir de fuentes de tejido tumoral y no tumoral.

15 La patente de EE. UU. N.º 5.869.268 se dirige a un procedimiento para generar un linfocito humano que produce un anticuerpo específico frente a un antígeno deseado, un procedimiento para producir un anticuerpo monoclonal, así como anticuerpos monoclonales producidos por el procedimiento. La patente se dirige, en particular, a la producción de un anticuerpo monoclonal humano anti-HD útil para el diagnóstico y tratamiento de cánceres.

20 La patente de EE. UU. N.º 5.869.045 se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, conjugados de anticuerpo e inmunotoxinas monocatenarias que reaccionan con células de carcinoma humano. El mecanismo mediante el que funcionan estos anticuerpo es doble, en cuanto que las moléculas reaccionan con antígenos de la membrana celular presentes en la superficie de carcinomas humanos, y además en cuanto que los anticuerpos tienen la capacidad de internalizarse dentro de las células de carcinoma tras la unión, lo que los hace especialmente útiles para formar conjugados de anticuerpo-fármaco y anticuerpo-toxina. En su forma no modificada, los anticuerpos también manifiestan propiedades citotóxicas a concentraciones específicas.

25 La patente de EE. UU. N.º 5.780.033 divulga el uso de autoanticuerpos para el tratamiento y la profilaxis de tumores. Sin embargo, este anticuerpo es un autoanticuerpo antinuclear de un mamífero de edad avanzada. En este caso, se dice que el autoanticuerpo es un tipo de anticuerpo natural que se encuentra en el sistema inmunitario. Debido a que el autoanticuerpo proviene de un “mamífero de edad avanzada”, no se requiere que el anticuerpo provenga realmente del paciente que se está tratando. Además, la patente divulga un autoanticuerpo antinuclear monoclonal y natural de un mamífero de edad avanzada y una línea celular de hibridoma que produce un autoanticuerpo antinuclear monoclonal.

30 La patente de EE. UU. N.º 5.916.561 divulga un anticuerpo específico, VFF-18, y sus variantes dirigido contra la variante de exón v6 del gen CD44. Este anticuerpo es una mejora respecto al anticuerpo de comparación en cuanto que reconoce una variante CD44 v6 humana en lugar de una variante CD44 v6 de rata. Además, este anticuerpo divulga ensayos de diagnóstico para la expresión de CD44 v6. No se divulgó ninguna función *in vitro* o *in vivo* para este anticuerpo.

35 La patente de EE. UU. N.º 5.616.468 divulga un anticuerpo monoclonal, Var3.1, obtenido contra un péptido sintético que contiene una secuencia codificada por el exón 6A humano del gen CD44. Específicamente, este anticuerpo no se une a la forma de 90 kD de CD44 humano y se distingue del anticuerpo Hermes-3. Se proporciona un procedimiento para la detección de la variante v6 de CD44, así como un procedimiento para analizar y someter a ensayo la transformación maligna basada en este antígeno. También se proporciona un procedimiento para analizar una enfermedad inflamatoria basándose en la detección del antígeno en suero.

40 La patente de EE. UU. N.º 5.879.898 divulga un anticuerpo específico que se une a un exón de 129 pb de la variante 6 de CD44 humano que produce un péptido de 43 aminoácidos. El anticuerpo monoclonal es producido por una serie de líneas celulares de hibridoma: MAK<CD44>M-1.1.12, MAK<CD44>M-2.42.3, MAK<CD44>M-4.3.16. El anticuerpo se genera a partir de una proteína de fusión que contiene al menos un hexapéptido de la secuencia de aminoácidos de CD44 v6 novedosa. Además, existe una divulgación de un inmunoensayo para la detección de la variante del exón 6 que puede usarse como diagnóstico para el cáncer. Significativamente, no se divulga ninguna función *in vitro* o *in vivo* de este anticuerpo.

45 La patente de EE. UU. N.º 5.942.417 divulga un polinucleótido que codifica un polipéptido de tipo CD44 y el procedimiento para preparar una proteína recombinante usando el polinucleótido y sus variantes. Se reivindican los anticuerpos frente a estos polipéptidos, aunque no existen ejemplos específicos y no se han depositado clones que segreguen tales anticuerpos. Las transferencias Northern demuestran la aparición del polinucleótido en varios tipos de tejido, pero no existen pruebas que las acompañen de que exista traducción y expresión de este polinucleótido. Por lo tanto, no hay pruebas de que existan anticuerpos que puedan prepararse frente al producto génico de este polinucleótido, de que estos anticuerpos tengan función *in vitro* o *in vivo* y de si serían o no pertinentes a la enfermedad cancerosa humana.

50 La patente de EE. UU. N.º 5.885.575 divulga un anticuerpo que reacciona con un epítipo variante de CD44 y procedimientos de identificación de la variante a través del uso del anticuerpo. El polinucleótido aislado que codifica esta variante se aisló a partir de células de rata y el anticuerpo dirigido contra esta variante, mAb1.1ASML, reconoce proteínas de peso molecular de 120 kD, 150 kD, 180 kD y 200 kD. La administración del anticuerpo monoclonal 1.1ASML retardó el crecimiento y la metástasis de BSp73ASML de rata en ratas isogénicas. Significativamente, 1.1ASML no reconoce tumores humanos, como demuestra su falta de reactividad frente al carcinoma pulmonar de células grandes humano LCLC97. Se aisló un homólogo humano a partir de LCLC97, pero no se produjo ningún

anticuerpo equivalente que reconociera este homólogo. Por tanto, aunque se produjo un anticuerpo específico frente a una variante de CD44 de rata y se demostró que afectaba al crecimiento y metástasis de tumores de rata, no existen pruebas del efecto de este anticuerpo contra tumores humanos. Más específicamente, los inventores señalan que este anticuerpo no reconoce cánceres humanos.

5

En los documentos WO03/055515 y US2002041877 se propusieron algunos anticuerpos antineoplásicos.

Sumario de la invención

10 A los presentes inventores se les ha concedido anteriormente la patente de EE. UU. 6.180.357, titulada "Anticuerpos antineoplásicos específicos de paciente individualizados" dirigida a un procedimiento para seleccionar anticuerpos antineoplásicos personalizados individualmente que son útiles en el tratamiento de una enfermedad cancerosa. Para el fin del presente documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpo monoclonal" (Acm) pueden usarse indistintamente y se refieren a inmunoglobulinas intactas producidas por hibridomas (p. ej., murinos o humanos), inmunocombinados y, si procede, fragmentos de inmunoglobulina y proteínas recombinantes derivadas de inmunoglobulinas, tales como inmunoglobulinas quiméricas y humanizadas, fragmentos F(ab') y F(ab')₂, anticuerpos monocatenarios, regiones variables de inmunoglobulinas recombinantes (Fv), proteínas de fusión, etc. Se reconoce ampliamente en la técnica que pueden variarse algunas secuencias de aminoácidos de un polipéptido sin efecto significativo en la estructura o función de la proteína. En el reordenamiento molecular de los anticuerpos pueden tolerarse, generalmente, modificaciones de la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de la región de esqueleto. Éstas incluyen, pero no se limitan a, sustituciones (se prefieren las sustituciones conservadoras), deleciones o adiciones. Además, está dentro del alcance de esta invención conjugar modalidades quimioterapéutica estándar, p. ej., radionúclidos, con el CDMAB de la presente invención, centrándose de ese modo en el uso de dichos tratamientos quimioterapéuticos. El CDMAB también puede conjugarse con toxinas, restos citotóxicos, enzimas, p. ej., enzimas conjugadas con biotina, o células hematógenas.

25

Esta solicitud utiliza sustancialmente el procedimiento para producir anticuerpos antineoplásicos específicos de paciente como se enseña en la patente '357 para aislar líneas celulares de hibridoma que codifican anticuerpos monoclonales modificadores de enfermedad cancerosa. Estos anticuerpos pueden prepararse específicamente frente a un tumor y, así, hacer posible la personalización del tratamiento del cáncer. En el contexto de esta solicitud, los anticuerpos antineoplásicos que tiene propiedades de eliminación de células (citotóxicas) o de inhibición del crecimiento celular (citostáticas) se denominarán en lo sucesivo citotóxicos. Estos anticuerpos pueden usarse para ayudar a la estadificación y el diagnóstico de un cáncer y pueden usarse para tratar metástasis tumorales, así como tumores primarios.

30

La perspectiva de un tratamiento antineoplásico individualizado traerá consigo un cambio en la forma de tratar al paciente. Un contexto clínico probable es que se obtiene una muestra tumoral en el momento de la presentación y se deposita. A partir de esta muestra, puede determinarse el tipo de tumor a partir de un conjunto preexistente de anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa. El paciente se someterá a estadificación de forma convencional, pero los anticuerpos disponibles pueden ser útiles en la estadificación adicional del paciente. El paciente puede tratarse inmediatamente con los anticuerpos existentes y/o pueden producirse un conjunto de anticuerpos específicos frente al tumor usando los procedimientos expuestos en el presente documento o a través del uso de colecciones de presentación en fagos junto con los procedimientos de análisis divulgados en el presente documento. Todos los anticuerpos generados se añadirán a la colección de anticuerpos antineoplásicos, ya que existe la posibilidad de que otros tumores puedan portar algunos de los mismos epítomos que el que se está tratando. Los anticuerpos producidos de acuerdo con este procedimiento pueden ser útiles para tratar enfermedad cancerosa en cualquier número de pacientes que tengan cánceres que se unen a estos anticuerpos.

45

Usando sustancialmente el procedimiento del documento US 6.180.357, se obtuvo el anticuerpo monoclonal de ratón H460-16-2 tras la inmunización de ratones con células de una biopsia de tumor de pulmón de un paciente. El antígeno de H460-16-2 se expresó en la superficie celular de una amplia gama de líneas celulares humanas de orígenes tisulares diferentes. La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (MB-231) y la célula de cáncer de piel A2058 fueron susceptibles a los efectos citotóxicos de H460-16-2 *in vitro*.

50

El resultado de la citotoxicidad de H460-16-2 contra células MB-231 en cultivo se extendió adicionalmente mediante su actividad antitumoral hacia estas células cancerosas cuando se trasplantaron en ratones (como se divulga en el documento WO2004/112834). Los modelos tumorales de xenoinjerto preclínicos se consideran predictores válidos de la eficacia terapéutica.

55

En el modelo preventivo *in vivo* de cáncer de mama humano, el tratamiento con H460-16-2 fue significativamente ($p < 0,0001$) más eficaz en la supresión del crecimiento del tumor durante el período de tratamiento que un anticuerpo de control de isotipo, que era idéntico a H460-16-2 en estructura y tamaño pero incapaz de unir células MB-231. Al final de la fase de tratamiento, los ratones a los que se administró H460-16-2 presentaron tumores que crecieron sólo hasta el 1,3 por ciento del grupo de control. Durante el período de seguimiento posterior al tratamiento, los efectos del tratamiento con H460-16-2 se mantuvieron y el volumen medio del tumor en los grupos tratados siguió siendo significativamente menor que los controles hasta el final de la fase de medición. Usando la supervivencia como medida de la eficacia del anticuerpo, se calculó que el riesgo de muerte en el grupo de tratamiento con H460-16-2 era aproximadamente el 71 por ciento del del grupo de control con tampón de anticuerpo ($p = 0,028$) 70 días después del tratamiento. Estos datos demostraron que el tratamiento con H40-16-2 confería un beneficio en la supervivencia en comparación con los grupos tratados con control. El tratamiento con H460-16-2 pareció seguro, ya que no indujo

65

ES 2 379 155 T3

ningún signo de toxicidad, incluyendo peso corporal reducido y sufrimiento clínico. Por tanto, el tratamiento con H460-16-2 fue eficaz, ya que tanto retardó el crecimiento tumoral como potenció la supervivencia en comparación con los grupos tratados con control en un modelo bien establecido de cáncer de mama humano.

5 Además, H460-16-2 demostró actividad antitumoral en células MB-231 en un modelo establecido de tumor *in vivo* (como se expone en el documento WO2004/112834). El tratamiento con H460-16-2 se comparó con el fármaco quimioterapéutico estándar, cisplatino, y se mostró que los grupos tratados con cisplatino y H460-16-2 tenían volúmenes tumorales medios significativamente ($p < 0,001$) menores en comparación con grupos tratados con tampón de dilución de anticuerpo o el anticuerpo de control de isotipo. La supresión de tumores mediada por tratamiento con H460-16-2 fue aproximadamente dos tercios de la de la quimioterapia con cisplatino pero sin la pérdida de peso significativa (19,2%) ($p < 0,003$) y el sufrimiento clínico, incluyendo 2 muertes asociadas con el tratamiento, observados con el tratamiento con cisplatino. La actividad antitumoral de H460-16-2 y su toxicidad mínima lo convierten en un agente terapéutico antineoplásico atractivo.

15 En el período posterior al tratamiento, H460-16-2 mostró un beneficio de supervivencia significativo ($p < 0,02$), ya que el riesgo de muerte en el grupo de H460-16-2 fue de aproximadamente la mitad del del grupo de anticuerpo de control de isotipo >70 días después del tratamiento. El beneficio de supervivencia observado continuó pasados 120 días después del tratamiento, cuando el 100 por cien de los ratones tratados con control de isotipo y cisplatino habían muerto, frente al 67 por ciento del grupo tratado con H460-16-2. El H460-16-2 mantuvo la supresión del tumor retardando el crecimiento tumoral en un 26 por ciento en comparación con el grupo de anticuerpo de control de isotipo. 20 31 días después del tratamiento, el H460-16-2 limitó el tamaño del tumor reduciendo el crecimiento del tumor en un 48 por ciento en comparación con el grupo de control de isotipo, lo que es comparable a la reducción del 49 por ciento observada al final del tratamiento. En el modelo de tumor establecido de cáncer de mama, estos resultados indican el potencial de H460-16-2 para mantener la supresión tumoral más allá de la fase de tratamiento y demuestran 25 la capacidad del anticuerpo para reducir la carga tumoral y potenciar la supervivencia en un mamífero.

Con el fin de confirmar el epítipo de H460-16-2 como diana del fármaco, se determinó previamente la expresión del antígeno de H460-16-2 en tejidos humanos normales (documento WO2004/112834). Este trabajo se extendió mediante comparación con un anticuerpo anti-CD44 (clon L178). Mediante tinción IHQ con H460-16-2, la mayoría 30 de los tejidos no pudieron, de nuevo, expresar el antígeno de H460-16-2, incluyendo las células de los órganos vitales, tales como el hígado, el riñón (excepto por la tinción marginal de células del epitelio tubular), el corazón y el pulmón. Los resultados de la tinción tisular indicaron que H460-16-2 mostraba unión limitada a diversos tipos celulares pero tenía unión a fibroblastos, linfocitos y macrófagos de infiltración. El anticuerpo L178 mostró un patrón de tinción similar. Sin embargo, se observaron varias diferencias notables; la tinción de linfocitos fue más intensa y presentó una 35 distribución más amplia con L178 en comparación con H460-16-2. Asimismo, en una de las muestras de hígado, L178 tiñó las células de Kupffer, mientras que H460-16-2 no lo hizo.

La localización del antígeno de H460-16-2 y su prevalencia en pacientes con cáncer de mama es importante para evaluar los beneficios del inmunotratamiento con H460-16-2 de pacientes y en el diseño de ensayos clínicos eficaces. 40 Para abordar la expresión del antígeno de H460-16-2 en tumores de mama de pacientes con cáncer, se analizaron previamente muestras de tejido tumoral de 50 pacientes individuales con cáncer de mama para evaluar la expresión del antígeno de H460-16-2 (documento WO2004/112834). El presente trabajo comparó la tinción de H460-16-2 y la de L178. Los resultados del presente estudio fueron similares a los resultados anteriores y mostraron que el 62 por ciento de las muestras de tejido se tiñeron positivamente para el antígeno de H460-16-2, mientras que el 76 por 45 ciento de los tejidos tumorales de mama fueron positivos para el epítipo de L178. La expresión de H460-16-2 en las muestras de pacientes pareció específica de células cancerosas, ya que la tinción se limitó a células malignas. Por el contrario, H460-16-2 tiñó 4 de 10 muestras de tejido normal de pacientes con cáncer de mama mientras que L178 tiñó 6. La expresión de tumores de mama, tanto de antígeno de H460-16-2 como de L178 pareció localizarse principalmente en la membrana celular de células malignas, haciendo de CD44 una diana atractiva para el tratamiento. 50 La expresión H460-16-2 se evaluó adicionalmente basándose en la expresión de tumores de mama de los receptores para las hormonas estrógeno y progesterona, que desempeñan un papel importante en el desarrollo, el tratamiento y el pronóstico de los tumores de mama. No se observó una correlación evidente entre la expresión del antígeno de H460-16-2 y la expresión de los receptores para estrógenos o progesterona. Cuando se analizaron los tumores basándose en su estadio, o el grado hasta el cual avanzó el cáncer, de nuevo, no se observó una correlación clara entre la expresión 55 de antígeno de H460-16-2 y el estadio del tumor. Se obtuvieron resultados similares con L178.

Para extender adicionalmente el beneficio terapéutico potencial de H460-16-2, también se determinó con anterioridad la frecuencia y la localización del antígeno en varios tejidos cancerosos humanos (documento WO2004/112834). Los presentes estudios compararon la tinción de H460-16-2 con la del clon L178. La mayoría de estos tipos tumorales 60 también fueron positivos para el antígeno de L178. Como con el tejido de tumor de mama humano, la localización de H460-16-2 y L178 se produjo en la membrana de células tumorales. Sin embargo, se observó sustancialmente más localización de membrana con el anticuerpo L178 en comparación con el H460-16-2. Asimismo, de los tipos de tumores que se tiñeron por H460-16-2 y L178, el 43% de los tejidos mostró una intensidad de tinción mayor con el anticuerpo L178. No parece existir ninguna forma de CD44 que se corresponda exactamente con los datos de IHQ presentados en el presente documento basándose en comparaciones con los datos de IHQ de la bibliografía. La forma estándar de CD44 se expresa normalmente en el cerebro humano; el antígeno de H460-16-2 no. Los anticuerpos dirigidos contra isoformas pan-CD44 no tiñen el hígado (incluyendo células de Kupffer) y tiñen positivamente las glándulas endometriales en todas las fases del ciclo reproductor. El antígeno de H460-16-2 está claramente presente en células de 65

ES 2 379 155 T3

Kupffer y sólo está presente en las glándulas endometriales secretoras del ciclo reproductor. El antígeno de H460-16-2 está claramente presente en macrófagos tisulares y únicamente las formas variantes V4/5 y V8/9 muestran tinción ocasional de macrófagos. El patrón de unión similar, si bien distinto, observado en H460-16-2 en comparación con L178 anti-CD44 indica que el antígeno de H460-16-2 es un epítipo único de CD44.

5 Como se expone en el presente documento, los datos bioquímicos adicionales también indican que el antígeno reconocido por H460-16-2 es una de las formas de CD44. Esto está respaldado por estudios que muestran que un anticuerpo monoclonal (L178) reactivo contra CD44 identifica proteínas que estaban unidas a H460-16-2 por inmunoprecipitación. Los estudios de transferencias Western también sugieren que el epítipo de CD44 reconocido por H460-16-2 no está presente en v6 o v10. El epítipo de H460-16-2 también se distingue por ser dependiente de carbohidrato y de la conformación, mientras que muchos anticuerpos anti-CD44 se dirigen contra porciones peptídicas de CD44. Estos resultados de IHQ y bioquímicos demuestran que H460-16-2 se une a una variante del antígeno CD44. Por tanto, la preponderancia de las pruebas demuestra que H460-16-2 media efectos antineoplásicos a través de la unión de un único epítipo conformacional dependiente de carbohidrato presente en una variante de CD44.

15 *In toto*, estos datos demuestran que el antígeno de H460-16-2 es un antígeno asociado al cáncer y se expresa en seres humanos y es una diana cancerosa patológicamente pertinente. Además, estos datos también demuestran la unión del anticuerpo H460-16-2 a tejidos cancerosos humanos y pueden usarse apropiadamente para ensayos que pueden ser de diagnóstico predictivos del tratamiento o de pronóstico. Además, la localización de membrana celular de este antígeno es indicativa del estado canceroso de la célula debido a la carencia de expresión del antígeno en la mayoría de las células no malignas, y esta observación permite el uso de este antígeno, o su gen o derivados, su proteína o sus variantes para que se usen para ensayos que pueden ser de diagnóstico, predictivos del tratamiento o de pronóstico.

25 Otros estudios que implican el uso de anticuerpos anti-CD44, tienen limitaciones del potencial terapéutico que no muestra H460-16-2. H460-16-2 demuestra actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. Los anticuerpos descritos anteriormente, tales como MAK<CD44>M-1.1.12, MAK<CD44>M-2.42.3 y MAK<CD44>M-4.3.16, no tienen citotoxicidad *in vitro* o *in vivo* adscrita a ellos y VFF-18 y Mab U36 no muestran citotoxicidad tumoral intrínseca. Además, otros anticuerpos anti-CD44 que han mostrado efectos tumorales *in vivo* también tienen algunas limitaciones que no se evidencian con H460-16-2. Por ejemplo, ASML1.1, K926, anti-CD44s e IM-78.1 muestran actividad antitumoral *in vivo* contra tumores de rata y murinos crecidos en modelos de xenoinjerto de rata y murinos, respectivamente. H460-16-2 demuestra actividad antitumoral en un modelo de cáncer humano. H460-16-2 también se dirige contra CD44 humano, mientras que anticuerpos tales como ASML1.1 reconocen sólo CD44 de rata. El anticuerpo anti-CD44 del clon 515 inhibe la implantación tumoral peritoneal de una línea celular ovárica humana, pero no evita o inhibe el crecimiento tumoral. H460-16-2 es capaz de inhibir el crecimiento de tumores de mama humanos en un modelo de xenoinjerto de ratones SCID. GKW.A3 es un anticuerpo monoclonal anti-CD44 humano capaz de inhibir el crecimiento tumoral de melanoma humano metastatizante crecido en ratones en un modelo preventivo, pero no en uno establecido. H460-16-2 ha demostrado una actividad antitumoral significativa en modelos de xenoinjerto murino tanto preventivos como establecidos de cáncer de mama humano. En consecuencia, es bastante evidente que H460-16-2 tiene propiedades antitumorales superiores en comparación con los anticuerpos anti-CD44 descritos anteriormente. Ha demostrado actividad tumoral tanto *in vitro* como *in vivo* sobre un tumor mamario humano en ratones SCID y se dirige contra CD44 humano. También presenta actividad en un modelo preventivo y establecido (más pertinente clínicamente) de cáncer de mama humano.

45 En conjunto, esta invención enseña el uso del antígeno de H460-16-2 como diana para un agente terapéutico que, cuando se administra, puede reducir la carga tumoral de un cáncer que expresa el antígeno en un mamífero, y también puede dar lugar a una supervivencia prolongada del mamífero tratado. Esta invención también enseña el uso de un CDMAB (H460-16-2), y sus derivados, para dirigir su antígeno para reducir la carga tumoral de un cáncer que expresa el antígeno en un mamífero, y para prolongar la supervivencia de un mamífero que porta tumores que expresan este antígeno. Además, esta invención también enseña el uso de detectar el antígeno de H460-16-2 en células cancerosas que puede ser útil para el diagnóstico, la predicción del tratamiento y el pronóstico de mamíferos que portan tumores que expresan el antígeno.

55 Si un paciente no responde al curso inicial de tratamiento o se desarrollan metástasis, puede repetirse el procedimiento de generar anticuerpos específicos frente al tumor para repetir el tratamiento. Además, los anticuerpos antineoplásicos pueden conjugarse con glóbulos rojos obtenidos a partir de ese paciente y volver a infundirse para el tratamiento de metástasis. Han existido pocos tratamientos eficaces para cáncer metastásico y las metástasis suelen presagiar un mal desenlace con resultado de muerte. Sin embargo, los cánceres metastásicos suelen estar bien vascularizados y la administración de anticuerpos antineoplásicos por glóbulos rojos puede tener el efecto de concentrar los anticuerpos en el sitio del tumor. Antes incluso de la metástasis, la mayoría de las células cancerosas son dependientes del suministro de sangre del huésped para su supervivencia y el anticuerpo antineoplásico conjugado con glóbulos rojos puede ser eficaz también contra tumores *in situ*. De forma alternativa, los anticuerpos pueden conjugarse con otras células hematógenas, p. ej., linfocitos, macrófagos, monocitos, linfocitos citolíticos naturales, etc.

65 Existen cinco clases de anticuerpos y cada una se asocia con una función que le confiere su cadena pesada. En general, se cree que la destrucción de células cancerosas por anticuerpos desnudos está mediada a través de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por ejemplo, los anticuerpos de IgG2a e IgM murinos pueden activar el complemento humano uniendo el componente C-1 del sistema del complemento, activando de este modo la vía clásica de la activación del complemento, que pue-

ES 2 379 155 T3

de conducir a la lisis tumoral. Para anticuerpos humanos, los anticuerpos activadores del complemento más eficaces son, generalmente, IgM e IgG1. Los anticuerpos murinos del isotipo IgG2 e IgG3 son eficaces en el reclutamiento de células citotóxicas que tienen receptores de Fe que darán lugar a la destrucción de células por monocitos, macrófagos, granulocitos y algunos linfocitos. Los anticuerpos humanos tanto del isotipo IgG1 como del IgG3 median la ADCC.

Otro posible mecanismo de destrucción del cáncer mediada por anticuerpo puede ser a través del uso de anticuerpos cuya función es catalizar la hidrólisis de diversos enlaces químicos de la membrana celular y sus glucoproteínas o glucolípidos asociados, llamados anticuerpos catalíticos.

Existen dos mecanismos adicionales de destrucción de células cancerosas mediada por anticuerpos que están aceptados más ampliamente. El primero es el uso de anticuerpos como una vacuna para inducir que el organismo produzca una respuesta inmunitaria contra el antígeno supuesto que reside en la célula cancerosa. El segundo es el uso de anticuerpos para dirigirse a los receptores del crecimiento e interferir con su función o regular por disminución ese receptor de forma que su función se pierda de forma eficaz.

En consecuencia, es un objeto de la invención utilizar un procedimiento para producir anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa a partir de células derivadas de un individuo en particular que son citotóxicos con respecto a las células cancerosas mientras que, al mismo tiempo, son relativamente no tóxicos para las células no cancerosas, con el fin de aislar líneas celulares de hibridoma y los anticuerpos monoclonales aislados correspondientes y fragmentos de unión a antígeno de los mismos para los que están codificadas dichas líneas celulares de hibridoma.

Es un objeto adicional de la invención enseñar procedimientos de utilización del anticuerpo monoclonal aislado o fragmentos de unión a antígeno codificados por el clon depositado en la ATCC como PTA-4621 para determinar la presencia de células que expresan un resto antigénico CD44 que se une específicamente a un anticuerpo monoclonal aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo codificados por el clon depositado en la ATCC como PTA-4621.

Es un objeto adicional más de la presente invención enseñar procedimientos para potenciar la supervivencia de un paciente que tiene una enfermedad cancerosa mediante el uso de un anticuerpo monoclonal aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo codificados por el clon depositado en la ATCC como PTA-4621, anticuerpo que se une específicamente a un resto antigénico CD44.

Es un objeto adicional de la invención enseñar CDMAB y sus fragmentos de unión a antígeno.

Es un objeto adicional de la presente invención producir CDMAB cuya citotoxicidad está mediada a través de ADCC.

Es un objeto adicional más de la presente invención producir CDMAB cuya citotoxicidad está mediada a través de CDC.

Es un objeto adicional más de la presente invención producir CDMAB cuya citotoxicidad es una función de su capacidad para catalizar la hidrólisis de enlaces químicos celulares.

Un objeto adicional más de la presente invención es producir CDMAB que son útiles en un ensayo de unión para diagnóstico, pronóstico y monitorización del cáncer.

En un primero aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal codificado por un clon depositado en la ATCC con número de acceso PTA-4621 para identificar una célula que expresa CD44.

Preferentemente, dicho CD44 es un CD44 humano.

Preferentemente, dicho CD44 humano es el CD44 con número de acceso del NCBI gi|2134882.

Preferentemente, dicha célula es una célula tumoral. Más preferentemente, dicha célula tumoral es una célula de piel, mama, ganglio linfático, hueso, tejido blando, cavidad nasal, laringe, pulmón, lengua, glándula parótida, hígado, vesícula biliar, páncreas, esófago, estómago, colon, recto, riñón, vejiga urinaria, próstata, testículos, útero, cuello uterino, tiroides, timo o cerebro.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento de identificación de un tumor humano susceptible de ser tratado con un anticuerpo monoclonal codificado por un clon depositado en la ATCC con número de acceso PTA-4621, que comprende identificar un tumor humano que expresa CD44.

Preferentemente, dicho CD44 humano es el CD44 con número de acceso del NCBI gi|2134882.

Preferentemente, dicho tumor es un tumor de piel, mama, ganglio linfático, hueso, tejido blando, cavidad nasal, laringe, pulmón, lengua, glándula parótida, hígado, vesícula biliar, páncreas, esófago, estómago, colon, recto, riñón, vejiga urinaria, próstata, testículos, útero, cuello uterino, tiroides, timo o cerebro.

ES 2 379 155 T3

En un aspecto adicional la invención proporciona un ensayo para determinar la presencia de células humanas que expresan CD44 que comprende:

- 5 proporcionar un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, codificados por el clon depositado en la ATCC como PTA-4621;
- poner en contacto dicho anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo con dicha muestra de células; y
- 10 determinar la unión de dicho anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo con dicha muestra de células;
- determinándose de este modo la presencia de células que expresan resto antigénico CD44.

15 Preferentemente, dicho CD44 es un CD44 humano.

Preferentemente, dicho CD44 humano es el CD44 con número de acceso del NCBI gi|2134882.

20 Preferentemente, dicha célula es una célula tumoral. Más preferentemente, dicha célula tumoral es una célula de piel, mama, ganglio linfático, hueso, tejido blando, cavidad nasal, laringe, pulmón, lengua, glándula parótida, hígado, vesícula biliar, páncreas, esófago, estómago, colon, recto, riñón, vejiga urinaria, próstata, testículos, útero, cuello uterino, tiroides, timo o cerebro.

25 Otros objetos y ventajas de esta invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción en la que se describen a continuación, a modo de ilustración y ejemplo, algunas realizaciones de esta invención.

Breve descripción de las figuras

30 El expediente de patente o de solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. La Oficina proporcionará copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujo(s) en color tras la petición y el pago de las tasas necesarias.

35 Figura 1. Transferencia Western de membranas MDA-MB-468 sondadas con H460-16-2. Carril 1: proteínas de membrana separadas en condiciones reductoras. Carril 2: proteínas de membrana separadas en condiciones no reductoras. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda.

40 Figura 2. Transferencia Western de membranas sondadas con H460-16-2. Carril 1: membranas MDA-MB-468. Carril 2: membranas MDA-MB-231. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda.

45 Figura 3. Transferencia Western y SDS-PAGE bidimensionales de proteínas de membrana MDA-MB-468. El panel A muestra la posición de las dos proteínas reconocidas por H460-16-2. El panel B muestra una transferencia similar sondada con un anticuerpo de control de isotipo. El panel C muestra un gel teñido con SYPRO Ruby de membranas MDA-MB-468, Las flechas indican la posición de manchas de proteínas correspondientes al panel A.

Figura 4. Transferencia Western bidimensional de proteínas de membrana MDA-MB-231. La principal proteína de unión se indica con una flecha.

50 Figura 5. Efecto de la desglucosilación en la unión de H460-16-2 a membranas MDA-MB-231. El panel A muestra la unión de H460-16-2 en una transferencia Western a membranas celulares MDA-MB-231 no tratadas (carril 2), membranas tratadas con glucosidasas (véase el texto) a 37°C durante 24 h (carril 3) y membranas tratadas con glucosidasas a 25°C durante 24 h (carril 4). El carril 1 muestra la posición de los marcadores de peso molecular. El panel B muestra la unión de la lectina de alta unión a mañosa GNA a una transferencia similar.

55 Figura 6. SDS-PAGE (panel A) y transferencia Western (panel B) de proteínas de membrana MDA-MB-231 inmunoprecipitadas con H460-16-2. Carril 1: proteínas de membrana MDA-MB-231 totales; carril 2: proteínas inmunoprecipitadas con H460-16-2. La flecha muestra la proteína de unión H460-16-2 de 80-90 kD.

60 Figura 7. Transferencias Western de proteínas sondadas con H460-16-2 (panel A), anti-CD44 (clon L178, panel B) y anti-HSP90 (panel C). Carril 1: proteínas de membrana MDA-MB-231 totales; carril 2: proteínas inmunoprecipitadas con H460-16-2; carril 3: patrones de peso Molecular.

65 Figura 8. Transferencias Western de proteínas sondadas con H460-16-2 (panel A, carril 2), anti-CD44 (clon L178, panel B, carril 2), anti-CD44var6 (clon VFF-7, panel C, carril 2) y anti-CD44var10 (clon VFF-14, panel D, carril 2). El carril 1 de cada transferencia contiene los patrones de peso molecular.

Figura 9. Gráficas representativas para la unión de H460-16-2 mediante FACS. Se presentan gráficas para la unión de H460-16-2 (20 $\mu\text{g/ml}$), control de isotipo 107.3 (20 $\mu\text{g/ml}$) y anti-EGFR (5 $\mu\text{g/ml}$) para líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) y normales (Hs578.Bst y CCD-27sk).

5 Figura 10. Micrografías representativas que muestran el patrón de unión obtenido con H460-16-2 (A) y el anticuerpo anti-CD44 (L178) (B) en secciones tisulares de amígdalas de un conjunto de tejidos humanos normales. Se observa una tinción de linfocitos más intensa y de más amplia distribución con L178 que con ARH460-16-2, donde la tinción se limita más a la zona del manto de ganglios linfáticos (flecha negra), dejando el centro germinal (flecha verde) con tinción débil. El aumento es 200X.

10 Figura 11. Micrografías representativas que muestran el patrón de unión obtenido con H460-16-2 (A) y el anticuerpo anti-CD44 (L178) (B) en secciones tisulares de hígado de un conjunto de tejido humanos normales. Se observa tinción para células de Kupffer (flechas) en sinusoides hepáticos con L178 y no con H460-16-2. El aumento es 200X.

15 Figura 12. Micrografía representativa de la unión de H460-16-2 a un tumor de cáncer de mama (carcinoma ductal infiltrante). Las flechas amarilla y naranja del panel apuntan a células estromales y láminas de células malignas, respectivamente. El aumento es 100X.

20 Figura 13. Micrografías representativas que muestran el patrón de unión obtenido con H460-16-2 (A) y el anticuerpo anti-CD44 (L178) (B) en secciones tisulares mamarias de enfermedad de Paget de un conjunto de tejidos de cáncer de mama humano. Se observa una tinción membranosa de células malignas (flechas) con L178 frente a una tinción negativa con H460-16-2. El aumento es 200X.

25 Figura 14. Micrografías representativas que muestran el patrón de unión obtenido con H460-16-2 (A) y el anticuerpo anti-CD44 (L178) (B) en secciones tisulares de carcinoma de células escamosas de cuello uterino de un conjunto de tejidos multitu- morales humanos. Se observa una tinción membranosa más fuerte de células malignas con H460-16-2 que con L178. El aumento es 200X.

30 Figura 15. Micrografías representativas que muestran el patrón de unión obtenido con H460-16-2 (A) y el anticuerpo anti-CD44 (L178) (B) en secciones tisulares de adenocarcinoma de pulmón de un conjunto de tejidos multitu- morales humanos. Se observa una puntuación +++ de células malignas (flechas) con L178 frente a +/- con H460-16-2. El aumento es 200X.

Descripción detallada de la invención

35 Ejemplo 1

Identificación de las proteínas de unión por transferencia Western

40 Para identificar el/los antígeno(s) reconocido(s) por el anticuerpo H460-16-2, se sometieron a electroforesis en gel membranas celulares que expresan este antígeno y se transfirieron a membranas. Se usó transferencia Western para determinar las proteínas detectadas por este anticuerpo.

1. Preparación de membrana

45 El trabajo anterior demostró la unión por FACS de H460-16-2 a las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 (MB-231) y MDA-MB-468 (MB-468). En consecuencia, se usaron preparaciones de membrana de estas dos líneas celulares para la identificación de antígeno. Las membranas celulares totales se prepararon a partir de cultivos confluentes de células de cáncer de mama MB-231 o MB-468. Se retiraron los medios de los matraces y las células se lavaron 3 veces con PBS. Después del lavado final, se disociaron las células con tampón de disociación (Gibco-BRL, Grand Island, NY) durante 5 minutos a 37°C. Las células se recogieron y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, los sedimentos celulares se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis hipotónico que contenía 10 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina, 10 $\mu\text{g/ml}$ de aprotinina y 25 $\mu\text{g/ml}$ de fluoruro de 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo. Después, se lisaron las células usando 5 ciclos de congelación y descongelación rápidas. Los lisados celulares se centrifugaron a 9500 rpm durante 10 minutos a 4°C para retirar las partículas nucleares. Se recogió el sobrenadante y después se centrifugó a 75.000 x g durante 57 minutos a 4°C. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante de los tubos y se resuspendieron los sedimentos en de 0,5 a 1 ml de tampón de lisis hipotónico que contenía Tritón X-100 al 1%. Después, se sometieron a ensayo las membranas para evaluar su contenido en proteínas y se almacenaron a -80°C.

2. SDS-PAGE unidimensional

60 Se separaron las proteínas de membrana por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS unidimensional. Se cargaron 20 μg de proteína de membrana en un carril de un gel de SDS-PAGE al 12 por ciento. Se hizo correr una muestra de marcadores de peso molecular previamente teñidos (Biorad; Mississauga, ON) en un carril de referencia. La muestra se separó por electroforesis en condiciones no reductoras, en ausencia de ditiotreitól (DTT). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 10 minutos, seguido de 65 minutos a 150 V. Las proteínas se transfirieron desde el gel a membranas de PVDF (Millipore, Billerica, MA) mediante electrotransferencia durante 16 horas a 40 V. La transferencia

ES 2 379 155 T3

cuantitativa se evaluó observando la transferencia completa de los marcadores previamente teñidos desde el gel a la membrana.

Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo en solución salina tamponada con Tris que contenía Tween al 0,5 por ciento (TBST) al 5 por ciento durante 2 h. Después, se incubaron las membranas con 2 - 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de H460-16-2 diluido en leche desnatada en polvo en TBST al 3 por ciento durante 2 horas. Después de lavar 3 veces con TBST, las membranas se incubaron con IgG (Fe) anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) de Jackson Immunologicals (West Groove, PA) durante 1 h. A esta incubación le siguieron 3 lavados con TBST, seguidos por incubación con el sustrato de HRP TMB (kit de sustrato de Vector Laboratories; Burlington, ON).

La figura 1 muestra los resultados de la transferencia Western como se describe. H460-16-2 se une claramente a dos regiones de peso molecular (PM) de las proteínas de membrana MB-468 (carril 2) separadas. Mediante comparación con los patrones de peso molecular, el anticuerpo se une a proteínas de PM 80-90 kD y PM 120-150 kD. El epítipo reconocido por el anticuerpo H460-16-2 parece ser un epítipo conformacional, dado que el anticuerpo no era capaz de unirse a manchas transferidas desde geles en condiciones reductoras en presencia de DTT (carril 1). La figura 2 compara la unión de H460-16-2 a membranas de células MB-468 (carril 1) y MB-231 (carril 2). En las membranas MB-468, H460-16-2 se une tanto a las proteínas de 80-90 kD como de 120-150 kD con la misma intensidad. En las membranas MB-231, la principal proteína de unión es la de 80-90 kD, con una proteína de unión menos intensa identificada en el intervalo de 120-150 kD.

3. SDS-PAGE bidimensional

Con el fin de obtener una mejor resolución de las entidades de unión y para caracterizar adicionalmente las proteínas, se llevó a cabo electroforesis bidimensional. Las proteínas de membrana total (75-200 μg) preparadas como se describe anteriormente, se precipitaron usando el kit PlusOne 2-D Clean Up (Amersham; Baie D'Urfé, QC), y después se resuspendieron en tampón de rehidratación que contenía anfolitos en el intervalo de pH de 3-10. Se centrifugaron las muestras para retirar el material particulado y después se cargaron en tiras de IPG (Amersham; Baie D'Urfé, QC) en presencia de una solución de rehidratación. Las proteínas se concentraron usando el protocolo siguiente: 16 h para rehidratación; 500 V, 250 V h, 1000 V, 500 V h; 5000 V, 7500 V h. Después, se retiró la tira de los soportes de tira y se incubó en un tampón de equilibrado de SDS-PAGE. Después de 15 min, la tira se colocó en la parte superior de un gel al 8 por ciento y se selló con una solución de agarosa. Se cargaron marcadores de PM previamente teñidos al lado de la tira. Se llevó a cabo la electroforesis a 100 V durante 10 minutos, seguido de 65 minutos a 150 V. Uno de los geles se fijó durante 30 min con metanol al 10%/ácido acético al 7% y después se teñó con el tinte fluorescente SYPRO Ruby™ (Molecular Probes, Eugene, OR). Las manchas de proteínas se visualizaron bajo luz UV. A partir de un segundo y un tercer gel, las proteínas se transfirieron desde los geles a membranas de PVDF (Millipore) por electrotransferencia durante 16 h a 40 V. La transferencia cuantitativa se evaluó determinando la transferencia completa de los marcadores previamente teñidos desde el gel a la membrana.

Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo en solución salina tamponada con Tris que contenía Tween al 0,5 por ciento (TBST) al 5 por ciento durante 2 h. Después, se incubó una de las membranas con 2-2,5 $\mu\text{g/ml}$ de H460-16-2 diluido en leche desnatada en polvo en TBST al 3 por ciento durante 2 horas. Se incubó una membrana similar con la misma concentración de un control de isotipo (anti-trinitrofenol de ratón, IgG1, κ , clon 107.3 (BD Biosciences, Oakville, ON)). Después de lavar 3 veces con TBST, las membranas se incubaron con IgG (Fe) anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) de Jackson Immunologicals (West Groove, PA) durante 1 h. A esta incubación le siguieron 3 lavados con TBST, seguidos por incubación con el sustrato de HRP TMB (kit de sustrato de Vector Laboratories; Burlington, ON).

La figura 3a muestra la transferencia Western obtenida a partir de membranas MB-468 incubadas con H460-16-2. Se observan dos manchas de unión distintas, con pesos moleculares correspondientes a los obtenidos mediante electroforesis unidimensional. Una se observa a un PM de aproximadamente 80-90 kD de acuerdo con los patrones de PM y está en la parte ácida del gel con un pl estimado de 3-4. La segunda mancha está en el intervalo de PM de 120-150 kD de acuerdo con los patrones de PM y tiene un pl más básico que la proteína de 80-90 kD. La figura 3b muestra la transferencia Western obtenida a partir de membranas incubadas con el anticuerpo de control de isotipo. En esta transferencia no aparecieron manchas visibles, lo que indica que la unión de H460-16-2 no era debida a la unión no específica. La figura 3c muestra un gel bidimensional teñido con SYPRO Ruby™ de proteínas de membrana MB-468. Cabe destacar que, cuando se efectúa una transferencia Western con membranas MB-231, sólo se observa la mancha de 80-90 kD (figura 4).

60 Ejemplo 2

Determinación de la glucosilación de antígenos unidos a H460-16-2

Con el fin de determinar si el/los antígeno(s) reconocido(s) por el anticuerpo H460-16-2 eran glucoproteínas, se incubaron membranas MB-231 con PNGasa F, endo- α -glucosidasa y sialidasa A de acuerdo con el protocolo del fabricante (kit de desglucosilación DeglycoPro; Prozyme, San Leandro, CA) durante 24 h a temperatura ambiente o a 37°C. Las membranas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 1-D como se describe y después se llevó a cabo una transferencia Western como se describe con H460-16-2.

ES 2 379 155 T3

Los resultados de la transferencia Western se muestran en la figura 5. En las membranas MB-468 que no se trataron con glucosidasas, H460-16-2 reconoció la banda de 85-95 kD esperada (figura 5, panel A, carril 2). En membranas tratadas con glucosidasas a 25°C, se observa un desplazamiento claro de esta banda a un peso molecular menor (carril 4). En membranas tratadas con glucosidasas a 37°C, se elimina la unión de H460-16-2 (carril 3). Con el fin de determinar que se había completado la desglucosilación, se sondó una transferencia similar con la lectina de alta unión a mañosa aglutinina de *galanthus nivalis* (GNA). Los resultados que se observan en la figura 5, panel B, demuestran que la desglucosilación es incompleta a 25°C (carril 4) y prácticamente completa a 37°C (carril 3). Por tanto, en condiciones de desglucosilación completa, H460-16-2 es incapaz de unirse a su antígeno.

En conjunto, estos resultados sugieren que la banda de 80-90 kD es una glucoproteína. Además, estos resultados aportan pruebas de que el epítipo reconocido por H460-16-2 es dependiente de carbohidrato.

Ejemplo 3

15 *Identificación de antígenos unidos por H460-16-2*

1. *Inmunoprecipitación*

Se lavó 1 ml de perlas de proteína G Dynabeads (DYNAL) 3 veces con tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,0. Se añadieron 2500 µg de H460-16-2 a las perlas lavadas en un volumen total de 500 µl. La mezcla se incubó mezclando suavemente durante 1 hora. El anticuerpo no unido se retiró y las perlas recubiertas con H460-16-2 se lavaron 3 veces en volúmenes de 2,5 ml de tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4 que contenía Tween-20 al 0,1 por ciento. Las perlas recubiertas con H460-16-2 se lavaron dos veces en 5 ml de trietanolamina 0,2 M, pH 8,2, seguido por la adición de 5 ml de H460-16-2 se entrecruzó químicamente con las perlas mezclando suavemente en presencia de 5 ml de trietanolamina 0,2 M, pH 8,2, que contenía pimelimidato de dimetilo 20 mM durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 5 ml de Tris 50 mM, pH 7,5. Después de 15 min de incubación, las perlas entrecruzadas con H460-16-2 se lavaron 3 veces en PBS que contenía Tween-20 al 0,1 por ciento. Las perlas entrecruzadas con H460-16-2 se pre-eluyeron mediante incubación con citrato 0,1 M, pH 3, durante 3 minutos seguido por 3 lavados en tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4 que contenía Tween-20 al 0,1 por ciento.

Se incubaron 3 mg de proteína de membrana total de células MB-231 con perlas químicamente entrecruzadas con H460-16-2 en tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4 que contenía Tween-20 al 0,1 por ciento, glucosa al 5 por ciento, mañosa al 5 por ciento, galactosa al 5 por ciento e inhibidores de proteasa a 4°C durante 4 h. Después de la incubación, el inmunoprecipitado se lavó 3 veces en PBS que contenía NaCl 150 mM y Tween-20 al 0,1 por ciento. La proteína se eluyó de las perlas incubando las perlas entrecruzadas con H460-16-2 con citrato 0,1 M, pH 3, durante 4 min. La proteína eluida se almacenó a -80°C. La proteína inmunoprecipitada a partir de 3 mg de proteína se cargó en un sólo carril de un gel de SDS-PAGE no reductor al 8 por ciento. Se hizo correr una muestra de marcadores de peso molecular previamente teñidos (Biorad; Mississauga, ON) en un carril de referencia. La muestra se separó por electroforesis a 100 V durante 10 min, seguido de 65 minutos a 150 V. Las proteínas se tiñeron con SYPRO Ruby™.

En una transferencia Western en paralelo, se separaron por electroforesis proteínas inmunoprecipitadas como se describe a partir de 100 µg de proteínas de membrana MB-231. Se transfirieron proteínas desde el gel a membranas de PVDF (Millipore; Billerica, MA) por electrotransferencia durante 16 h a 40 V. La transferencia cuantitativa se evaluó mediante la observación de la transferencia completa de los marcadores previamente teñidos desde el gel a la membrana.

Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con leche desnatada en polvo en solución salina tamponada con Tris que contenía Tween al 0,5 por ciento (TBST) al 5 por ciento durante 2 h. La membrana se sondó con 5 µg/ml de H460-16-2 diluido en leche desnatada en polvo en TBST al 3 por ciento durante 2 h. Después de lavar 3 veces con TBST, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario apropiado: IgG (Fe) anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) de Jackson Immunologicals (West Grove, PA) durante 1 h. A esta incubación le siguieron 3 lavados con TBST, seguidos por incubación con el sustrato de HRP TMB (kit de sustrato de Vector Laboratories; Burlington, ON).

La figura 6 representa el gel y la transferencia obtenidos a partir de las proteínas inmunoprecipitadas por H460-16-2. En el gel (panel A) se observa una banda en la región de 80-90 kD en el carril que contiene las proteínas inmunoprecipitadas (véase la flecha, carril 2). Las bandas de alto peso molecular están constituidas por anticuerpos intactos. No hay otras proteínas presentes en la muestra. En una transferencia Western correspondiente (panel B), H460-16-2 reacciona fuertemente con las proteínas inmunoprecipitadas (carril 2), con un perfil de unión similar al visto en las membranas totales (carril 1).

2. *Espectrometría de masas*

La región del gel correspondiente a la proteína de 80-90 kD inmunoprecipitada por H460-16-2 (figura 6, panel A, carril 2) se escindió usando una punta de pipeta estéril. Este tapón de gel se usó entonces para la identificación de proteínas mediante espectroscopia de masas.

ES 2 379 155 T3

La muestra se sometió a digestión en gel robótica usando tripsina (ProGest) y una parte del sobrenadante de digestión resultante se usó para análisis por MALDI/EM. El depósito de la muestra se llevó a cabo por medio de robots (ProMS) con ZipTips; los péptidos se eluyeron del material C18 con matriz (ácido α -ciano 4-hidroxicinámico) preparada en acetonitrilo al 60 por ciento, TFA al 0,2 por ciento. La muestra se analizó mediante nano CL/EM/EM en un Micromass Q-Tof2 usando una columna C18 de 75 μ m a un caudal de 200 nl/min. Los datos de EM/EM se buscaron usando una copia local de MASCOT.

Las proteínas identificadas mediante análisis CL/EM/EM del material inmunoprecipitado con H460-16-2 se presentan en la tabla 1. Se asignó una puntuación que es una puntuación compuesta basada en el número de péptidos coincidentes y el grado de identidad.

TABLA 1

Proteínas identificadas mediante inmunoprecipitación con H460-16-2 de membranas MDA-MB-231

PM observado	Procedimiento	ID de la proteína	Puntuación	N.º de acceso del NCBI
80-90 KD	CL/EM/EM	CD44	239	gi 2134882

La única proteína presente en la muestra coincidió con CD44 humano, una glucoproteína de 80 kD presente en la superficie celular de linfocitos y varios tipos de células cancerosas.

3. Confirmación

La confirmación del antígeno supuesto se llevó a cabo determinando si un anticuerpo monoclonal anti-CD44 reaccionaría con la proteína inmunoprecipitada por H460-16-2. Las proteínas de membrana total MB-231 y las proteínas inmunoprecipitadas con H460-16-2 se separaron mediante SDS-PAGE unidimensional. La electroforesis y la transferencia Western se llevaron a cabo como se describe anteriormente. Se incubaron las membranas con 5-10 μ g/ml de H460-16-2, anti-CD44 (clon L178, BD Biosciences, Oakville, ON) o anti-HSP90 (control negativo; clon 16F1 (Stressgen, Victoria, BC)) diluido en leche desnatada en polvo al 3 por ciento en TBST durante 2 h. La figura 7 muestra los resultados de la transferencia Western como se describe. El panel A muestra la unión de H460-16-2 a proteínas de membrana total (carril 1) y a proteínas inmunoprecipitadas (carril 2). La principal proteína de unión está en la región de 80-90 kD, aunque también puede verse una banda en la región de 120-150 kD en las proteínas de membrana total. Cuando se sondó una transferencia en paralelo con L178 (panel B), se vio un patrón similar. L178 se unió fuertemente a la proteína inmunoprecipitada por H460-16-2. el patrón de unión de H460-16-2 y L178 a las proteínas de membrana total es muy similar (paneles A y B, carril 1). Una transferencia en paralelo sondada con el control negativo anti-HSP90 (panel C) mostró que este anticuerpo no se unía al material inmunoprecipitado, aunque sí se unía a una proteína distinta de 90 kD de la preparación de membrana total. Este resultado confirma que la unión de anti-CD44 a la proteína inmunoprecipitada era específica y no debida a la presencia de proteínas contaminantes, ya que es HSP90 es una proteína chaperona celular ubicua y "pegajosa".

La figura 8 presenta los resultados de un experimento llevado a cabo para comparar la especificidad de H460-16-2 frente a anticuerpos anti-CD44 conocidos. Se separaron membranas MDA-MB-231 por electroforesis y se transfirieron a membranas de PVDF como se describe. Las membranas se sondaron con H460-16-2 (panel A), anti-CD44 (clon L178, BD Biosciences; panel B), anti-CD44var6 (clon VFF-7, Bender Medsystems (San Bruno, CA); panel C) y anti-CD44var10 (clon VFF-14, Bender Medsystems; panel D). H460-16-2 y L178 reaccionan con una proteína de 80-90 kD y 120-150 kD y presentan patrones de unión idénticos mediante transferencia Western. En contraste, los anticuerpos específicos para las variantes 6 y 10 de CD44 muestran una unión diferente de H460-16-2 y unos de otros. Ambos anticuerpos variantes se unen a variedad de proteínas más amplia y no muestran una unión fuerte a la región de 80 kD del gel. Por lo tanto, es poco probable que H460-16-2 se dirija hacia la variante 6 o la variante 10.

La identificación por espectroscopia de masas, así como la confirmación usando un anticuerpo conocido, demuestra que el antígeno frente a H460-16-2 es una forma de CD44. Esto también es coherente con los experimentos de desglucosilación del ejemplo 2, ya que CD44 puede contener alrededor del 50 por ciento en peso de azúcares enlazados en N. Estos experimentos también indican que H460-16-2 se une a un epítipo de CD44 dependiente de carbohidrato.

Ejemplo 4

La línea celular de hibridoma H460-16-2 se depositó, de conformidad con el Tratado de Budapest, en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 sobre el 4 de septiembre de 2002, con el número de acceso PTA-4621. De conformidad con el 37 CFR 1.808, los depositantes aseguran que todas las restricciones impuestas sobre la disponibilidad para el público de los materiales depositados se retirarán irrevocablemente tras la concesión de una patente.

Producción de anticuerpos

El anticuerpo monoclonal se preparó cultivando los hibridomas en matraces CL-1000 (BD Biosciences, Oakville, ON) produciéndose las recolecciones y las nuevas siembras dos veces por semana y con procedimientos de purificación de anticuerpo estándar con Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, Bale d'Urfé, QC). La utilización de anticuerpos monoclonales que son anticuerpos humanos, humanizados, quimerizados o murinos está dentro del alcance de esta invención. H460-16-2 se comparó con una serie de controles tanto positivos (anti-Fas (EOS9.1, IgM, kappa, 10 µg/ml, eBioscience; San Diego, CA), anti-Her2/neu (IgG1, kappa, 10 µg/ml, Inter Medico; Markham, ON), anti-EGFR (C225, IgG1, kappa, 5 µg/ml, Cedarlane; Homby, ON), cicloheximida (100 µM, Sigma; Oakville, ON), NaN₃ (al 0,1 por ciento, Sigma; Oakville, ON)) como negativos (107.3 (anti-TNP, IgG1, kappa, 20 µg/ml, BD Biosciences; Oakville, ON), G155-178 (anti-TNP, IgG2a, kappa, 20 µg/ml, BD Biosciences; Oakville, ON), MPC-11 (especificidad antigénica desconocida, IgG2b, kappa, 20 µg/ml, BD Biosciences; Oakville, ON), J606 (anti-fructosano, IgG3, kappa, 20 µg/ml, BD Biosciences; Oakville, ON), tampón de IgG (al 2 por ciento)) en un ensayo de citotoxicidad (tabla 3). Se sometieron a ensayo líneas celulares de cáncer de mama (MB-231, MB-468), melanoma (A2058, A3 75), cáncer de colon (HT-29), cáncer de pulmón (NCI-H460, A549), cáncer de ovario (OVCAR-3), cáncer de próstata (PC-3) y no cancerosas (CCD-27sk, Hs578.Bst, Hs888.Lu) (todas de la ATCC, Manassas, VA). El ensayo de citotoxicidad Live/Dead se obtuvo de Molecular Probes (Eugene, OR). Los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante con los cambios que se exponen a continuación. Las células se plaquearon antes del ensayo a la densidad apropiada predeterminada. Después de 2 días, se diluyeron 100 µl de anticuerpo purificado en medios y después se transfirieron a placas de células y se incubaron en una incubadora con CO₂ al 5 por ciento durante 5 días. Después, la placa se vació por inversión y secó con tejido absorbente. Se dispensó DPBS a temperatura ambiente que contenía MgCl₂ y CaCl₂ en cada pocillo desde una botella multicanal comprimible, se golpearon 3 veces, se vaciaron por inversión y después se secaron con tejido absorbente. 50 µl del tinte Live/Dead fluorescente diluido en DPBS que contenía MgCl₂ y CaCl₂ se añadieron a cada pocillo y se incubaron a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5 por ciento durante 30 min. Las placas se leyeron en un lector de placas de fluorescencia Perkin-Elmer HTS7000 y los datos se analizaron en Microsoft Excel y los resultados se tabularon en la tabla 2. Los datos representaban una media de 4 experimentos probados por triplicado y se presentaron cualitativamente de la manera siguiente: 4/4 experimentos superiores al umbral de citotoxicidad (+++), 3/4 experimentos superiores al umbral de citotoxicidad (++) , 2/4 experimentos superiores al umbral de citotoxicidad (+). Las células no marcadas de la la tabla 2 representaban incoherencias o efectos inferiores al umbral de citotoxicidad. El anticuerpo H460-16-2 produjo citotoxicidad selectiva en células de melanoma A2058 y células de cáncer de mama MB-231, pero no produjo citotoxicidad contra el resto de las células cancerosas, mostrando de citotoxicidad específica frente a las células cancerosas. De forma importante, el anticuerpo aislado no produjo citotoxicidad contra una serie de células no cancerosas tales como CCD-27sk, Hs578.Bst o Hs888.Lu. Los agentes citotóxicos químicos indujeron su citotoxicidad esperada, mientras de una serie de otros anticuerpos que se incluyeron para su comparación también se comportaron como se esperaba, dadas las limitaciones de los ensayos celulares biológicos.

TABLA 2

Citotoxicidad *in vitro*

		Melanoma		Mama		Pulmón		Colon	Ovario	Próstata	Normal		
		A2058	A375	MB-231	MB-46B	NCI-H460	A549	HT-29	OVCAR-3	PC-3	CCD-27sk	t	Hs888.Lu
H460-16-2 (20 µg/ml)		+		+									
Controles positivos	Anti-Fas (20 µg/ml)	++	+++						+++				
	Anti-Her2/neu (10 µg/ml)								++				
	Anti-EGFR (c528, 5 µg/ml)				+								
Cicloheximida (100 µM)		+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
Controles negativos	IgG1 (107.3, 20 µg/ml)												
	IgG humana (10 µg/ml)												
	Tampón de IgG (al 2 %)									+			

Las células se prepararon mediante FACS, lavando inicialmente la monocapa de células con DPBS (sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺). Después, se usó tampón de disociación celular (INVITROGEN; Burlington, ON) para desprender las células de sus placas de cultivo a 37°C. Después de la centrifugación y la recogida, las células se resuspendieron en DPBS que contenía MgCl₂, CaCl₂ y de suero fetal bovino al 25% a 4°C (medios de lavado) y se realizó el recuento, alicuotaron a la densidad celular apropiada, se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en medio de tinción (DPBS que contenía MgCl₂, CaCl₂ y suero fetal bovino al 2%) a 4°C en presencia de anticuerpos de ensayo (H460-16-2) o

ES 2 379 155 T3

anticuerpos de control (control de isotipo, anti-Her2 o anti-EGFR/neu) a 20 µg/ml en hielo durante 30 minutos. Antes de la adición del anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488, se lavaron las células una vez con medios de lavado. Después se añadió el anticuerpo conjugado con Alexa Fluor 488 en medios de tinción durante 20 min. Después, las células se lavaron por última vez y se resuspendieron en medios de tinción que contenían 1 µg/ml de yoduro de propidio. Se evaluó la adquisición por citometría de flujo de las células pasando muestras por un escáner de FACS usando el programa Informático CellQuest (BD Biosciencias; Oakville, ON). Las dispersiones frontal (FSC) y lateral (SSC) de las células se establecieron ajustando las ganancias de amplitud y voltaje en los detectores de FSC y SSC. Los detectores para los tres canales de fluorescencia (FL1, FL2 y FL3) se ajustaron haciendo pasar células teñidas con anticuerpo de control de isotipo purificado seguido de anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488, de forma que las células tuvieran un pico uniforme con una intensidad de fluorescencia media de aproximadamente 1-5 unidades. Las células vivas se adquirieron mediante control de paso para FSC y exclusión con yoduro de propidio. Para cada muestra, se adquirieron aproximadamente 10.000 células vivas para su análisis y los resultados se presentan en la tabla 3.

La tabla 3 tabuló el número de veces que se incrementa la intensidad de fluorescencia media con respecto al control de isotipo y se presenta cualitativamente como: menos de 5 (-); 5 a 50 (+); 50 a 100 (++)

TABLA 3

Análisis de FACS

Anticuerpo	NCI-H460	A549	Hs888.Lu	HT-29	PC-3	OVCAR-3	A375	A2058	CCD-27sk	MB-231	MB-468	Hs578.Bst
Anti-EGFR	+ (100 %)	+ (100 %)	++	++	+ (98 %)	++	+ (99 %)	-	+ (98 %)	+++	+++	+ (97 %)
Anti-HER2/neu	-	-	-	+ (32 %)	-	+ (43 %)	+ (67 %)	+ (31 %)	-	+ (22 %)	-	-
Anti-Fas	-	-	+ (48 %)	+ (5 %)	-	-	-	-	+ (9 %)	-	-	+ (4 %)
H460-16-2	+ (100 %)	++	+++	++	++	+ (33 %)	+++	+++	++	+++	+++	+++

más de 100 (+++) y, entre paréntesis, el porcentaje de células teñidas. Se confeccionaron gráficas representativas de los anticuerpos H460-16-2 para la figura 9 y pruebas de las características de unión, que incluían picos bimodales ilustrados en algunos casos. H460-16-2 se unión 100 veces más que el control de isotipo a una serie de tipos de células cancerosas, incluyendo células de melanoma y de cáncer de mama, de 5 a 100 veces a células de cáncer de pulmón, colon, próstata y ovario. Se observó unión de anticuerpos H460-16-2 a células no cancerosas, aunque esa unión no produjo citotoxicidad. Esto fue la prueba de que la unión no predecía necesariamente el resultado de la unión de anticuerpo a su antígeno afín y fue un descubrimiento no evidente. Esto sugirió que el contexto de la unión del anticuerpo en diferentes células fue determinante de la citotoxicidad en lugar de simplemente la unión del anticuerpo.

Ejemplo 5

Tinción de tejido humano normal

Se llevaron a cabo previamente estudios de IHQ para caracterizar la distribución del antígeno de H460-16-2 en seres humanos (documento WO2004/112834). Los presentes estudios comparan H460-16-2 con un anticuerpo dirigido contra CD44 (L178), ya que el antígeno de H460-16-2 puede ser una variante cancerosa de la forma estándar de CD44, como se determina anteriormente mediante procedimientos bioquímicos. Se realizó la unión de anticuerpos a 59 tejidos humanos normales usando un conjunto de tejidos de órganos normales humanos (Imgenex, San Diego, CA). Todos los anticuerpos primarios (H460-16-2; L178 anti-CD44 (también conocido como anti-HCAM, BD PharMingen, Oakville, ON); y el control negativo de IgG1 de ratón (Dako, Toronto, ON)) se diluyeron en tampón de dilución de anticuerpo (Dako, Toronto, ON) hasta una concentración de 5 µg/ml (que se descubrió que era la concentración óptima en etapas de optimización anteriores). El fabricante ha demostrado que el anticuerpo de control negativo es negativo para todos los tejidos de mamíferos. El procedimiento para la IHQ es el siguiente.

Se desparafinaron secciones de tejido secándolas en un horno a 58°C durante 1 hora y quitándoles la cera por inmersión en xileno 5 veces durante 4 minutos cada una en cubetas Coplin. Tras el tratamiento a través de una serie de lavados graduados con metanol (100%-75%), las secciones se rehidrataron en agua. Se sumergieron los portaobjetos en tampón de citrato 10 mM a pH 6 (Dako, Toronto, Ontario), después se calentaron en el microondas en configuraciones de potencia alta, media y baja durante 5 minutos cada una y, finalmente se sumergieron en PBS frío. Después, los portaobjetos se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 6 minutos, se lavaron con PBS tres veces durante 5 minutos cada uno, se secaron, se incubaron con solución de bloqueo Universal (Dako, Toronto, Ontario) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se diluyeron H460-16-2, L178 o anticuerpo de control isotipo (dirigido contra la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, un enzima que ni está presente ni es inducible en tejidos de mamíferos) en tampón de dilución de anticuerpo (Dako, Toronto, Ontario) hasta su concentración de trabajo (5

ES 2 379 155 T3

$\mu\text{g/ml}$ para cada anticuerpo) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron con PBS 3 veces durante 5 minutos cada uno. Se detectó/visualizó la inmunorreactividad de los anticuerpos primarios con anticuerpos secundarios conjugados con HRP como se suministran (Dako Envision System, Toronto, Ontario) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras esta etapa se lavaron los portaobjetos con PBS 3 veces durante 5 minutos cada uno y se desarrolló una reacción de color añadiendo una solución de sustrato cromógeno DAB (tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina, Dako, Toronto, Ontario) para tinción de inmunoperoxidasa durante 10 minutos a temperatura ambiente. El lavado de los portaobjetos con agua corriente terminó la reacción cromogénica. Tras la contratinción con hematoxilina de Mayer (Sigma Diagnostics, Oakville,.), los portaobjetos se deshidrataron con etanoles graduados (75-100%) y se limpiaron con xileno. Los portaobjetos se taparon con cubreobjetos usando medios de montaje (Dako Faramount, Toronto, Ontario). Los portaobjetos se examinaron al microscopio usando un Axiovert 200 (Zeiss Cañada, Toronto, ON) y se adquirieron y almacenaron imágenes digitales usando el programa informático Eclipse Imaging (Mississauga, ON). Los resultados se leyeron, se puntuaron y se interpretaron por un patólogo.

La tabla 4 presenta un resumen de los resultados de la tinción con H460-16-2 y L178 anti-CD44 de un conjunto de tejidos humanos normales. La tinción de los tejidos con H460-16-2 es similar a la descrita previamente (documento WO2004/112834). De nuevo, cabría señalar que, generalmente, el antígeno no está presente en células de los órganos vitales, incluyendo el hígado, el riñón, el corazón y los pulmones. El anticuerpo H460-16-2 no se une a macrófagos y linfocitos y su presencia se observa en algunos de los órganos de estas secciones. No obstante, se observó una distribución más amplia y una intensidad mayor de la tinción de linfocitos con el anticuerpo L178 anti-CD44 (figura 10).

Los tejidos que fueron positivos para H460-16-2 también fueron positivos habitualmente para L178 anti-CD44 (a veces con una intensidad mayor). Los tejidos que fueron negativos para H460-16-2 también fueron negativos generalmente para L178 anti-CD44, aunque existen algunas excepciones, tales como una muestra de hígado (figura 11) y esófago. Estos resultados demuestran que H460-16-2 se une a un subgrupo ligeramente más pequeño de los tejidos reconocidos por el anticuerpo L178 anti-CD44 y dentro de los tejidos la intensidad de la tinción también es a veces menor. Estos resultados muestran que el antígeno frente a H460-16-2 no se expresa ampliamente en tejidos normales y que el anticuerpo se une específicamente a un número limitado de tejidos en seres humanos. También respalda los datos bioquímicos respecto a que H460-16-2 se dirige contra un epítipo de CD44, aunque a una variante ligeramente diferente de la reconocida por el L178 usada para estos estudios de IHQ.

TABLA 4

Comparación de la IHQ de L178 anti-CD44 y H460-16-2 en tejido humano normal.

Abreviaturas: *: Estrato basal pigmentado original, **: Pigmento citoplásmico endógeno/tinción de fondo, ***: Antro pilórico del estómago (no el cuerpo del estómago), ****: Sólo estroma oválico, FML: Fibras de músculo liso, NR: La sección no es representativa, CD: La sección está completamente desprendida, PD: La sección está parcialmente desprendida

N.º de sección	Órgano	Anti-CD44	H-160-16-2	Control de isotipo
1	*Piel	+++ Queratinocitos de todas las capas epidérmicas, fibroblastos, FML de vasos sanguíneos	++ Queratinocitos de todas las capas epidérmicas, fibroblastos	
2	*Piel	+++ Queratinocitos de todas las capas epidérmicas, fibroblastos	+++ Queratinocitos de todas las capas epidérmicas, fibroblastos	
3	Grasa subcutánea	-	-	-
4	Mama	+/- Epitelio ductular, mioepitelio y fibroblastos	+ Mioepitelio	
5	Mama	+++ Mioepitelio y fibroblastos	++ Mioepitelio y fibroblastos	-
6	Bazo	+++ Linfocitos, predominantemente en la zona periarteriolar	++ Linfocitos, predominantemente en la zona periarteriolar	
7	Bazo	+++ Linfocitos, predominantemente en la zona periarteriolar	+++ Linfocitos, predominantemente en la zona periarteriolar	
8	Ganglio linfático	+++ Linfocitos	+ linfocitos	-
9	Ganglio linfático	-	-	-
10	Músculo esquelético	+/- Vasos sanguíneos	+/- Vasos sanguíneos	-
11	Mucosa nasal	- NR	CD	CD
12	Pulmón	+++ Macrófagos y fibroblastos	++ Macrófagos	-
13	Pulmón	+++ Pneumocitos, linfocitos y macrófagos	+++ Linfocitos y macrófagos	
14	Bronquios	- NR	-NR	-NR

ES 2 379 155 T3

TABLA 4 (continuación)

N.º de sección	Órgano	Anti-CD44	H-160-16-2	Control de isotipo
5	15	Corazón	**	**
	16	Glándula salival	+++ Epitelio acinar y ductal, + nervio periférico	++ Epitelio acinar y ductal, + nervio periférico
	17	Hígado	+++ Células de Kupffer	+++ Células de Kupffer
10	18	Hígado	+++ Células de Kupffer	-
	19	Hígado	++ Células de Kupffer	-
	20	Vesícula biliar	+++ Epitelio mucoso, linfocitos, fibroblastos y FML	+ Epitelio mucoso, +++ linfocitos
	21	Páncreas	+ Epitelio acinar	-
15	22	Páncreas	+++ Epitelio acinar	++ Epitelio acinar
	23	Amígdala	+++ Linfocitos en todos los ganglios linfáticos	++ Linfocitos principalmente en la zona del manto
	24	Esófago	+ Epitelio escamoso en capas basales y Fibroblastos	
20	25	Esófago	+++ Epitelio escamoso en capas basales y Fibroblastos	+++ Epitelio escamoso en capas basales y fibroblastos
	26	***Cuerpo del estómago	+++ Epitelio glandular gástrico en partes basales de las glándulas y linfocitos	++ Epitelio glandular gástrico en partes basales de las glándulas, +++ linfocitos
25	27	***Cuerpo del estómago	+++ Epitelio glandular gástrico en partes basales de las glándulas y linfocitos	+/- Epitelio glandular gástrico en partes basales de las glándulas, +++ linfocitos
	28	Antro pilórico del estómago	+++ Linfocitos y fibroblastos	+++ Linfocitos y fibroblastos
30	29	Músculo liso del estómago	++ Vasos sanguíneos y fibroblastos	++ Vasos sanguíneos y Fibroblastos
	30	Duodeno	+++ Epitelio glandular en partes más profundas de las glándulas y linfocitos	+/- Epitelio glandular en partes más profundas de las glándulas, ++ linfocitos
35	31	Intestino delgado	+/- Epitelio glandular en partes más profundas de las glándulas, +++ linfocitos de la lámina propia	++ Linfocitos de la lámina propia
	32	Intestino delgado	+++ Linfocitos principalmente en la zona del manto de los ganglios linfáticos	+++ Linfocitos principalmente en la zona del manto de los ganglios linfáticos
40	33	Apéndice	++ Epitelio glandular, +++ linfocitos	+/- Epitelio mucoso, +++ linfocitos
	34	Colon	+/- Epitelio glandular, +++ linfocitos, FML y células ganglionares	+++ Linfocitos
45	35	Colon	+++ Linfocitos, Células ganglionares y Endotelio de los vasos sanguíneos	+++ Linfocitos de la lámina propia y zona del manto de ganglios linfáticos
	36	Recto	+++ Linfocitos y Fibroblastos	+++ Linfocitos y fibroblastos
50	37	Corteza renal	+ Endotelio de los vasos sanguíneos y fibroblastos intersticiales	+/- Fibroblastos intersticiales
	38	Corteza renal	+/- Epitelio tubular y fibroblastos intersticiales	+/- Epitelio tubular y fibroblastos intersticiales
	39	Médula renal	++ FML y fibroblastos	+/- FML y fibroblastos
55	40	Vejiga urinaria	+++ Epitelio transicional superficial, linfocitos y macrófagos	+/- Epitelio transicional, ++ linfocitos y macrófagos
	41	Próstata	+++ Mioepitelio	+/- Epitelio glandular, +++ mioepitelio
	42	Próstata	+++ Mioepitelio y fibroblastos	++ Mioepitelio
60	43	Vesícula seminal	+/- Epitelio mucoso, +++ SMA longitudinal exterior del músculo externo	+/- Epitelio mucoso, +++ SMA longitudinal exterior del músculo externo
	44	Testículos	+/- Vasos sanguíneos intersticiales y fibroblastos	+/- Fibroblastos intersticiales
65	45	Endometrio proliferador	+++ Fibroblastos estromales	++ Fibroblastos estromales
	46	Endometrio secretor	+++ Epitelio glandular y estroma	++ Epitelio glandular y estroma

TABLA 4 (continuación)

N.º de sección	Órgano	Anti-CD44	H-160-16-2	Control de isotipo
47	Miometrio	+++ FML y fibroblastos	+++ FML	-
48	Cuello uterino	+++ Epitelio escamoso en capas más profundas y Fibroblastos	+++ Epitelio escamoso en capas más profundas y fibroblastos	
49	Trompa de Falopio	+ Fibroblastos y FML	+ Fibroblastos y FML	-
50	****Ovario	+/- FML de vasos sanguíneos	+/- FML de vasos sanguíneos	-
51	Vellosidades placentarias	++ Endotelio de vasos sanguíneos	+/- Endotelio de vasos sanguíneos	-
52	Vellosidades placentarias	++ Endotelio de vasos sanguíneos	+/- Fibroblastos	-
53	Cordón umbilical	-	-	-
54	Glándula suprarrenal	**+/-	**+/-	**+/-
55	Tiroides	+/- Vasos sanguíneos y células parafoliculares	+/- Vasos sanguíneos y Células parafoliculares	-
	Timo	+ Linfocitos	+/- Linfocitos	- PD
57	Sustancia blanca del cerebro	-	-	-
58	Sustancia gris del cerebro	-	-	-
59	Cerebelo	-	-	-

Ejemplo 6

Tinción de tejido tumoral de mama humano

Se llevó a cabo un estudio de IHQ previo para determinar la asociación cancerosa del antígeno de H460-16-2 con cánceres de mama humanos y si era probable que el anticuerpo frente a H460-16-2 reconociera cánceres humanos (documento WO2004/112834). Actualmente, se realizó una comparación de la tinción de L178 anti-CD44 y un anticuerpo dirigido a la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, un enzima que ni está presente ni es inducible en tejidos de mamíferos (control negativo). Se usó un conjunto de tejido de cáncer de mama derivado de 50 pacientes con cáncer de mama y 9 muestras derivadas de tejido de mama no neoplásico de pacientes con cáncer de mama (Imgenex Corporation, San Diego, CA). Se proporcionó la información siguiente para cada paciente: edad, sexo, estadio del tumor de acuerdo con el American Joint Comitee on Cancer (AJCC) y estado de los ganglios linfáticos, receptor de estrógenos (RE) y receptor progesterona (RP). Se siguió el procedimiento del ejemplo 5 para la IHQ. Todos los anticuerpos se usaron a una concentración de trabajo de 5 µg/ml.

Las tablas 5 y 6 proporcionan resúmenes de la tinción con anticuerpos H460-16-2 y L178 anti-CD44 de conjuntos de tejido de cáncer de mama, respectivamente. Cada conjunto contenía muestras tumorales de 50 pacientes individuales. En general, el 62 por ciento de los 50 pacientes sometidos a ensayo fueron positivos para el antígeno de H460-16-2 en comparación con el 76 por ciento para CD44. En los casos en que tanto H460-16-2 como L178 anti-CD44 tiñeron el mismo tejido, un 43% de las muestras mostraron una tinción de intensidad mayor con el L178 anti-CD44 en comparación con H460-16-2. Tanto para el antígeno de H460-16-2 como para el de CD44, sólo 4 y 6 de 10 muestras de tejido de mama normal de pacientes con cáncer de mama fueron positivas, respectivamente. No resultó evidente ninguna correlación clara entre el estado del receptor de estrógeno y el de progesterona. Asimismo, no pareció que existiera una tendencia a una expresión positiva mayor del antígeno de H460-16-2 y de CD44 con estadios tumorales superiores.

ES 2 379 155 T3

TABLA 5

Resumen de la IHQ de tumores de mama humanos para H460-16-2

		N.º total	Puntuación de unión					Positivos totales	% de positivos
			-	+/-	+	++	+++		
Muestras de los pacientes	Tumor	50	19	19	4	3	5	31	62
	Normal	10	0	1	0	2	1	4	40
Estado del RE	RE+	28	13	13	1	1	0	15	54
	RE-	22	6	8	3	0	5	16	73
	Desconocido	0	0	0	0	0	0	0	0
Estado del RP	RP+	19	9	8	1	1	0	10	53
	RP-	30	8	14	3	0	5	22	73
	Desconocido	1	0	1	0	0	0	1	100
Estadio del tumor según el AJCC	T1	4	2	1	1	0	0	2	50
	T2	21	6	9	1	1	4	15	71
	T3	20	9	9	1	0	1	11	55
	T4	5	2	2	1	0	0	3	60

TABLA 6

Resumen de la IHQ de tumores de mama humanos para anti-CD44 (L178)

		N.º total	-	+/-	+	++	+++	Positivos totales	% de positivos
Muestras de los pacientes	Tumor	50	12	20	3	7	8	39	78
	Normal	10	4	1	0	3	2	6	60
Estado del RE	RE+	28	7	14	1	4	2	21	75
	RE-	22	5	6	2	3	6	17	77
	Desconocido	0	0	0	0	0	0	0	0
Estado del RP	RP+	19	5	9	1	2	2	14	74
	RP-	30	7	10	2	5	6	23	77
	Desconocido	1	0	1	0	0	0	1	100
Estadio del tumor según el AJCC	T1	4	1	2	0	0	1	3	75
	T2	21	5	6	2	2	6	16	76
	T3	20	6	9	1	3	1	14	70
	T4	5	0	3	0	2	0	5	100

La tinción de H460-16-2 fue específica para células cancerosas en comparación con células normales como se ha demostrado en la figura 12, donde las células estromales eran claramente negativas y las láminas de células malignas eran altamente positivas. El patrón de localización celular visto con antígeno de H460-16-2 se limitaba a la membrana celular en la mayoría de los casos. El anticuerpo L178 frente a CD44 tiñó más muestras de cáncer de mama y mostró un grado mayor de localización en membrana que citoplásmico en comparación con H460-16-2 (tabla 7). El L178 anti-CD44 también tiñó células malignas de enfermedad de Paget, lo cual no fue el caso para H460-16-2 (figura 13). El L178 anti-CD44 tiñó las mismas muestras de tejido normal de pacientes con cáncer de mama que H460-16-2 (más 1 que estaba parcialmente desprendida para la muestra de H460-16-2). Estos resultados sugieren que el antígeno frente a H460-16-2 puede expresarse en casi dos tercios de los pacientes con cáncer de mama. El patrón de tinción mostró que en muestras de pacientes, el anticuerpo es muy específico para células malignas y el antígeno de H460-16-2 se localiza en la membrana celular, lo que lo convierte en una diana farmacológica atractiva. La tinción similar, aunque más limitada, de anticuerpos H460-16-2 frente a L178 anti-CD44 demuestra de nuevo la probabilidad de que de que el epítipo de H460-16-2 sea una variante de CD44 más restringida.

ES 2 379 155 T3

TABLA 7

Comparación de la IHQ de L178 anti-CD44 y H460-16-2 en tejido de mama normal y tumoral humano.
 Abreviaturas: *: Tejido de mama no neoplásico en pacientes con cáncer de mama, PD: La sección está parcialmente desprendida, M: Tinción de membrana, C: Tinción citoplásmica

N.º de sección	Sexo	Edad	Diagnóstico	Anti-CD44	H460-16-2	Control de isotipo
1	F	28	Carcinoma ductal infiltrante	+/-	+/-	-
2	F	71	Carcinoma papilar sólido	++M	4A	-
3	F	26	Carcinoma ductal infiltrante	+/-	-	-
4	F	43	Carcinoma ductal infiltrante	+/-	-	-
5	F	39	Carcinoma ductal infiltrante	+/-	+/- Tumor y zona necrótica	-
6	F	46	Carcinoma ductal in situ	+/-	-	-
7	F	47	Carcinoma ductal infiltrante	+++ M	+++ M	-
8	M	67	Carcinoma ductal infiltrante	- Tumor, + sólo estroma	-	-
9	F	33	Carcinoma ductal infiltrante	- Tumor, ++ sólo estroma	- Tumor, ++ estroma	-
10	F	47	Carcinoma ductal infiltrante	+/-	+/-	-
11	F	49	Carcinoma lobular invasivo	- Tumor, ++ linfocitos infiltrantes	-	-
12	F	46	Carcinoma ductal infiltrante	++M	+/-	-
13	F	39	Carcinoma ductal infiltrante	+/-	-	-
14	F	43	Carcinoma lobular infiltrante	+ MC	+/-	-
15	F	54	Carcinoma lobular infiltrante	- Tumor, + estroma	+/-	-
16	F	58	Carcinoma ductal infiltrante	++ M Tumor, +++ estroma	+ MC Tumor, ++ zona necrótica	-
17	F	37	Carcinoma ductal infiltrante	- Tumor, + estroma	+/-	-
15	F	43	Carcinoma ductal infiltrante	++ M Tumor, +++ estroma	+ MC Tumor, +++ estroma	-
19	F	51	Carcinoma ductal infiltrante	+++ M	++M	-
20	F	80	Carcinoma medular	+++ M	+++ MC	-
21	F	36	Carcinoma ductal infiltrante	+++ M	+++ M	-
22	F	59	Carcinoma ductal infiltrante	+/- Tumor, ++ estroma	+/- Tumor, ++ estroma	-
23	F	34	Carcinoma ductal in situ	+/-	+/- Tumor y zona necrótica	-
24	F	54	Carcinoma ductal infiltrante	+/-	+/-	-
25	F	47	Carcinoma ductal infiltrante	+++ M	+/-	-
26	F	53	Carcinoma ductal infiltrante	+ Tumor, +++ estroma	- Tumor, ++ estroma	-
27	F	59	Carcinoma ductal infiltrante	+/- Tumor, +++ linfocitos	+/- Tumor, +++ linfocitos	-
28	F	60	Carcinoma de células en anillo de sello	- Tumor, +/- estroma	-	-
29	F	37	Carcinoma ductal infiltrante	+/-	+/-	-
30	F	46	Carcinoma ductal infiltrante	++ Tumor, +++ linfocitos infiltrantes	+/- Tumor y estroma	-
31	F	35	Carcinoma ductal infiltrante	+/-	-	-
32	F	47	Carcinoma ductal infiltrante	- Tumor, ++ células necróticas	- Tumor, +/- células necróticas	-

ES 2 379 155 T3

N.º de sección	Sexo	Edad	Diagnóstico	Anti-CD44	H460-16-2	Control de isotipo	
5	33	F	54	Carcinoma ductal infiltrante	+/- Tumor y estroma	-	-
	34	F	47	Carcinoma ductal infiltrante	+++ M	+++ M	-
	35	F	41	Carcinoma ductal infiltrante	-	-	-
10	36	F	38	Carcinoma ductal infiltrante	++M	+/-	-
	37	F	55	Carcinoma ductal infiltrante	- Tumor, +/- estroma	-	-
15	38	F	65	Carcinoma ductal infiltrante	- Tumor, ++ estroma	+/- estroma	-
	39	M	66	Carcinoma ductal infiltrante	-	-	-
	40	F	44	Carcinoma ductal infiltrante	+/-	- Tumor,+ linfocitos infiltrantes	-
20	41	F	52	Carcinoma metastásico en ganglios linfáticos	+/- Tumor, +++ linfocitos infiltrantes	+/- Tumor y estroma	-
	42	F	32	Carcinoma metastásico en ganglios linfáticos	+/-	-	-
25	43	F	58	Carcinoma metastásico en ganglios linfáticos	++M	+ MC	-
	44	F	52	Carcinoma metastásico en ganglios linfáticos	-	-	-
	45	F	58	Carcinoma metastásico en ganglios linfáticos	+/-	+/-	-
30	46	F	38	Carcinoma metastásico en ganglios linfáticos	+/- Tumor, +++ linfocitos infiltrantes	- Tumor, + linfocitos	-
	47	F	45	Carcinoma metastásico en ganglios linfáticos	+++ M	+ MC	-
35	48	F	45	Carcinoma metastásico en ganglios linfáticos	+ M	+/-	-
	49	F	29	Carcinoma metastásico en ganglios linfáticos	+++ M	+++ M	-
	50	F	61	Carcinoma metastásico en ganglios linfáticos	+/- Tumor, ++ estroma	+/- Tumor, ++ estroma	-
40	*51	F	46	Pezón	+++ Queratinocitos	++ Queratinocitos	-
	*52	F	47	Pezón	+/- Células tumorales	-	-
	*53	F	40	Mama normal	-	-	-
	*54	F	43	Mama normal	++ Mioepitelio	+++ Mioepitelio	-
45	*55	F	40	Mama normal	++ Mioepitelio	++ Mioepitelio	-
	*56	F	40	Mama normal	+++ Mioepitelio y fibroblastos	+/- Mioepitelio y fibroblastos	-
	*57	F	45	Mama normal	-	-	-
	*58	F	44	Mama normal	-	-	-
	*59	F	37	Mama normal	-	-	-
50	60	F	51	Mama normal	++ Mioepitelio y fibroblastos	- PD	-

Ejemplo 7

Tinción de tejido tumoral humano

Para determinar si el antígeno de H460-16-2 se expresa en otros tejidos cancerosos humanos además del cáncer de mama, se usó previamente H460-16-2 en un conjunto múltiple de tejido tumoral humano (documento WO2004/112834: Imgenex, San Diego, CA). Para proseguir con esos estudios, se comparó el patrón de tinción de H460-16-2 con el de L178 anti-CD44. Se proporcionó la información siguiente para cada paciente: edad, sexo, órgano y diagnóstico. El procedimiento de tinción usado fue el mismo que el que se expone en el ejemplo 5. Se usó el mismo anticuerpo de control negativo que se describe para el conjunto de tejido tumoral mamario humano. Todos los anticuerpos se usaron a una concentración de trabajo de 5 µg/ml.

Como se expone en la tabla 8, H460-16-2 tiñó una serie de diversos cánceres humanos además del de mama con resultados coherentes con los descritos previamente (documento WO2004/112834). Como se vio con los cánceres de mama, la tinción con H460-16-2 se localizó en la membrana (figura 14) y en algunos de los cánceres también dentro

ES 2 379 155 T3

del citoplasma de células cancerosas. El anticuerpo L178 anti-CD44 mostró una mayor tinción de la membrana frente a citoplásmica, de nuevo con un mayor porcentaje de tejido tumoral con tinción positiva y una mayor intensidad que la observada con H460-16-2 (figura 15).

TABLA 8

Comparación de la IHQ de L178 anti-CD44 y H460-16-2 en múltiples tipos de tumores humanos.

Abreviaturas: M: Tinción de membrana, C: Tinción citoplásmica, *: Tinción de fondo, CD: La sección está completamente desprendida, PD: La sección está parcialmente desprendida, P: La sección está plegada, CCE: Carcinoma de células escamosas, CHC: Carcinoma hepatocelular

N.º de sección	Edad	Sexo	Órgano	Diagnóstico	Anti-CD44	H460-16-2	Control de isotipo
1	59	M	Piel	Melanoma maligno	+++ M	+++ M	-
2	25	F	Piel	CCE	+/-	-	-
3	50	F	Mama	Carcinoma ductal infiltrante	+++ Tumor y estroma	+ Tumor, +++ estroma	-
4	57	F	Mama	Carcinoma papilar invasivo.	+/- Tumor y estroma	+/- Tumor y estroma	-
5	35	F	Mama	Carcinoma lobular infiltrante	+ M	+/-	-
6	40	M	Ganglios linfáticos	Linfoma maligno inmunoblástico	+++ M	+++ M	-
7	58	M	Ganglios Linfáticos	Adenocarcinoma metastásico del estómago	+++ M	+/-	-
8	53	F	Hueso	Osteosarcoma	+++ M	+ M/C	-
9	26	M	Hueso	Tumor de células gigantes	++M	+ M/C	-
10	40	M	Hueso	Condrosarcoma	CD	CD	CD
11	51	F	Tejidos blandos	Liposarcoma	-	-	-
12	47	F	Tejidos blandos	Neurofibromatosis	++ M/C	+ M/C	-
13	74	M	Cavidad nasal	Papiloma invertido	+++ M	++M	-
14	57	M	Laringe	CCE	+++ M	+++ M	-
15	60	M	Pulmón	Adenocarcinoma	+++ M	+/-	-
16	51	F	Pulmón	CCE	+++ M	+++ M/C	-
17	68	F	Pulmón	Adenocarcinoma	++M	+/-	-
18	60	M	Pulmón	Carcinoma microcítico	+/- Zona necrótica	+/-	-
19	88	F	Lengua	CCE	+++ M	+++ M	-*
20	34	F	Glándula parótida	Adenoma pleomórfico	++ M/C		-
21	50	F	Glándula parótida	Tumor de Warthin	+++ MC	+++ M/C	-
22	40	F	Glándula parótida	Adenoma pleomórfico	+++ M	++ M/C	-
23	56	M	Glándula submandibular	Carcinoma ductal salival	+/-	-	-
24	69	F	Hígado	Colangiocarcinoma	+/- Tumor, ++ estroma	+/-	-
25	51	M	Hígado	Carcinoma gástrico metastásico	- Tumor, +++ zona necrótica	-	-
26	64	M	Hígado	CHC	+/- Tumor, ++ secreción extracelular	+/- Tumor, ++ secreción extracelular	-
27	62	F	Vesícula biliar	Adenocarcinoma	+++ Tumor	++ Tumor y linfocitos	-
28	64	F	Páncreas	Adenocarcinoma	++M	++ M/C	-
29	68	M	Esófago	SCC	++M	+/-	-
30	73	M	Estómago	Adenocarcinoma, poco diferenciado	+/- Tumor, ++ estroma	+ M/C Tumor y estroma	-
31	63	M	Estómago	Adenocarcinoma, moderadamente diferenciado	+/- Tumor, +++ linfocitos infiltrantes	++ M/C	-
32	59	F	Estómago	Carcinoma de células en anillo de sello	+++ M	++ M/C	-
33	62	M	Estómago	Linfoma maligno	+++ M	+++ M/C	-

ES 2 379 155 T3

TABLA 8 (continuación)

N.º de sección	Edad	Sexo	Órgano	Diagnóstico	Anti-CD44	H460-16-2	Control de isotipo	
5	34	51	M	Estómago	Tumor del estroma de bajo potencial maligno (borderline)	+/- Estroma	-	-
10	33	42	M	Intestino delgado	Tumor del estroma maligno	++M		-*
	36	52	F	Apéndice	Pseudomixoma peritoneal	PD, +++ linfocitos infiltrantes	-	-
	37	53	M	Colon	Adenocarcinoma	+ M/C Tumor y estroma	+ M/C	-
15	38	67	M	Recto	Adenocarcinoma	+/-	++M	-
	39	75	F	Riñón	Carcinoma de células transicionales	++M	+ M/C	-
	40	54	F	Riñón	Carcinoma de células renales	+++ M	+/-	-
20	41	75	F	Riñón	Carcinoma de células renales	+/-	+/-	-
	42	65	M	Vejiga urinaria	Carcinoma poco diferenciado	+++ Linfocitos infiltrantes	++ M/C	-
25	43	67	M	Vejiga urinaria	Carcinoma de células transicionales, grado alto	+/- Estroma	-	-
	44	62	M	Próstata	Adenocarcinoma	+++ M	+++ M	-*
	45	30	M	Testículos	Seminoma	+/- Tumor, ++ estroma	+/-	-
30	46	68	F	Útero	Adenocarcinoma endometrial	++ Principalmente el estroma	++ Principalmente el estroma	-
	47	57	F	Útero	Leiomiomasarcoma	++ C	+ PD	-
	48	45	F	Útero	Leiomioma	++ C	+ C	-
	49	63	F	Cuello uterino	SCC	+++ M	+++ M	-
35	50	12	F	Ovario	Tumor del seno endodérmico	+/-	-	-
	51	33	F	Ovario	Adenocarcinoma mucinoso	+ M/C	-	-
	52	70	F	Ovario	Fibrotecoma	-	-	-
40	53	67	F	Glándula suprarrenal	Carcinoma cortical	-	-	-*
	54	61	P	Glándula suprarrenal	Feocromocitoma	-	-	-
	55	54	M	Tiroides	Carcinoma papilar	++M	++ M/C	-
45	56	58	F	Tiroides	Carcinoma folicular mínimamente invasivo	+++ M	++M	-
	57	74	M	Timo	Timoma	++ MC	+/-	-
	58	66	F	Cerebro	Meningioma	+/-	-	-
50	59	62	M	Cerebro	Glioblastoma multiforme	+++ M	+++ M	-

Por lo tanto, parece que el antígeno de H460-16-2 no se encuentra únicamente en las membranas de cánceres de mama, sino también en la membrana de una gran variedad de tipos de tumores. Estos resultados indican que H460-16-2 tiene potencial como un fármaco terapéutico en una amplia variedad de tipos de tumores además del de mama. De nuevo, el patrón de tinción similar, aunque distinto, de H460-16-2 comparado con L178 anti-CD44 implica que H460-16-2 reconoce un epítipo presente en una variante de CD44.

La preponderancia de las pruebas demuestra que H460-16-2 media efectos antineoplásicos a través de la unión de un epítipo conformacional dependiente de carbohidrato presente en una variante de CD44. Se ha demostrado, en el ejemplo 3, que puede usarse el anticuerpo H460-16-2 para inmunoprecipitar el antígeno afin a partir de células que lo expresan, tales como células MB-231. Además, pudo mostrarse que el anticuerpo H460-16-2 podría usarse en la detección de células y/o tejidos que expresan un resto antigénico CD44 que se une específicamente a él, utilizando técnicas ilustradas por, pero sin limitarse a, FACS, ELISA de células o IHQ.

Por tanto, podría demostrarse que el antígeno de H460-16-2 inmunoprecipitado puede inhibir la unión de H460-16-2 a tales células o tejidos usando dichos ensayo de FACS, ELISA de células o IHQ. Además, al igual que con el anticuerpo H460-16-2, podrían usarse otros anticuerpos anti-CD44 para inmunoprecipitar y aislar otras formas de

ES 2 379 155 T3

antígeno CD44 y el antígeno puede usarse también para inhibir la unión de esos anticuerpos a las células o tejidos que expresan el antígeno usando los mismos tipos de ensayos. También podría demostrarse que, si se usara un anticuerpo anti-CD44 que reconoce todas las formas de CD44 (es decir, un anticuerpo pan-CD44) para aislar su antígeno afín, entonces ese antígeno también podría inhibir la unión de antígeno de H460-16-2 a células o tejidos que expresan ese antígeno, demostrando de este modo también la unión de H460-16-2 a un epítipo de CD44 sobre células y tejidos que expresan ese antígeno. De forma alternativa, una comparación de anticuerpo H460-16-2 y pan-CD44 en ensayos tales como ensayos de unión competitiva. ELISA, ELISA de células, FACS o similares, en los que están presentes ambos anticuerpos también pueden demostrar la unión de H460-16-2 a un epítipo de CD44 sobre células y tejidos que expresan ese antígeno.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un anticuerpo monoclonal codificado por un clon depositado en la ATCC con el número de acceso PTA-4621 para identificar una célula que expresa CD44 *in vitro*.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho CD44 es un CD44 humano.
- 10 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho CD44 humano es el CD44 con número de acceso del NCBI gi|2134882.
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha célula es una célula tumoral.
- 15 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha célula tumoral es una célula de piel, mama, ganglio linfático, hueso, tejido blando, cavidad nasal, laringe, pulmón, lengua, glándula parótida, hígado, vesícula biliar, páncreas, esófago, estómago, colon, recto, riñón, vejiga urinaria, próstata, testículos, útero, cuello uterino, tiroides, timo o cerebro.
- 20 6. Un procedimiento *in vitro* de identificación de un tumor humano susceptible de ser tratado con un anticuerpo monoclonal codificado por un clon depositado en la ATCC con número de acceso PTA-4621, que comprende identificar un tumor humano que expresa CD44 usando un anticuerpo monoclonal codificado por un clon depositado en la ATCC con número de acceso PTA-4621.
- 25 7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho CD44 es el CD44 con número de acceso del NCBI gi|2134882.
- 30 8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que dicho tumor es un tumor de piel, mama, ganglio linfático, hueso, tejido blando, cavidad nasal, laringe, pulmón, lengua, glándula parótida, hígado, vesícula biliar, páncreas, esófago, estómago, colon, recto, riñón, vejiga urinaria, próstata, testículos, útero, cuello uterino, tiroides, timo o cerebro.
- 35 9. Un ensayo para determinar la presencia de células humanas que expresan CD44 que comprende:
- proporcionar un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, codificados por el clon depositado en la ATCC como PTA-4621;
- poner en contacto dicho anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo con dicha muestra de células; y
- 40 determinar la unión de dicho anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo con dicha muestra de células;
- mediante el cual se determina la presencia de células que expresan resto antigénico CD44.
- 45 10. Un ensayo de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho CD44 es un CD44 humano.
11. Un ensayo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho CD44 humano es el CD44 con número de acceso del NCBI gi|2134882.
- 50 12. Un ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que dicha célula es una célula tumoral.
- 55 13. Un ensayo de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicha célula tumoral es una célula de piel, mama, ganglio linfático, hueso, tejido blando, cavidad nasal, laringe, pulmón, lengua, glándula parótida, hígado, vesícula biliar, páncreas, esófago, estómago, colon, recto, riñón, vejiga urinaria, próstata, testículos, útero, cuello uterino, tiroides, timo o cerebro.
- 60
- 65

FIGURA 1

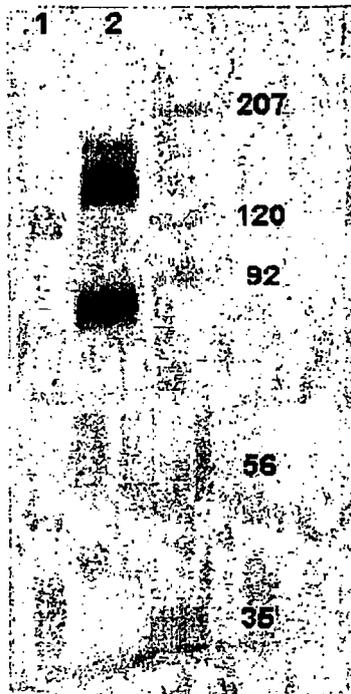


FIGURA 2

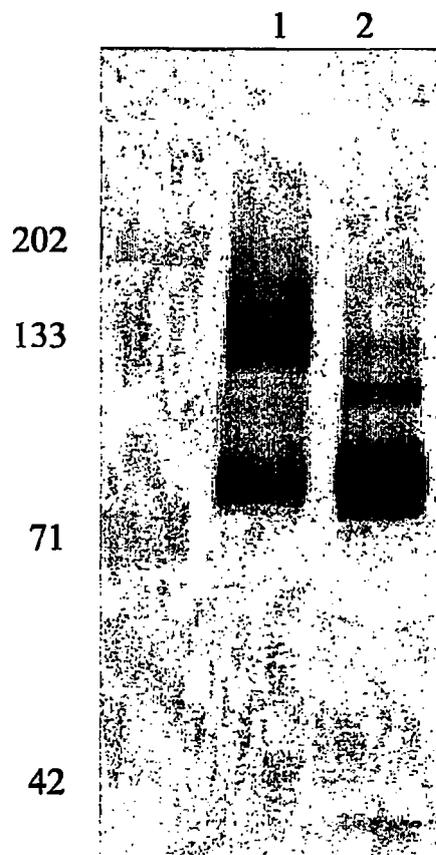


FIGURA 3

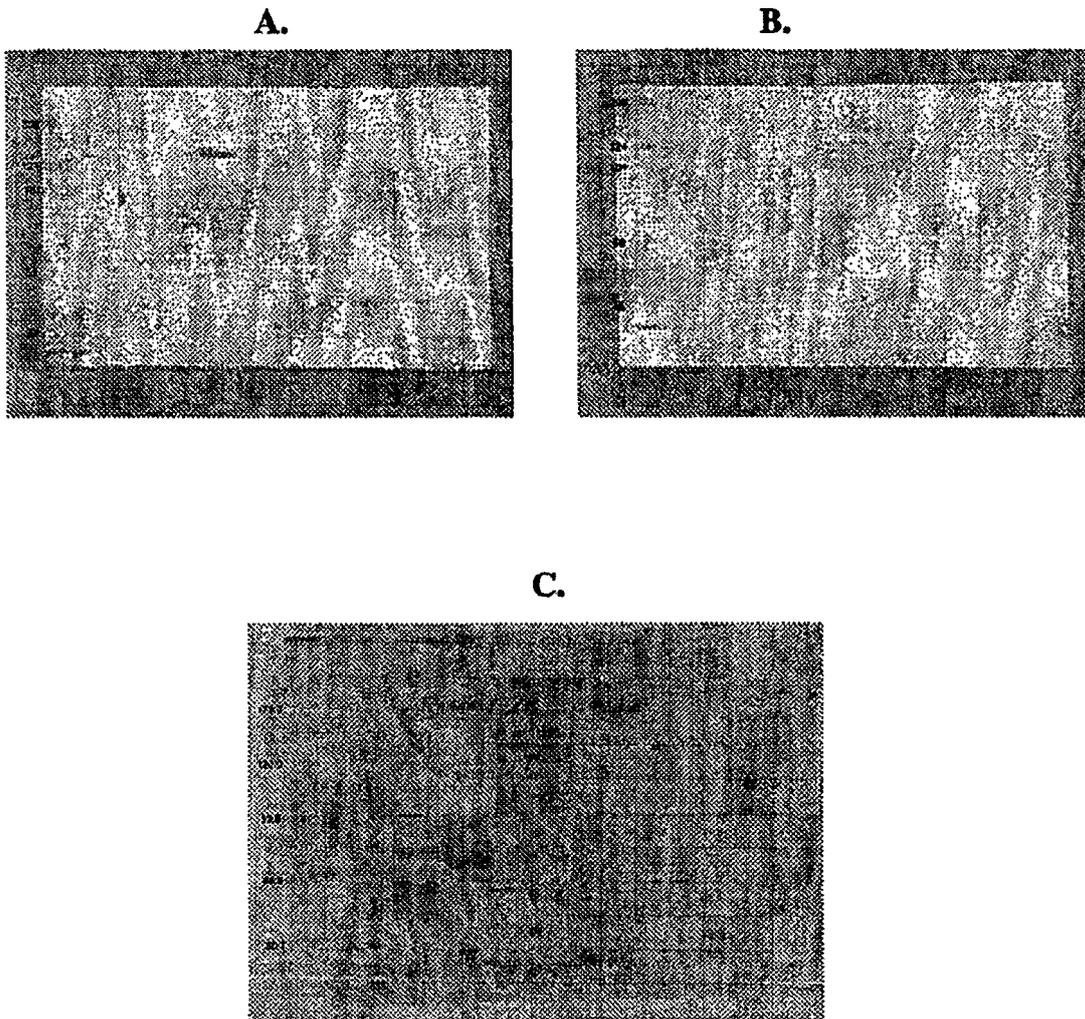


FIGURA 4

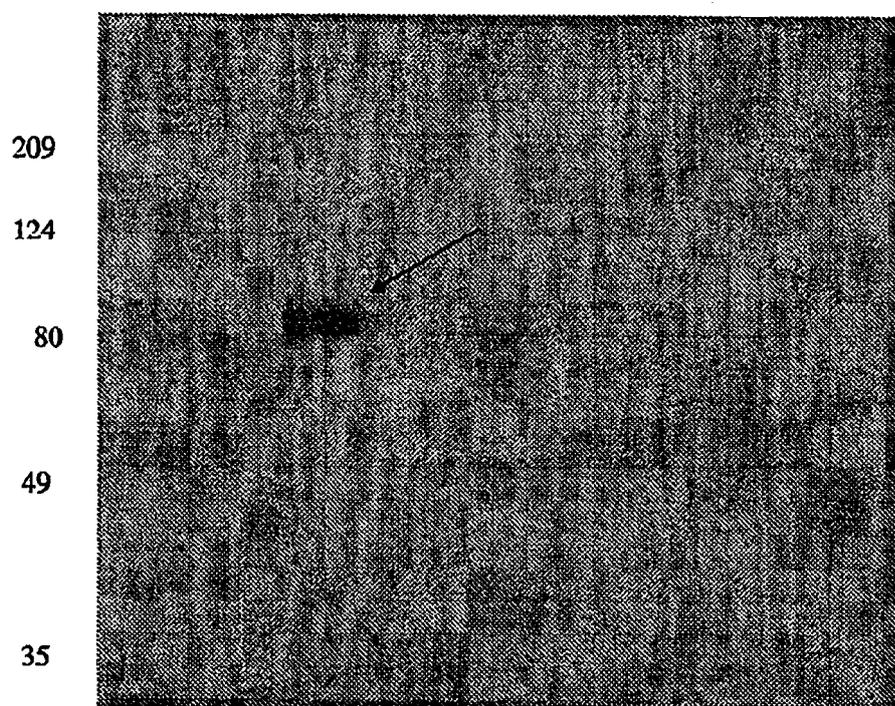
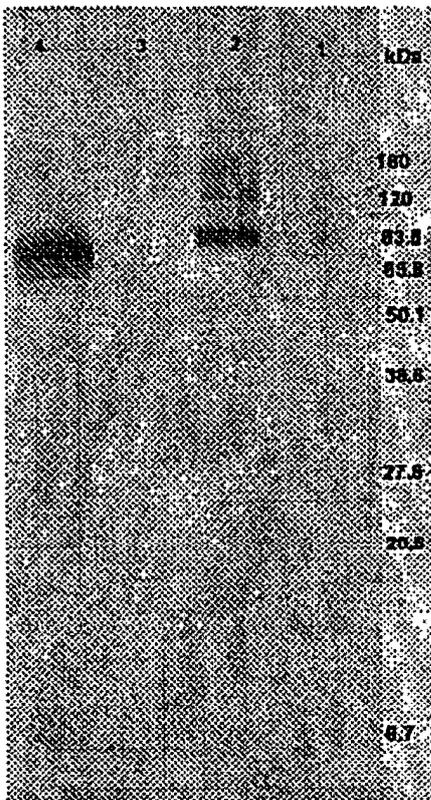


FIGURA 5

A.



B.

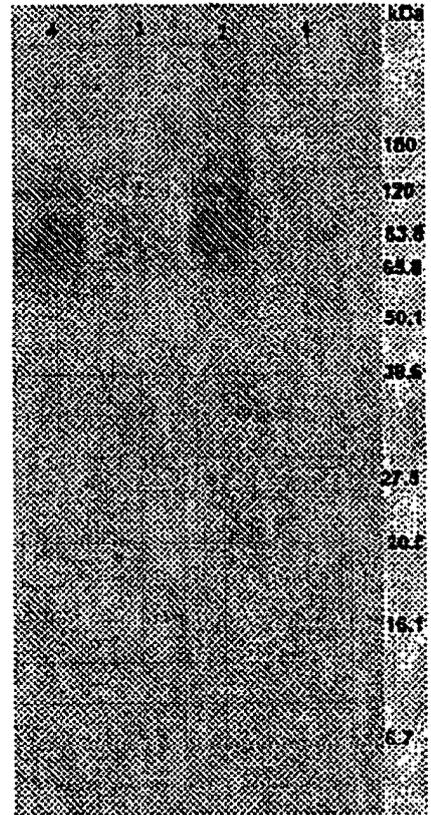


FIGURA 6

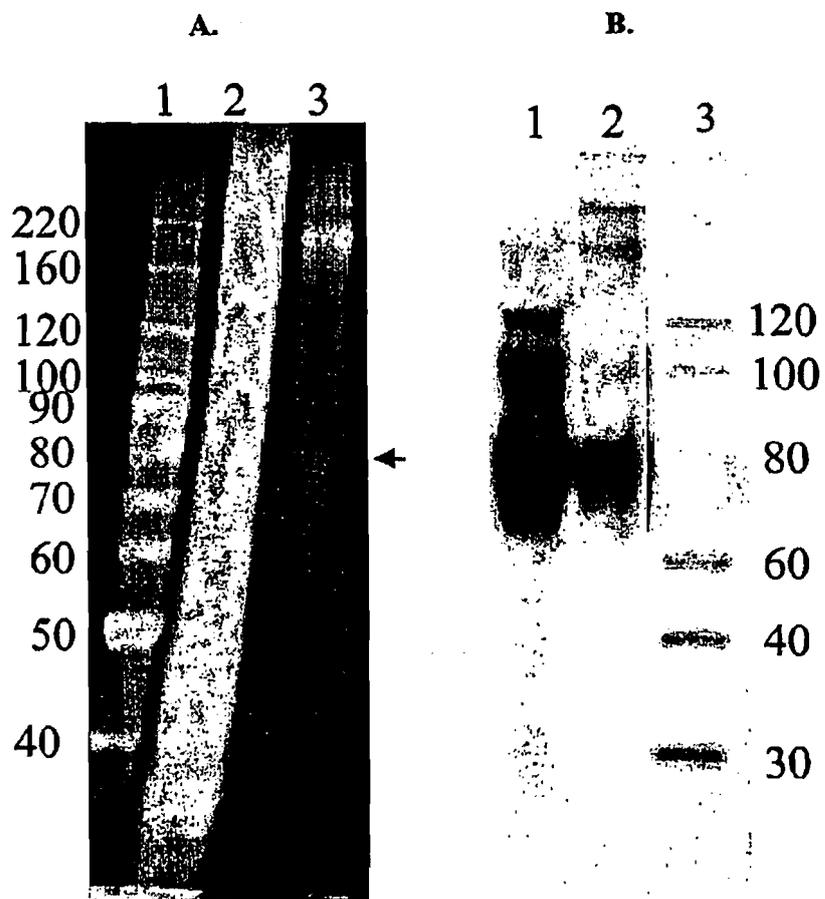


FIGURA 7

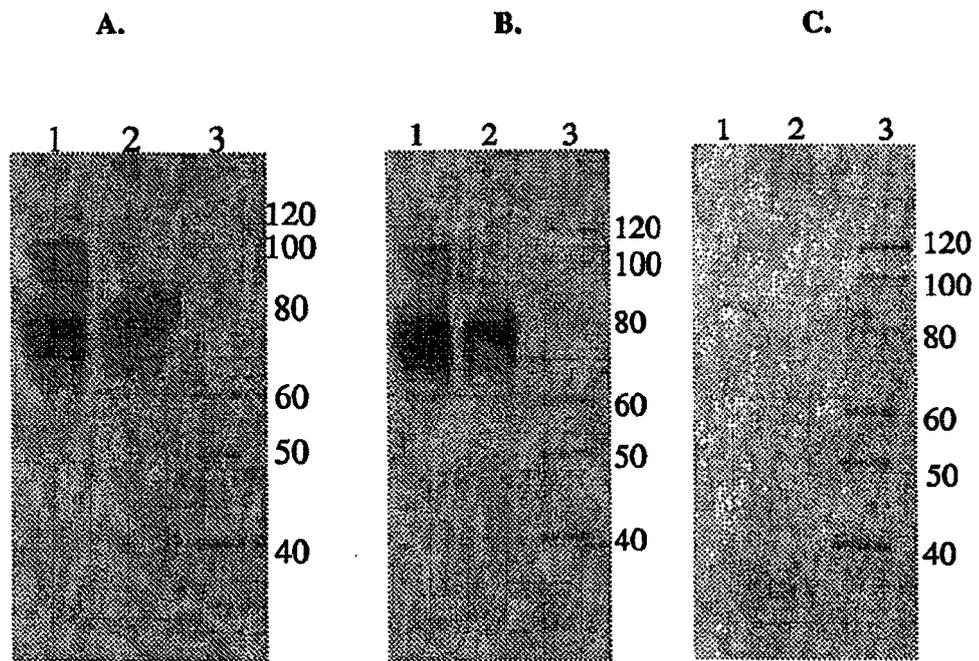


FIGURA 8

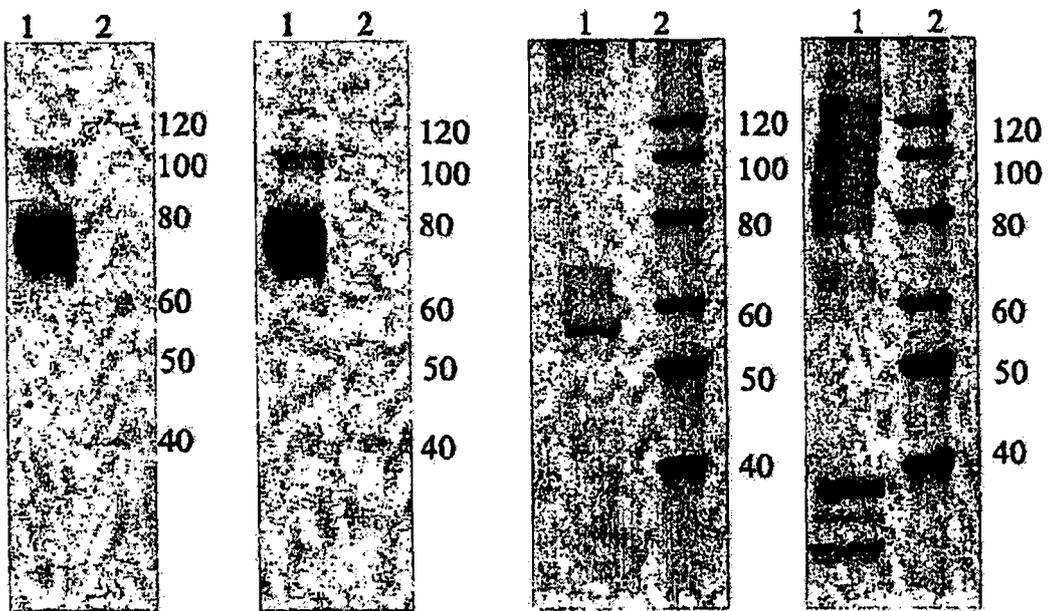
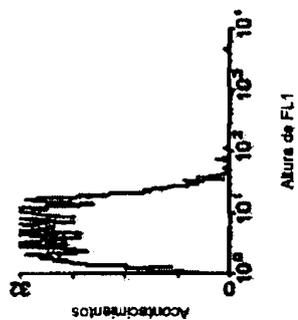
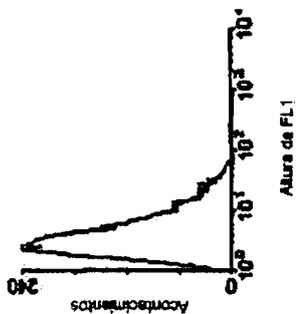


FIGURA 9

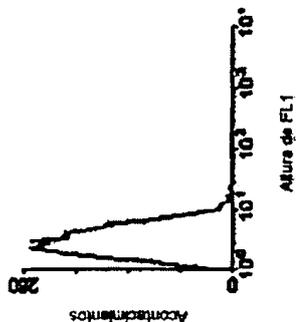
Hs578.Bst



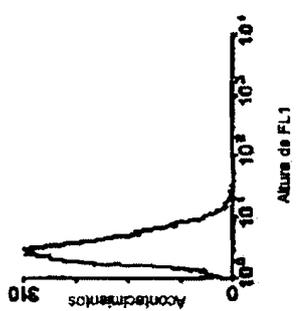
CCD-27sk



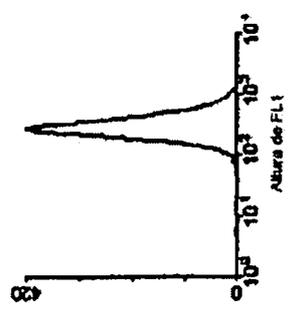
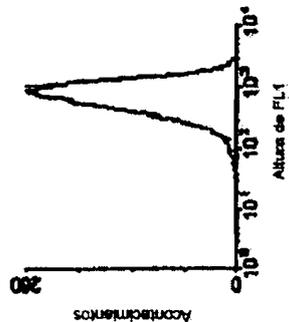
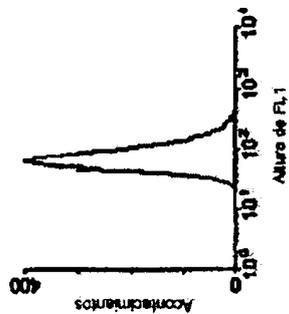
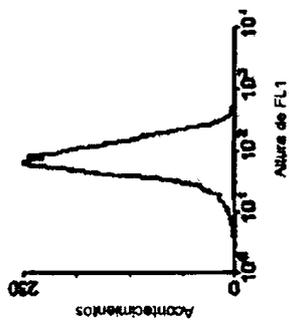
MDA MB 468



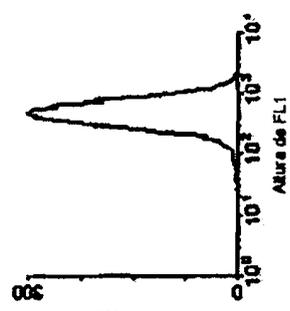
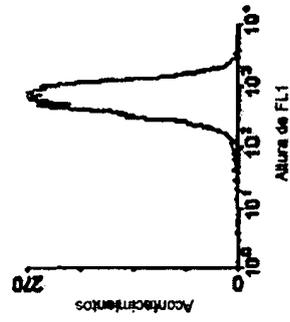
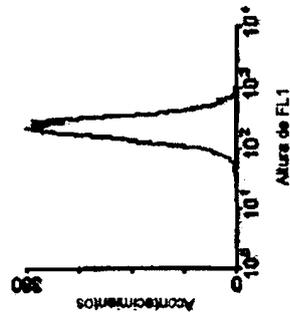
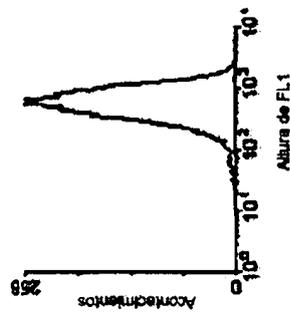
MDA MB 231



**Control
de isotipo**



EGFR



H460-16-2

D.

C.

B.

A.

FIGURA 10

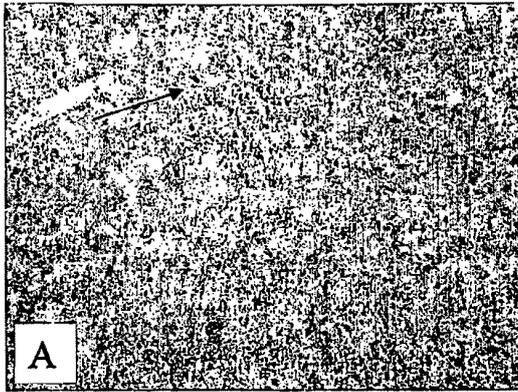


FIGURA 11

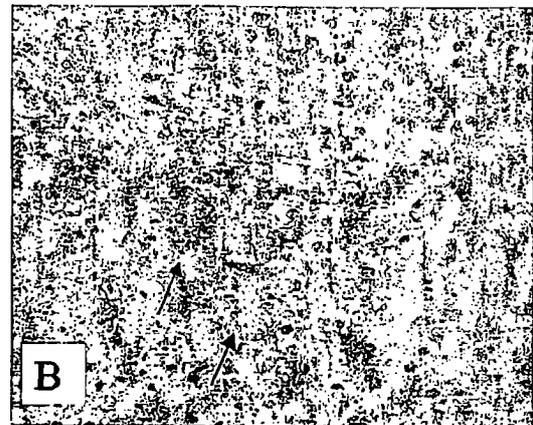
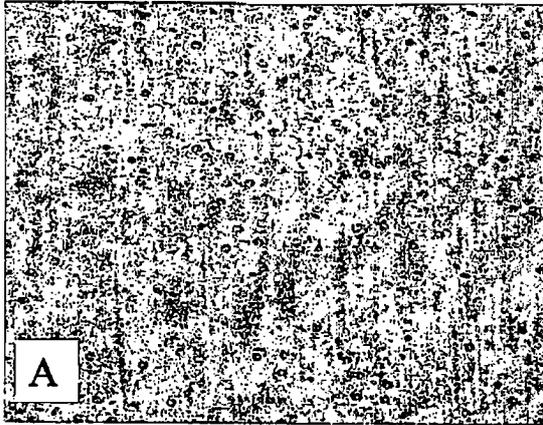
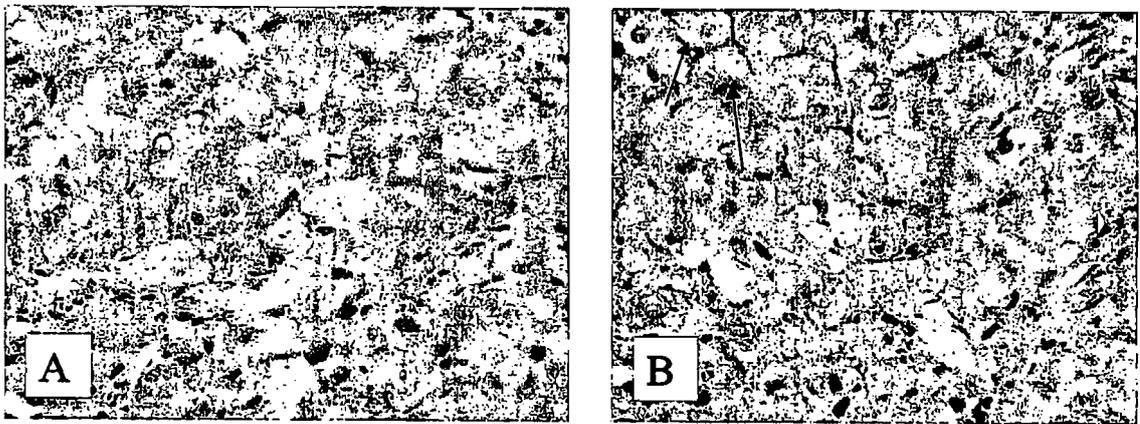


FIGURA 12



ES 2 379 155 T3

FIGURA 13

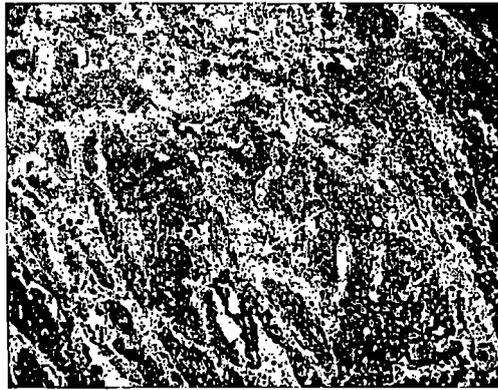


FIGURA 14

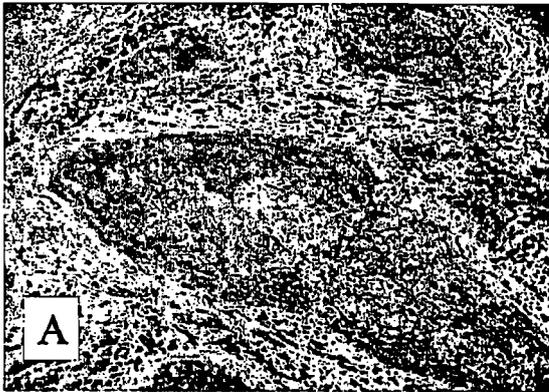


FIGURA 15

