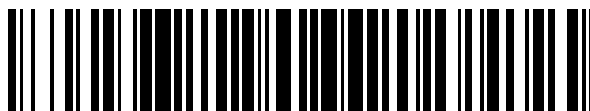


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 892**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09742229 .9**  
96 Fecha de presentación: **02.04.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2262839**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2010**

54 Título: **Uso de un anticuerpo anti-CD151 para el tratamiento precoz de los cánceres**

30 Prioridad:  
**04.04.2008 FR 0801865**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.05.2012**

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

72 Inventor/es:  
**HAEUW, Jean-François**

74 Agente/Representante:  
**Linage González, Rafael**

ES 2 380 892 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

Uso de un anticuerpo anti-CD151 para el tratamiento precoz de los cánceres

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo uso de anticuerpos anti-CD151 capaces de inhibir el crecimiento tumoral, dichos anticuerpos siendo en particular monoclonales de origen murino, quimérico y humanizado. De acuerdo con un aspecto particular, la invención tiene por objeto el uso de estos anticuerpos, o de sus fragmentos funcionales, como medicamento para el tratamiento precoz de los cánceres y en particular de los tumores primarios. La invención comprende, por último, unos productos y/o unas composiciones que comprenden este tipo de anticuerpos en asociación, por ejemplo, con unos anticuerpos y/o unos agentes anticancerosos o conjugados con unas toxinas y su uso para la prevención y/o el tratamiento de determinados cánceres.

15 CD151, denominado también PETA-3 o SFA-1, es una proteína mebranaria que pertenece a la familia de las tetraspaninas (Boucheix y Rubinstein, 2001, Cell Mol. Life Sci. 58, págs. 1.189-1.205; Hemler, 2001, J. Cell Biol. 155, págs. 1.103-1.107). En el ser humano, el CD151 posee 253 ácidos aminados, y consta de 4 fragmentos membrenarios y de 2 dominios extracelulares EC1 (18 ácidos aminados, secuencia [40-57] ) y EC2 (109 ácidos aminados, secuencia [113-221]), también llamados bucles extracelulares. No obstante, hay que señalar que al nivel de la secuencia nucleotídica, a día de hoy se han identificado dos variantes para CD151, esto es uno que comprende los nucleótidos A y C respectivamente en las posiciones 395 y 409 [Fitter y otros, 1995, Blood 86(4), págs. 1.348-1.355] y el otro que comprende para las mismas posiciones los nucleótidos G y T en el lugar de los nucleótidos A y C [Hasegawa y otros, 1996, J. Virol. 70(5), págs. 3.258-3.263]. Por lo tanto, se puede observar una mutación al nivel de la secuencia peptídica, esto es una mutación de los residuos K (Lys) y P (Pro) respectivamente en las posiciones 132 y 137 en los residuos R (Arg) y S (Ser) [Fitter y otros, 1995, Blood 86(4), págs. 1.348-1.355 / Hasegawa y otros, 1996, J. Virol. 70(5), págs. 3.258-3.263].

CD151 está sobreexpresado en numerosos cánceres, como por ejemplo los cánceres de pulmón [Tokuhara y otros, 2001, Clin. Cancer Res. 7, págs. 4.109-4.114], de colon [Hashida y otros, 2003, Br. J. Cancer 89, págs. 158-167], de próstata [Ang y otros, 2004, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 13, págs. 1.717-1721] o de páncreas [Gesierich y otros, 2005, Clin. Cancer Res. 11, págs. 2.840-2.852].

El uso de los ratones knock-out que no expresan CD151 y de anticuerpos anti-CD151 y de siRNA para bloquear *in vitro* la funcionalidad y la expresión de CD151.

En diferentes tipos celulares ha permitido mostrar que CD151 está implicado en numerosos fenómenos ligados al cáncer, como la adhesión celular (Nishiuchi y otros, 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, págs. 1.939-1.944; Winterwood y otros, 2006, Mol. Biol. Cell 17, págs. 2.707-2.721), la motilidad celular (Kohno y otros, 2002, Int. J. Cancer 97, págs. 336-343), la migración celular (Yauch y otros, 1998, Mol. Biol. Cell 9, págs. 2.751-2.765; Testa y otros, 1999, Cancer Res. 59, págs. 3.812-3.820; Penas y otros, 2000, J. Invest. Dermatol. 114, págs. 1.126-1.135; Klosek y otros, 2005, Biochem. Biophys. Res. Commun. 336, págs. 408-416), la invasión celular (Kohno y otros, 2002, Int. J. Cancer 97, págs. 336-343; Shiomi y otros, 2005, Lab. Invest. 85, págs. 1.489-1.506; Hong y otros, 2006, J. Biol. Chem. 281, págs. 24.279-24.292) y la angiogénesis (Yanez-Mo y otros, 1998, J. Cell. Biol. 141, págs. 791-804; Sincock y otros, 1999, J. Cell Sci. 112, págs. 833-844; Takeda y otros, 2006, Blood).

Una de las notables propiedades de las tetraspaninas es su capacidad para asociarse entre sí, así como a un número importante de otras moléculas de superficie para formar unos compuestos macromoleculares estructurados. En el interior de estos compuestos, cada tetraspanina está específicamente asociada a una o varias moléculas de superficie que forman de este modo unos compuestos primarios, formados por una tetraspanina y por una molécula colaboradora. Las tetraspaninas pueden organizar unos microdominios particulares de la membrana plásmica en el interior de los cuales estas reclutarían a sus socios moleculares que podrían acoplarse funcionalmente. El conjunto de las interacciones que implican las tetraspaninas se ha denominado «red de tetraspaninas» o «Tetraspanin Web».

CD151 interactúa en la superficie de las células con diferentes proteínas mebranarias. Unos compuestos muy estables, resistentes a la acción de determinados detergentes, se han puesto en evidencia en particular con las integrinas receptores de las lamininas, y de manera más particular con las integrinas  $\alpha 3\beta 1$  o  $\alpha 6\beta 4$  cuyo ligando preferente es la laminina 5 (Yauch y otros, 1998, Mol. Biol. Cell 9, págs. 2.751-2.765; Lammerding y otros, 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, págs. 7.616-7.621). Esta asociación implica los dominios extracelulares de CD151 y de las integrinas. La secuencia QRD [194-196] de CD151, localizada en el bucle EC2, es muy importante en esta asociación ya que la mutación de este punto provoca la pérdida de la interacción con determinadas integrinas (Kazarov y otros, 2002, J. Cell Biol. 158, págs. 1.299-1.309). Unos compuestos ternarios funcionales CD151/integrina  $\alpha 6\beta 4$ /c-Met (receptor del HGF), por otra parte, se han puesto en evidencia en las células tumorales (Klosek y otros, 2005, Biochem. Biophys. Res. Commun. 336, págs. 408-416). La inhibición de la expresión de CD151 mediante el tratamiento de las células con el ARN de interferencia provoca una inhibición del crecimiento y de la migración celular inducida por HGF.

Las interacciones en el interior de una misma célula de CD151 con otras tetraspaninas, necesarias para la formación de la red de las tetraspaninas, dependerían de las zonas membranas y citoplásmicas de CD151 puesto que se ha demostrado que la delección del bucle EC2 no rompía la asociación de CD151 con otras tetraspaninas (Berditchevski, 2001, J. Cell. Sci. 114, págs. 4.143-4.151).

CD151 es capaz de regular los fenómenos de adhesión, de migración y de invasión celular mediante la modulación de diferentes vías de señalización, como por ejemplo la vía de los fosfoinosítidos por medio de una asociación con la PI4-kinasa (Yauch y otros, 1998, Mol. Biol. Cell. 9, págs. 2.751-2.765), la vía de señalización de c-Jun por medio de la fosforilación de FAK, Src, p38-MAPK y JNK (Hong y otros, 2006), la fosforilación de las integrinas mediante la PKC (Zhang y otros, 2001, J. Biol. Chem. 276, págs. 25.005-25.013), la activación de GTPasas de la familia Rho (Shigeta y otros, 2003, J. Cell Biol. 163, págs. 165-176).

Unas interacciones de tipo homofilico entre células son también responsables de un aumento de la motilidad celular y de la expresión de la metaloproteínasa MMP-9 (Hong y otros, 2006). Estas interacciones intercelulares CD151-CD151 provocan la activación de c-Jun por medio de la fosforilación de FAK, Src, p38-MAPK y JNK.

A día de hoy, a pesar del interés de la proteína CD151, se han generado dos anticuerpos con fines terapéuticos, esto es los anticuerpos monoclonales 50-6 y SFA1.2B4. Estos 2 anticuerpos poseen unas actividades comparables. En efecto inhiben la formación de las metástasis *in vivo* en unos modelos animales, pero no se ha puesto en evidencia ningún efecto sobre el crecimiento tumoral *in vivo*.

El anticuerpo monoclonal 50-6 (isotipo IgG1) dirigido contra CD151 se ha generado en los ratones mediante inmunizaciones sustractivas con unas células humanas de carcinoma epidermoide HEp-3 (Testa y otros, 1999, Cancer Res. 59, págs. 3.812-3.820).

El anticuerpo 50-6 es capaz de inhibir *in vitro* la migración de las células humanas de carcinoma cervical HeLa transfectadas con el objetivo de sobreexpresar CD151 y unas células HEp-3, y la angiogénesis en un modelo de neovascularización de membrana corioalantoica inducida por el bFGF (*basic fibroblast growth factor*). Este inhibe *in vivo* las metástasis inducidas mediante la inoculación de células HEp-3 en 2 modelos de embrión de pollo (Testa y otros, 1999, Cancer Res. 59, 3.812-3.820). En estos modelos, la actividad inhibidora del anticuerpo 50-6 está determinada por la medición de la actividad de la proteína huPA (human urokinase-type plasminogen activator) en unos extractos de pulmones. Según los autores, esta dosificación constituye el reflejo de la presencia de células humanas en los pulmones. Tras la dosificación, se estima la reducción de las metástasis (diseminación de las células HEp-3 en los pulmones de los embriones de pollo) inducida por los anticuerpos 50-6, por comparación con un anticuerpo de control, al 74 % en un modelo denominado de « metástasis espontánea » en el que a la inoculación de las células le sigue una inyección del anticuerpo, y al 57 % en un modelo denominado de « metástasis experimental » en el cual las células y los anticuerpos se inoculan de manera conjunta. Según los autores, las propiedades anti-tumorales del anticuerpo 50-6 observadas *in vivo* no parecen estar ligadas a un efecto citostático o citotóxico puesto que no ha mostrado ningún efecto sobre la proliferación *in vitro* de las células HEp-3.

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

El anticuerpo monoclonal anti-CD151 SFA1.2B4 (isotipo IgG1) se ha generado en los ratones tras la inmunización por vía intra-peritoneal con unas células NIH 3T3 transfectadas por el gen de CD151 humano (Hasegawa y otros, 1996, J. Virol. 70, págs. 3.258-3.263). El anticuerpo SFA1.2B4 es capaz de inhibir *in vitro* la invasión y la motilidad celular de diferentes líneas tumorales humanas (Kohno y otros, 2002, Int. J. Cancer 97, págs. 336-343). Este inhibe *in vivo* las metástasis pulmonares inducidas por las líneas de cáncer de colon RPMI14788 y de fibrosarcoma HT1080 transfectadas para sobreexpresar CD151 (Kohno y otros, 2002, Int. J. Cancer 97, págs. 336-343).

En la bibliografía se han descrito otros anticuerpos murinos anti-CD151, como por ejemplo los anticuerpos monoclonales 14A2H1 (Ashman y otros, 1991, Br. J. Haematol. 79, págs. 263-270; Roberts y otros, 1995, Br. J. Haematol. 89, págs. 853-860), TS151 y TS151R (Serru y otros, 1999, Biochem. J. 340, págs. 103-111; Geary y otros, 2001, Tissue Antigens 58, págs. 141-153; Charrin y otros, J. Biol. Chem. 276, págs. 14.329-14.337; Chometon y otros, 2006, Exp. Cell Res. 312, págs. 983-985). No se ha descrito ninguna actividad anti-tumoral *in vivo* para estos diferentes anticuerpos.

De acuerdo con un primer aspecto, la invención pretende el uso de un anticuerpo monoclonal secretado por el hibridoma registrado en la ATCC con la referencia CRL-2696, o uno de sus fragmentos funcionales, para la preparación de un medicamento destinado a inhibir el crecimiento tumoral de un tumor primario para el tratamiento precoz del cáncer. De manera más particular, dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 50-6. También de acuerdo con un aspecto de la invención, el anticuerpo cuyo uso es el objeto de la invención es específico de la proteína CD151.

Al contrario de que lo que se sabía sobre dicho anticuerpo 50-6, la solicitante ha puesto en evidencia por primera vez que este anticuerpo presentaba una actividad de inhibición del crecimiento tumoral y, de manera particular, del

crecimiento de un tumor primario. Contra todo pronóstico, la invención pretende, por lo tanto, un uso de este anticuerpo para la preparación de una composición farmacéutica que busca tratar de manera precoz el cáncer.

5 Por « tratamiento precoz » o « tratar de manera precoz », hay que entender un tratamiento que inhibe una etapa precoz del proceso de desarrollo del tumor antes de la aparición de metástasis por oposición a las etapas tardías que se producen una vez que se ha establecido el proceso metastásico. A título de ejemplo no excluyente, puede tratarse de la inhibición de la proliferación de las células tumorales al nivel del tumor primario, por lo tanto, de manera previa al proceso metastásico.

10 Varios estudios experimentales han mostrado el importante papel de las tetraspaninas en la formación de metástasis, actuando ya sea como supresores, ya sea como promotores de metástasis. De este modo, la transfección de tetraspaninas como CD9, CD63 o CD82 reduce el potencial metastásico de líneas cancerosas. Por el contrario, la expresión de las tetraspaninas CD151 y Co-029 parece producir el efecto inverso. Estas 2 tetraspaninas serían, por lo tanto, promotores de la metástasis. Estos resultados son coherentes con diferentes estudios clínicos que han demostrado que, en varios tipos de cáncer (seno, pulmón, esófago, estómago, hígado, páncreas, colon, próstata, melanoma...), CD9 y CD82 están menos expresados en los tumores primitivos cuando hay metástasis y que su reducción de expresión predice una tasa de supervivencia inferior. En el cáncer de pulmón, la disminución combinada de la expresión de CD9 y de CD82 se ha correlacionado con un potencial metastásico mayor que cuando se reduce la expresión de sólo uno de estos antígenos.

20 Varios estudios retrospectivos han mostrado que la sobreexpresión de CD151 estaba asociada a la agresividad de determinados cánceres, como los cánceres de pulmón, de colon y de próstata, y se podía considerar como un factor de mal pronóstico (Tokuhara y otros, 2001, Clin. Cancer Res. 7, págs. 4.109-4.114; Hashida y otros, 2003, Br. J. Cancer 89, págs. 158-167; Ang y otros, 2004, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 13, págs. 1.717-1.721). En estos casos, la media de supervivencia se reduce, en efecto, en los pacientes cuyo tumor expresa CD151, en comparación con aquellos cuyo tumor no expresa CD151.

30 La sobreexpresión de CD151 en diferentes líneas tumorales humanas (HeLa, RPMI14788, A172, HT1080), inducida mediante la transfección del gen correspondiente, provoca un aumento de la motilidad, de la migración y de la invasión de las células transfectadas (Testa y otros, 1999, Cancer Res. 59, págs. 3.812-3.820; Kohno y otros, 2002, Int. J. Cancer 97, págs. 336-343). Estos fenómenos se inhiben en presencia de anticuerpos anti-CD151.

35 De acuerdo con otro aspecto, los fragmentos funcionales de anticuerpo de acuerdo con la invención consisten, por ejemplo, en unos fragmentos Fv, scFv (sc por cadena simple), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc o diabodies, o cualquier fragmento cuya duración de vida media se habría aumentado mediante modificación química, como la adición de poli(alquileno) glicol como el poli(etileno)glicol ("PEGilación") (fragmentos PEGilados denominados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')<sub>2</sub>-PEG o Fab'-PEG) (« PEG » según la nomenclatura inglesa Poli(Etileno)Glicol), o mediante incorporación en un liposoma, microesferas o PLGA, dichos fragmentos siendo capaces de ejercer de manera general una actividad incluso parcial del anticuerpo del cual han salido.

40 De preferencia, dichos fragmentos funcionales estarán formados o comprenderán una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del cual se derivan, dicha secuencia parcial siendo suficiente para retener la misma especificidad de enlace que el anticuerpo del cual esta ha salido y una afinidad suficiente, de preferencia al menos igual a 1/100, de manera más preferente a al menos 1/10 de la del anticuerpo del que ésta ha salido.

Un fragmento funcional de este tipo constará como mínimo de 5 ácidos aminados, de preferencia 10, 15, 25, 50 y 100 ácidos aminados consecutivos de la secuencia del anticuerpo del que este ha salido.

50 De preferencia, estos fragmentos funcionales serán unos fragmentos de tipo Fv, scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab'), scFv-Fc o diabodies que poseen por lo general la misma especificidad de fijación que el anticuerpo del que estos han salido. De acuerdo con la presente invención, se pueden obtener unos fragmentos de anticuerpo de la invención a partir de unos anticuerpos como los que se han descrito con anterioridad mediante unos métodos como la digestión por enzimas, como la pepsina o la papaína y/o mediante ruptura de los puentes disulfuros por reducción química. De otra manera los fragmentos de anticuerpos comprendidos en la presente invención se pueden obtener mediante unas técnicas de recombinaciones genéticas también muy conocidas por el experto en la materia o incluso mediante síntesis peptídica por medio, por ejemplo, de sintetizadores automáticos de péptidos como los que suministra la empresa Applied.

60 De acuerdo con un aspecto de la invención, el anticuerpo utilizado consiste en un anticuerpo monoclonal murino.

También se incluyen como anticuerpos de acuerdo con la invención, los anticuerpos quiméricos o humanizados.

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

Los anticuerpos o sus fragmentos de tipo quimérico utilizados de acuerdo con la invención se pueden preparar utilizando las técnicas de recombinación genética. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico se podrá realizar clonando un ADN recombinante que consta de un promotor y de una secuencia codificante para la zona variable de un anticuerpo monoclonal no humano, en particular murino, de acuerdo con la invención y de una secuencia codificante para la zona constante del anticuerpo humano. Un anticuerpo quimérico de la invención codificado por este gen recombinante será, por ejemplo, una quimera ratón-hombre, la especificidad de este anticuerpo viniendo determinada por la zona variable derivada del ADN murino y su isótopo determinado por la zona constante derivada del ADN humano. Para los métodos de preparación de anticuerpos quiméricos, se podrá, por ejemplo, hacer referencia al documento de Verhoeyen y otros (BioEssays, 8:74, 1988).

Por anticuerpos humanizados se entiende un anticuerpo que contiene unas zonas CDRs derivadas de un anticuerpo de origen no humano, las otras partes de la molécula de anticuerpos derivándose de uno (o de varios) anticuerpos humanos. Además, algunos de los residuos de los segmentos del esqueleto (denominados FR) se pueden modificar para conservar la afinidad de enlace (Jones y otros, Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyen y otros, Science, 239:1.534-1.536, 1988; Riechmann y otros, Nature, 332:323-327, 1988).

Los anticuerpos humanizados o sus fragmentos funcionales se pueden preparar mediante unas técnicas conocidas por el experto en la materia (como, por ejemplo, las que se describen en los documentos Singer y otros, J. Immunol. 150:2.844-2.857, 1992; Mountain y otros, Biotechnol. Genet. Eng. Rev.; 10:1-142, 1992; o Bebbington y otros, Bio/Technology, 10:169-175, 1992). Este tipo de anticuerpos humanizados se prefieren para su uso en unos métodos de tratamiento profiláctico y/o terapéutico *in vivo*. El experto en la materia también conoce otras técnicas de humanización como, por ejemplo, la técnica del « *CDR Grafting* » descrita por PDL que es objeto de las patentes EP 0 451 261, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 o también US 5.530.101, US 6.180.370, US 5.585.089 y US 5.693.761. También se pueden citar las patentes US 5.639.641 o también US 6.054.297, US 5.886.152 y US 5.877.293.

De manera más particular, la solicitante adelanta, sin querer relacionarse con ninguna teoría, que el uso de anticuerpo anti-CD151 en el marco del tratamiento del cáncer resultaría muy interesante, no sólo por el hecho de una inhibición de la angiogénesis, sino también y sobre todo por el hecho de la inhibición de la actividad promotora de metástasis de CD151. En efecto, al contrario de lo que se sabía hasta el momento, esto es un efecto del anticuerpo 50-6 sobre la angiogénesis, la migración y la invasión, el uso de acuerdo con la invención tiene como objetivo el fenómeno mismo de crecimiento tumoral de los tumores primarios (con, como consecuencia directa evidente, una inhibición de la formación de metástasis y no sólo del proceso metastásico), y en particular de la adhesión celular, de la migración celular y/o de la invasión celular.

Tal y como se ha descrito con anterioridad, la proteína CD151 forma parte de la familia de las tetraspaninas y, como tal, comprende 2 dominios extracelulares EC1 (18 ácidos aminados, secuencia [40-57]) y EC2 (109 ácidos aminados, secuencia [113-221]), denominados también bucles extracelulares.

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

De manera más particular, de acuerdo con una forma de ejecución preferente de la invención, se describe el uso de al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de unirse a un epítipo incluido en el bucle extra-celular 1 (EC1) y/o 2 (EC2), de manera preferente EC2, que corresponden respectivamente a los ácidos-aminados 40-57 y 113-221 de la proteína CD151.

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

El bucle EC2 [113-221] posee un punto de N-glicosilación (residuo Asn159) y 6 residuos Cisteína que forman 3 puentes disulfuro. Se ha propuesto un modelo estructural del bucle EC2 de las tetraspaninas, y en particular de CD151, a partir de la estructura tridimensional del bucle EC2 de la tetraspanina CD81 (Seigneuret y otros, 2001, J. Biol. Chem. 276, 40.055-40.064). De acuerdo con este modelo, las tetraspaninas poseen una estructura común, relativamente conservada y formada por 3 hélices  $\alpha$ , y un dominio específico variable. Para CD151, esta estructura estará formada por unas zonas [113-157] y [209-221], y el dominio variable de la zona [158-208].

El dominio variable del bucle EC2 estaría implicado de manera más particular en las interacciones específicas de CD151 con unas proteínas de la familia de las integrinas. Algunas experiencias de mutagénesis dirigida han mostrado, en particular, la importancia de la zona [193-208], y de manera más precisa del tripéptido QRD [194-196] y del residuo Cisteína en la posición 192, en la asociación de CD151 con determinadas integrinas receptores de la laminina, como las integrinas  $\alpha 3 \beta 1$  o  $\alpha 6 \beta 4$  (Kazarov y otros, 2002, J. Cell Biol. 158, págs. 1.299-1.309).

Hay que entender por « anticuerpo monoclonal » un anticuerpo procedente de una población de anticuerpos prácticamente homogéneos. De manera más particular, los anticuerpos individuales de una población son idénticos

a excepción de algunas mutaciones eventuales que se pueden producir de manera natural, que pueden encontrarse en proporciones mínimas. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal consiste en un anticuerpo homogéneo que resulta de la proliferación de un único clon celular (por ejemplo un hibridoma, una célula huésped eucariota transfectada con una molécula de ADN que codifica para el anticuerpo homogéneo, una célula huésped procariota transfectada con una molécula de ADN que codifica para el anticuerpo homogéneo, etc.) y que por lo general está caracterizada por unas cadenas pesadas de una única y misma clase y sub-clase, y unas cadenas ligeras de un único tipo. Los anticuerpos monoclonales son extremadamente específicos y se dirigen contra un único antígeno. Además, al contrario que en las preparaciones de anticuerpos policlonales que comprenden de manera clásica diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes, o epítomos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único epítomo del antígeno.

De manera preferente, el uso de los anticuerpos anti-CD151 en el marco del tratamiento del cáncer se justifica de manera particular en los cánceres que sobreexpresan este mismo receptor CD151.

Este tipo de cánceres consisten en el cáncer de colon [Hashida y otros, *Br. J. Cancer* 89 (2003): 158-167], el cáncer de pulmón, de manera preferente del pulmón de células no pequeñas [Tokuhara y otros, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001):4.109-4.114], el cáncer de próstata [Ang y otros, *Cancer Epidemiol. Biomarkers* 13 (2004):17] y el cáncer de páncreas [Gesierich y otros, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005):2.840-2.852].

La presente invención reivindica, por lo tanto, el uso de un anticuerpo como el que se ha descrito con anterioridad para el tratamiento del cáncer, consistiendo dicho cáncer de manera preferente en los cánceres de colon, de pulmón, de próstata o de páncreas.

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

De manera más particular, la invención pretende el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la preparación de una composición farmacéutica que comprende, además, al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En la presente descripción, se entiende por vehículo farmacéuticamente aceptable, un compuesto o una combinación de compuestos que entran en una composición farmacéutica que no provoca reacciones secundarias y que permite, por ejemplo, la facilitación de la administración del o de los compuestos activos, el aumento de su tiempo de vida útil y/o de su eficacia en el organismo, el aumento de su solubilidad en solución o incluso la mejora de su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son muy conocidos y el experto en la materia los adaptará en función de la clase y del modo de administración del o de los compuestos activos seleccionados.

De preferencia, esos compuestos se administrarán por vía sistémica, en particular por vía intravenosa, por vía intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o sub-cutánea, o por vía oral. De manera más preferente, la composición que comprende los anticuerpos de acuerdo con la invención, se administrará en varias veces, de manera escalonada en el tiempo.

Sus modos de administración, posologías y formas galénicas óptimas se pueden determinar de acuerdo con los criterios que de manera general se tienen en cuenta en el hospital para un tratamiento adaptado a un paciente, como por ejemplo la edad o el peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios comprobados.

De acuerdo con la invención, se describe una composición para el tratamiento del cáncer, que está caracterizada porque comprende como principio activo al menos un anticuerpo monoclonal secretado por el hibridoma registrado en la ATCC con la referencia CRL-2696, o uno de sus fragmentos funcionales.

De manera más particular, se describe una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-CD151, o uno de sus fragmentos funcionales, dicho anticuerpo monoclonal consistiendo en el anticuerpo 50-6.

De la bibliografía se extrae que la proteína CD151 está sobreexpresada en los cánceres y, de manera más particular, en los carcinomas de colon [Hashida y otros, *Br. J. Cancer* 89 (2003): 158-167], los cánceres de pulmón de células no pequeñas [Tokuhara y otros, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001):4.109-4.114], los cánceres de próstata [Ang y otros, *Cancer Epidemiol. Biomarkers* 13 (2004):1.717-1.721] y los cánceres de páncreas [Gesierich y otros, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005):2.840-2.852].

Obviamente, la lista que se ha dado en el párrafo anterior únicamente se da a título ilustrativo y cualquier cáncer debe estar incluido como una sobreexpresión la proteína CD151 y, por lo tanto, susceptible de tratarse de acuerdo con la presente invención. Otra forma de ejecución complementaria de la invención consiste en una composición como la que se ha descrito con anterioridad que comprende, además, como producto de combinación para un uso simultáneo separado o escalonado en el tiempo, un agente citotóxico/citostático.

- 5 La presente invención también se refiere, por lo tanto, a una composición como la que se ha descrito con anterioridad, que está caracterizada porque comprende, además, como producto de combinación para un uso simultáneo, separado o escalonado en el tiempo, al menos un agente citotóxico/citostático y/o una toxina celular y/o un radioelemento.
- Se entiende por “uso simultáneo”, la administración de los dos compuestos de la composición de acuerdo con la invención incluidos en una única y misma forma farmacéutica.
- 10 Se entiende por “uso separado”, la administración, al mismo tiempo, de los dos compuestos de la composición de acuerdo con la invención, incluidos en unas formas farmacéuticas distintas.
- Se entiende por “uso escalonado en el tiempo”, la administración sucesiva de los dos compuestos de la composición de acuerdo con la invención, incluidos cada uno en una forma farmacéutica distinta.
- 15 De una forma general, la composición de acuerdo con la invención aumenta de manera considerable la eficacia del tratamiento del cáncer. En otras palabras, el efecto terapéutico del anticuerpo de acuerdo con la invención se potencia de manera inesperada mediante la administración de un agente citotóxico. Otra gran ventaja subsiguiente producida por una composición de acuerdo con la invención, se refiere a la posibilidad de utilizar unas menores dosis eficaces de principio activo, lo que permite evitar o reducir los riesgos de aparición de los efectos secundarios, en particular el efecto del agente citotóxico. Además, esta composición de acuerdo con la invención permitiría alcanzar el efecto terapéutico esperado de una forma más rápida.
- 20 Por « agentes terapéuticos anti-cáncer » o « agentes citotóxicos » hay que entender una sustancia que, cuando se administra a un paciente, trata o previene el desarrollo del cáncer en el paciente. A título de ejemplo no excluyente para este tipo de agentes, se pueden mencionar los agentes « alquilante », los antimetabolitos, los antibióticos anti-tumorales, los inhibidores mitóticos, los inhibidores de función cromatina, los agentes anti-angiogénesis, los anti-estrógenos, los anti-andrógenos o los inmuno-moduladores.
- 25 Este tipo de agentes se citan, por ejemplo, en el VIDAL, en la página consagrada a los compuestos ligados a la cancerología y la hematología columna « Citotóxicos », estos compuestos citotóxicos citados en referencia a este documento se citan aquí como agentes citotóxicos preferentes.
- 30 Los « agentes alquilantes » hacen referencia a cualquier sustancia que se puede acoplar de manera covalente o alquilar cualquier molécula, de manera preferente un ácido nucleico (p. ej.: ADN), en el interior de una célula. Como ejemplos de este tipo de agentes alquilantes, se pueden citar las mostazas nitrogenadas, como la mecloretamina, el clorambucil, el melfalan, el clorhidrato, el pipobromán, la prednimustina, el fosfato disódico o la estramustina; las oxazafosforinas, como la ciclofosfamida, la altretamina, la trofosfamida, la sulfosofamida o la ifosfamida; las aziridinas o etilenos-iminas como el thiotepa, la trietilenamina o la altretamina; las nitrosoureas como la carmustina, la estreptozocina, la fotemustina o la lomustina; los sulfonatos de alquilo como el busulfán, el treosulfán o el improsulfán; las triazinas como la dacarbazina; o incluso los compuestos del platino como el cisplatino, el oxaliplatino o el carboplatino.
- 35 Los « antimetabolitos » hacen referencia a unas sustancias que bloquean el crecimiento y/o el metabolismo celular interfiriendo con determinadas actividades, de manera general la síntesis de ADN. A título de ejemplo de antimetabolito, se pueden mencionar el metotrexato, 5-fluorouracilo, floxuridina, 5-fluorodeoxiuridina, capecitabina, citarabina, fludarabina, arabinósido de citosina, 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG), clorodesoxiadenosina, 5-azacitdina, gemcitabina, cladribina, deoxicoformicina y la pentostatina.
- 40 Los « antibióticos anti-tumorales » hacen referencia a los compuestos que pueden prevenir o inhibir la síntesis de ADN, de ARN y/o de proteínas. Algunos ejemplos de estos antibióticos anti-tumorales comprenden la doxorubicina, donourubicina, idarubicina, valrubicina, mitoxantrona, dactinomicina, mitramicina, plicamicina, mitomicina C, bleomicina y la procarbazona.
- 45 Los « inhibidores mitóticos » previenen la progresión normal del ciclo celular y de la mitosis. En general, los inhibidores de los microtúbulos o « taxoides » como el paclitaxel y el docetaxel son capaces de inhibir la mitosis. Los alcaloides de vinca, como la vinblastina, la vincristina, la vindesina y la vinorelbina también son capaces de inhibir la mitosis.
- 50 Los « inhibidores de función cromatina » o « inhibidores de topo-isomerasas » hacen referencia a unas sustancias que inhiben la función normal de las proteínas que modelan la cromatina como las topo-isomerasas I y II. Algunos ejemplos de estos inhibidores comprenden, para la topo-isomerasa I, la campotecina, así como sus derivados como el irinotecán o el topotecán, y para la topo-isomerasa II, la etoposida, el fosfato de etoposida y la teniposida.
- 55 Los « agentes anti-angiogénesis » hacen referencia a cualquier droga, compuesto, sustancia o agente que inhibe el crecimiento de los vasos sanguíneos. Algunos ejemplos de agentes anti-angiogénesis comprenden, sin ninguna
- 60
- 65

limitación, los razoxin, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS-27023A, halofuginona, COL-3, neovastat, BMS-275291, talidomida, CDC 501, DMXAA, L-651582, escualamina, endostatina, SU5416, SU6668, interferón-alfa, EMD121974, interleucina-12, IM862, angiostatina y la vitaxina.

5 Los « anti-estrógenos » o « agentes anti-estrogénicos » hacen referencia a cualquier sustancia que reduce, antagoniza o inhibe la acción de los estrógenos. Algunos ejemplos de este tipo de agentes son el tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, idoxifeno, anastrozol, letrozol y el exemestano.

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

15 Los inmunomoduladores son unas sustancias que estimulan el sistema inmunitario. Algunos ejemplos de estos inmunomoduladores comprenden los interferones, las interleucinas como la aldesleucina, OCT-43, denileucina diflitox o la interleucina-2, los factores de necrosis tumoral como la tasonermina, o de otros tipos de inmunomoduladores como el lentinano, el sizofirano, el roquinimex, el pidotimod, la pegadema, la timopentina, el ácido polycitidílico, o el levamisol en combinación con el 5-fluorouracilo.

20 Para más detalles, el experto en la materia podrá remitirse al manual editado por la Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique titulado « tratado de química terapéutica, vol. 6, Medicamentos antitumorales y perspectivas en el tratamiento de los cánceres, edición TEC & DOC, 2003 ».

25 En un modo de realización particularmente preferente, dicha composición como producto de combinación de acuerdo con la invención está caracterizada porque dicho agente citotóxico está acoplado químicamente a dicho anticuerpo para un uso simultáneo.

30 En un modo de realización particularmente preferente, dicha composición de acuerdo con la invención está caracterizada porque dicho agente citotóxico/citostático se selecciona entre los agentes inhibidores o estabilizadores del uso, de preferencia la vinorelbina y/o la vinflunina y/o la vincristina.

35 Con el fin de facilitar la unión entre dicho agente citotóxico y dicho anticuerpo de acuerdo con la invención, se podrán en particular introducir unas moléculas espaciadoras entre los dos compuestos que hay que acoplar, como algunos poli(alquilenos)glicoles como el polietilenglicol, o también unos ácidos aminados, o, en otro modo de realización, utilizar unos derivados activos de dichos agentes citotóxicos en los que se habrán introducido unas funciones capaces de reaccionar con dicho anticuerpo de acuerdo con la invención. Estas técnicas de unión las conoce bien el experto en la materia y no se desarrollarán en la presente invención.

40 La invención se refiere, de acuerdo con otro aspecto, a una composición que está caracterizada porque uno, al menos, de dichos anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmento funcional, se conjuga con una toxina celular y/o un radioelemento.

De preferencia, dicha toxina o dicho radioelemento es capaz de impedir el crecimiento o la proliferación de la célula tumoral, en particular de inactivar totalmente dicha célula tumoral.

45 También de preferencia, dicha toxina es una toxina de enterobacterias, en particular la exotoxina A de Pseudomonas.

50 Los radioelementos (o radio-isótopos) que se conjugan de manera preferente con el anticuerpo empleado en terapia son unos radio-isótopos que emiten unos rayos gamma y de manera preferente la yodo<sup>131</sup>, el itrio<sup>90</sup>, el oro<sup>199</sup>, el paladio<sup>100</sup>, el cobre<sup>67</sup>, el bismuto<sup>217</sup> y el antimonio<sup>211</sup>. Los radio-isótopos que emiten unos rayos beta y alfa también se pueden utilizar en terapia.

55 Por toxina o radioelemento conjugado con al menos un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, se entiende cualquier medio que permite ligar dicha toxina o dicho radioelemento a dicho al menos un anticuerpo, en particular mediante la unión covalente entre los dos compuestos, con o sin introducción de molécula de enlace.

60 Entre los agentes que permiten un enlace químico (covalente), electroestático o no covalente de todo o parte de los elementos del conjugado, se puede mencionar de manera particular la benzoquinona, la carbodiimida y de manera más particular la EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]-carbodiimida clorhidrato), la dimaleimida, el ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB), el N-succinimidil S-acetil-tioacetato (SATA), los agentes denominados de « bridging » que presentan uno o varios grupos, que tienen uno o varios grupos fenilasio, que reaccionan con los ultravioletas (U.V.) y de manera más preferente el N-[4-(acidosalicilamino)butil]-3'-(2'-piridilditio)propionamida (APDP), el N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y el 6-hidrazinonicotinamida (HYNIC).

65 Otra forma de unión, en especial para los radioelementos, puede consistir en el uso de un quelador de iones



bifuncional.

5 Entre los quelatores, se pueden mencionar los quelatos derivados del EDTA (ácido etilendiaminatetraacético) o del DTPA (ácido dietileno-triaminapentaacético) que se han desarrollado para unir unos metales, en particular unos metales radioactivos, y unas inmunoglobulinas. De este modo, el DTPA y sus derivados se pueden sustituir por diferentes grupos en la cadena de carbonos de tal modo que se aumente la estabilidad y la rigidez del complejo ligando-metal (Krejcarek y otros (1977); Brechbiel y otros (1991); Gansow (1991); patente US 4 831 175).

10 Por ejemplo, el DTPA (ácido dietileno-triaminapentaacético) y sus derivados, que se ha utilizado ampliamente en medicina y en biología durante mucho tiempo ya sea en su forma libre, ya sea en la forma de un compuesto con un ión metálico, presenta la notable característica de formar unos quelatos estables con unos iones metálicos y acoplarse a unas proteínas de interés terapéutico o diagnóstico como unos anticuerpos para el desarrollo de radio-  
15 inmunoconjugados en terapia del cáncer (Meases y otros, (1984); Gansow y otros (1990)).

La invención también se refiere a una composición que comprende el anticuerpo de acuerdo con la invención, dicha composición caracterizándose porque comprende, además, al menos un segundo anticuerpo anti-tumoral.

20 La presente invención comprende, además, el uso de la composición de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento.

La presente invención pretende, por lo tanto, de manera más particular el uso de una composición como la que se ha descrito con anterioridad para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer. Entre los cánceres que se pueden prevenir y/o tratar, se prefiere el cáncer de colon, de pulmón, de próstata o de páncreas.

25 La invención también tiene por objeto el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención, para la preparación de un medicamento destinado al reconocimiento específico de un compuesto biológicamente activo hacia unas células que expresan o sobreexpresan el receptor CD151.

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

Se muestran otras características y ventajas de la invención en la siguiente descripción con los ejemplos y las figuras cuyas leyendas se representan a continuación.

### 35 **Legendas de las figuras**

La figura 1 ilustra la actividad anti-tumoral *in vivo* del anticuerpo 50-6 en un modelo de injerto heterólogo de cáncer de próstata. Se ha injertado a unos ratones Swiss Nude (n = 6) por vía subcutánea con unas células PC3. Cinco días después del injerto de las células, los ratones reciben, por vía i. p., una dosis de recuerdo de 2 mg/ratón del anticuerpo que hay que probar seguida de dos administraciones por semana de una dosis de 1 mg/ratón de este anticuerpo. El volumen tumoral se evalúa mediante la fórmula  $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{espesor}$  y se realiza una prueba de Mann y Whitney para la evaluación estadística de los resultados.

45 La figura 2 ilustra la evaluación de la actividad anti-tumoral del anticuerpo TS151 *in vivo* en un modelo ortotópico de cáncer de pulmón. Unos ratones inmunodeprimidos (n = 10) se injertan por vía intrapleurales con  $1.10^6$  células A549. Siete días después del injerto, los ratones se tratan por vía intraperitoneal con una dosis de recuerdo de 2mg de anticuerpo TS151 seguida de un tratamiento, dos veces por semana, durante 5 semanas, con una dosis de 1 mg de anticuerpo por ratón. El lote de control se inyecta con PBS de acuerdo con el mismo esquema de administración.

50 La figura 3 ilustra la evaluación de la especificidad del anticuerpo 50-6 mediante la técnica de western blot. Después de electroforesis SDS-PAGE, el gel se ha coloreado con azul de Coomassie (A) o las proteínas se han transferido a una membrana de nitrocelulosa con el fin de realizar un western blot (B). En este caso, la membrana de transferencia se ha incubado a continuación con el anticuerpo 50-6 (1 µg/ml), a continuación con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Ig de ratón acoplado a la peroxidasa (GE Healthcare) antes de la revelación mediante quimioluminiscencia.

### 60 **Ejemplo 1: Efecto del anticuerpo 50-6 sobre el crecimiento *in vivo* del tumor PC3 implantado de forma subcutánea en el ratón Nude**

Habiéndose observado una sobreexpresión de CD151 en los tejidos tumorales de cáncer de próstata mediante inmunohistoquímica, se ha considerado una evaluación del anticuerpo anti-CD151 50-6 sobre un injerto heterólogo de células de cáncer de próstata PC3. La línea PC3 es una línea prostática andrógeno-independiente originaria de la ATCC y cultivada en un medio F12K + 10 % SVF + L-Glutamina. Para la evaluación,  $5.10^6$  células PC3 se implantan sobre el costado derecho de un ratón Swiss Nude. Cinco días después de la implantación, los animales se controlan de manera aleatoria sobre la base del volumen tumoral y se distribuyen en 2 grupos comparables. El volumen

tumoral de los animales injertados seleccionados está incluido entre 41 y 47 mm<sup>3</sup> (volumen calculado con la fórmula  $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{espesor}$ ) en el día 0 del tratamiento. Los animales reciben entonces el anticuerpo purificado que hay que probar o PBS (grupo de control) por vía intra-peritoneal. Las dosis de anticuerpo y la frecuencia de las inyecciones son las siguientes: dosis de recuerdo 2 mg/dosis de anticuerpo; dosis de mantenimiento 1 mg/dosis 2 veces por semana.

Los resultados que se presentan en la figura 1 muestran que el anticuerpo 50-6 inhibe de manera significativa el crecimiento del tumor PC3 implantado en posición subcutánea en el ratón Swiss Nude. Un análisis estadístico muestra que esta inhibición del crecimiento tumoral es significativo, con respecto al grupo de control, a partir del día 10 de tratamiento ( $p \leq 0,01$ ).

### **Ejemplo 2: Evaluación de la actividad anti-tumoral del anticuerpo 50-6 en un modelo ortotópico de cáncer de pulmón**

Las células A549 originarias de la ATCC se cultivan de rutina en un medio F12K, 10 mM de glutamina, 10 % de SVF. Estas células se dividen 2 días antes del injerto con el fin de que estas se encuentren en fase exponencial de crecimiento. Para el injerto, se anestesian a unos ratones inmunodeprimidos de 7 semanas con recibir 1.10<sup>6</sup> células A549 por vía intrapleuraleal. El tumor primario se desarrolla con rapidez e invade en 4 días las estructuras adyacentes al punto de inyección que incluye el mediastino, los pulmones y el diafragma. Para imitar mejor a la enfermedad, el inicio del tratamiento solo comienza 7 días después de la implantación de las células, por vía intra-peritoneal. Después de la inyección de una dosis de recuerdo de 2 mg/ratón, el anticuerpo 50-6 se administra 2 veces por semana, durante 5 semanas con la dosis de 1 mg/ratón. Un grupo de ratones que reciben PBS se introduce como grupo de control dado que las experiencias realizadas de manera previa han mostrado que la administración de un isotipo de control IgG1 no tenía ningún impacto en la supervivencia de los animales.

El parámetro de evaluación de este modelo es la supervivencia de los animales y la actividad anti-tumoral se expresa mediante el cálculo del T/C % = mediana de supervivencia de los animales tratados/mediana de supervivencia de los animales del grupo de control X 100. Se ha establecido que un T/C % superior o igual al 125 % marca una actividad del producto.

La figura 2 muestra una actividad anti-tumoral del anticuerpo 50-6 con un T/C % calculado del 127 % ( $p < 0,001$ ). Este resultado confirma la actividad anti-metastásica del anticuerpo 50-6.

### **Ejemplo 3: especificidad del anticuerpo 50-6**

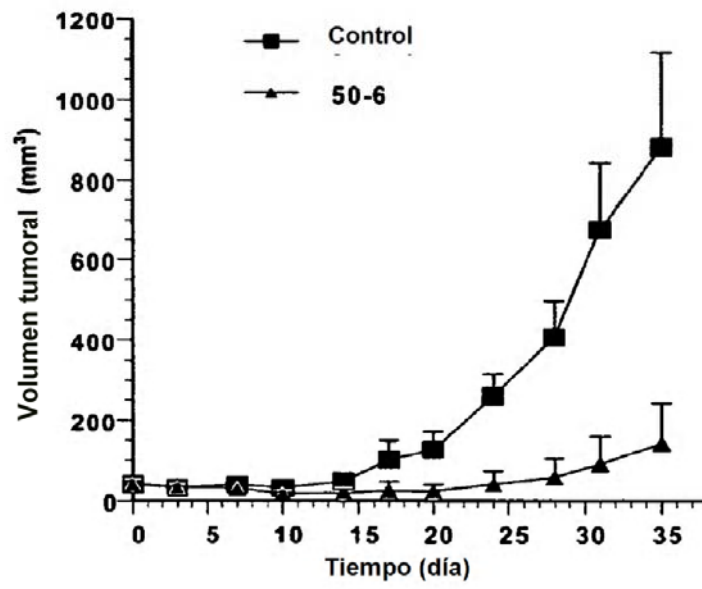
La especificidad del anticuerpo 50-6 se ha evaluado por medio de la técnica western blot. La proteína recombinante EC2 CD151 (5 µg) se ha depositado sobre un gel de acrilamida del 4-12% (BioRad). Después de la electroforesis (condiciones no reductoras), las proteínas se han transferido sobre membranas de nitrocelulosa. Las membranas de transferencia se han incubado a continuación con los anti-cuerpos 50-6 purificados (1 µg/ml), y a continuación con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Ig de ratón acoplado a la peroxidasa (GE- Healthcare) antes de la revelación mediante quimioluminiscencia.

El bucle EC2 de CD151 se ha clonado en el vector pET22b para una expresión en forma soluble en el periplasma de Escherichia coli. La proteína producida consta de los ácidos aminados 130 a 221 de la secuencia peptídica de CD151 humano, a los que se añade una cola Poli-His en posición C- terminal para facilitar la purificación. La proteína EC2 recombinante se ha purificado mediante cromatografía de afinidad sobre metales inmovilizados (IMAC) sobre soporte Chelating Sepharose HP (GE Healthcare).

La figura 3 muestra que el anticuerpo anti-CD151 50-6 reconoce específicamente el bucle EC2 mediante la técnica de western blot. Este anticuerpo es conformacional ya que se comprueba una pérdida de reconocimiento cuando el western blot se realiza después de un análisis SDS- PAG en condiciones reductoras.

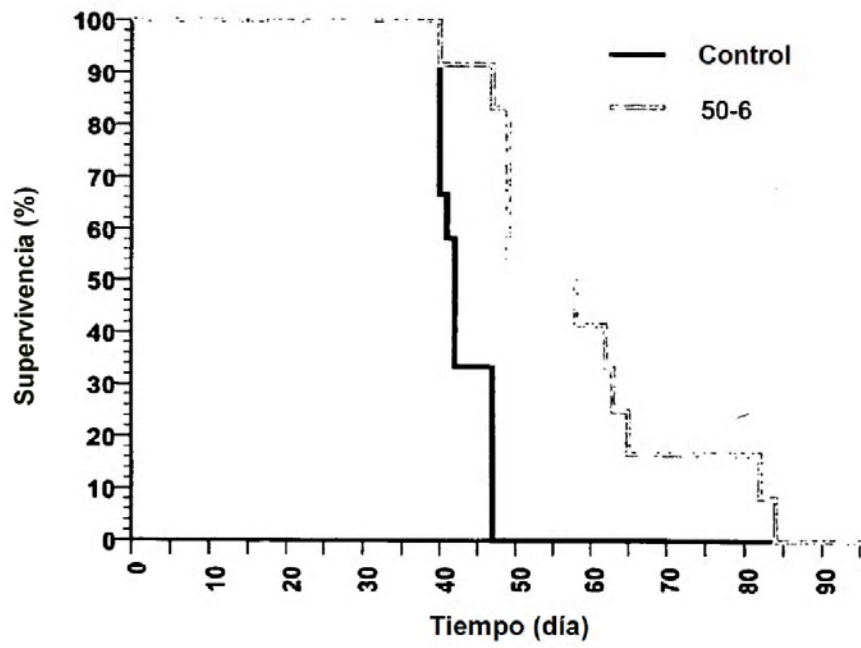
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un anticuerpo monoclonal, capaz de unirse específicamente a la proteína CD151, secretado por el hibridoma registrado en la ATCC con la referencia CRL-2696, o uno de sus fragmentos funcionales, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los tumores primarios para el tratamiento precoz del cáncer.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, que está caracterizado porque dicho anticuerpo es capaz de inhibir la actividad promotora de metástasis de dicha proteína CD151 en el interior de las células tumorales.
3. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está caracterizado porque dichos cánceres consisten en los cánceres de colon, de pulmón, de próstata o de páncreas.
- 15 4. Composición que está caracterizada porque esta comprende como principio activo al menos un anticuerpo monoclonal, capaz de unirse específicamente a la proteína CD151, secretado por el hibridoma registrado en la ATCC con la referencia CRL-2696, o uno de sus fragmentos funcionales, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los tumores primarios.
- 20 5. Composición de acuerdo con la reivindicación 4, que está caracterizada porque esta comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 6. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, que está caracterizada porque esta comprende, además, como producto de combinación para un uso simultáneo, separada o escalonada en el tiempo, al menos un agente citotóxico/citostático y/o una toxina celular y/o un radioelemento.
7. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que está caracterizada porque esta comprende, además, al menos un segundo anticuerpo anti-tumoral.
- 30 8. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento precoz del cáncer.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, que está caracterizado porque dicho cáncer se selecciona entre el cáncer de colon, de pulmón, de próstata y de páncreas.



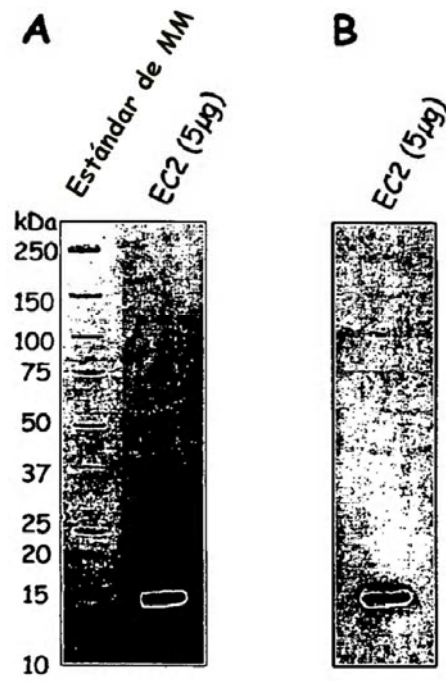
**Figura 1**

HOJA DE SUSTITUCIÓN (NORMA 26)



**Figura 2**

HOJA DE SUSTITUCIÓN (NORMA 26)



**Figura 3**

HOJA DE SUSTITUCIÓN (NORMA 26)