

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 382 942**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04810905 .2**

(96) Fecha de presentación: **12.11.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1691836**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

(54) Título: **Terapia anti-pecam para la supresión de la metástasis**

(30) Prioridad:

13.11.2003 US 519986 P

(73) Titular/es:

**Sutter West Bay Hospitals
475 Brannan Street, Suite 220
San Francisco, CA 94107 , US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:

14.06.2012

(72) Inventor/es:

DEBS, Robert

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:

14.06.2012

(74) Agente/Representante:

Zea Checa, Bernabé

ES 2 382 942 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

Terapia anti-pecam para la supresión de la metástasis

5 Campo de la invención

[0001] La invención se refiere a la identificación de un método y a composiciones relacionadas para inhibir la capacidad metastásica de células neoplásicas en un paciente. Los métodos y composiciones comprenden un PECAM-an anticuerpo anti-PECAM-1 y métodos para tratar la enfermedad usando un anticuerpo anti-PECAM-1 para modular la invasividad y el potencial metastásico de células neoplásicas.

Antecedentes de la invención

[0002] La oncogénesis se describió por Foulds (1958) como un proceso biológico de múltiples etapas, que actualmente se sabe que se produce por la acumulación de lesiones genéticas. A nivel molecular, el proceso de múltiples etapas de la tumorigénesis implica la alteración de efectos reguladores tanto positivos como negativos (Weinberg, 1989). Se ha postulado que la base molecular de los carcinomas de colon humanos, según Vogelstein y colaboradores (1990), implica varios oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación. De forma similar, se han asociado defectos que conducen al desarrollo de retinoblastoma a otro gen supresor de tumores (Lee et al., 1987). Se han identificado otros oncogenes y supresores de tumores adicionales en una diversidad de malignidades distintas. Desafortunadamente, sigue habiendo un número inadecuado de cánceres tratables, y los efectos del cáncer son catastróficos - más de medio millón de muertes al año sólo en los Estados Unidos.

[0003] El cáncer es fundamentalmente una enfermedad genética en la que lesiones en el ADN celular conducen a la alteración de los mecanismos normales que controlan la proliferación celular. Dos de los mecanismos de acción por los que los supresores tumorales mantienen la integridad genómica es mediante la detención celular, que permite reparar el ADN dañado, o la eliminación del ADN dañado por apoptosis (Ellisen y Haber, 1998; Evan y Littlewood, 1998). La apoptosis, denominada de otra manera "muerte celular programada", es una red regulada cuidadosamente de acontecimientos bioquímicos que actúan como un programa de suicidio celular destinado a eliminar células dañadas irreversiblemente. La apoptosis puede desencadenarse de varias formas incluyendo unión del factor de necrosis tumoral, lesión en el ADN, eliminación de factores de crecimiento y entrecruzamiento de anticuerpos o receptores Fas. Aunque se han identificado varios genes que intervienen en el proceso apoptótico, no se han esclarecido completamente las rutas que conducen a la apoptosis. Muchos investigadores han intentado identificar nuevos genes promotores de la apoptosis con el objetivo de que dichos genes produzcan un medio para inducir la apoptosis selectivamente en células neoplásicas para tratar el cáncer en un paciente.

[0004] Una estrategia alternativa para tratar el cáncer implica la supresión de la angiogénesis con agentes tales como Endostatin™ o anticuerpos anti-VEGF. En esta estrategia, el objetivo es prevenir la vascularización adicional del tumor primario y potencialmente limitar el tamaño de las lesiones metastásicas a uno que pueda soportar la supervivencia de las células neoplásicas sin un crecimiento vascular sustancial.

[0005] La molécula de adhesión a células endoteliales/plaquetas (PECAM-1; CD31) es una proteína que se encuentra en las células endoteliales y neutrófilos, y se ha demostrado que está implicada en la migración de los leucocitos a través del endotelio. En el documento WO03055516A1 se describe la modulación de la actividad de PECAM-1 para el tratamiento de afecciones cardiovasculares tales como trombosis e ictus de oclusión vascular y para el tratamiento o para reducir la aparición de trastornos de hemostasis. PECAM-1 también se ha implicado en el proceso inflamatorio y se ha notificado que el anticuerpo monoclonal anti-PECAM-1 bloquea el reclutamiento de neutrófilos *in vivo*. (Nakada et al. (2000) J. Immunol. 164: 452-462). Se han presentado ratones knockout para PECAM-1 y parecen tener una migración de leucocitos, agregación plaquetaria y desarrollo vascular normal, lo que implica que hay moléculas de adhesión redundantes que pueden compensar la pérdida de PECAM-1 (Duncan et al. (1999) J. Immunol. 162: 3022-3030). Se ha notificado que anticuerpos monoclonales contra PECAM-1 bloquean la formación de tubos endoteliales murinos e indicadores relacionados de la vascularización en un modelo de trasplante de tumor (Zhou et al. (1999) Angiogenesis 3: 181-188 y en un modelo humano de trasplante de piel (Cao et al. (2002) Am. J. Physiol. Cell Physiol. 282: C1181-C1190). Sin embargo, el papel de PECAM-1 en la angiogénesis tumoral, si lo hay, aún no se ha definido.

[0006] A pesar de los esfuerzos sustanciales para inhibir el cáncer y la metástasis de tumores con estrategias antiangiogénicas, hasta la fecha no hay ningún fármaco aprobado y comercializado para tratar el cáncer únicamente mediante la inhibición de la angiogénesis. De hecho, se desconocen los papeles específicos de diversas moléculas de adhesión, incluyendo PECAM-1, en los procesos de neoplasia y metástasis.

[0007] En la técnica existe la necesidad de un método y de composiciones relacionadas para inhibir el potencial metastásico de células cancerosas en pacientes. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona aspectos relacionados deseados por los expertos en este campo.

[0008] Las referencias analizadas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada del presente documento debe considerarse una admisión de que los inventores no tienen derecho a ejercer el derecho de prioridad de dicha divulgación en virtud de invención previa.

5

[0009] Zhou, et al., 1999, Angiogenesis, vol. 3, nº. 2, págs. 181-188, describen estudios del papel de la molécula de adhesión a células endoteliales/plaquetas (PECAM-1/CD31) en modelos de angiogénesis tumoral en ratones. Se descubrió que un anticuerpo contra PECAM-1 murina, que se había demostrado que bloqueaba *in vitro* la formación de tubos endoteliales murinos, inhibía el crecimiento subcutáneo y la vascularidad tumoral de tres tumores en 10 ratones. Los autores concluyen que los resultados sugieren un posible papel para PECAM-1 en el proceso complejo de angiogénesis tumoral.

Sumario de la invención

15 **[0010]** La presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-PECAM-1 en la fabricación de un medicamento para administración sistémica para reprimir la metástasis o la invasividad de una célula neoplásica en un mamífero.

20 **[0011]** En una realización, la célula neoplásica es una célula de melanoma, una célula de carcinoma de mama, una célula de carcinoma de colon o una célula de carcinoma de pulmón.

[0012] En una realización, la célula neoplásica es una célula humana.

25 **[0013]** En una realización, el anticuerpo anti-PECAM-1 es un anticuerpo monoclonal.

[0014] En una realización, la célula neoplásica carece de unión a un anticuerpo anti-PECAM-1 y PECAM-1 no es detectable en dicha célula neoplásica.

30 **[0015]** En una realización, el medicamento es un medicamento para inyección intraperitoneal.

[0016] En una realización, la administración es la administración después de que se haya establecido el crecimiento del tumor en dicho mamífero.

35 **[0017]** En una realización, la administración es una administración después de que se hayan presentado células tumorales en el sistema circulatorio de dicho mamífero durante al menos 7 días.

[0018] En una realización, el crecimiento tumoral comprende al menos una colonia multicelular de células neoplásicas.

40 **[0019]** En una realización, las células neoplásicas son células tumorales humanas.

[0020] En una realización, la administración es la administración de una pluralidad de dosis de dicho medicamento, en la que dicha pluralidad de dosis comprende al menos cinco dosis, administrándose cada dosis con un intervalo de al menos dos días, donde cada dosis comprende al menos 200 µg del anticuerpo anti-PECAM-1.

45 **[0021]** En una realización, dicho mamífero ha tenido células neoplásicas en su cuerpo durante al menos siete días antes de la administración de dicho medicamento.

Descripción

50

[0022] La presente invención se refiere al descubrimiento inesperado de que la administración sistémica de un anticuerpo que se une a PECAM-1 suprime la extensión metastásica de una amplia diversidad de tipos diferentes de tumores que típicamente son fatales en seres humanos, y este efecto se consigue independientemente de cualquier inhibición de la angiogénesis, si la hay. Este descubrimiento inesperado proporciona una base para la generación de 55 nuevos tratamientos y medicamentos anticancerosos, en los que se administra una dosificación sistémica de un anticuerpo anti-PECAM-1 a un paciente para inhibir o reducir la invasividad y/o potencial metastásico de células neoplásicas en el paciente.

[0023] En el presente documento se describen métodos para reprimir la transformación neoplásica en una célula, 60 comprendiendo el método administrar un anticuerpo anti-PECAM-1 sistémicamente en una cantidad eficaz para inhibir el fenotipo transformado y reducir la invasividad y/o potencial metastásico detectable de la célula. En una realización, el anticuerpo anti-PECAM-1 puede unirse a una PECAM localizada en una célula somática no neoplásica o puede unirse a PECAM o a una macromolécula que presenta reacción cruzada presente en una célula neoplásica.

65

- [0024]** En relación con la invención, un anticuerpo anti-PECAM-1 puede comprender un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal humanizado o de secuencia humana, y un fragmento de anticuerpo que comprende F(ab)2, F(ab')2, F9ab, F(ab), Dab, Fv, scFv, Fc o una unidad de reconocimiento mínima de un anticuerpo que tiene la propiedad de unirse a PECAM-1 humana con una afinidad de al menos aproximadamente 1×10^8 M.
- 5 **[0025]** En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PECAM-1 está unido covalentemente a poli(etilen)glicol (PEG), tal como un PEG lineal 30K, 40 K, 60 K o un PEG más ramificado - o restos de PEG lineales o ramificados de mayor tamaño, mediante una sola unión o mediante múltiples uniones.
- 10 **[0026]** En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el descubrimiento del inventor de que un anticuerpo anti-PECAM-1 administrado sistémicamente puede inhibir la metástasis se usará en combinación con otras terapias anti-transformación/anti-cáncer. Estas otras terapias pueden ser conocidas en el momento de esta solicitud, o pueden hacerse patentes después de la fecha de esta solicitud. Por ejemplo, un anticuerpo anti-PECAM-1 de secuencia humana o humanizada puede usarse en combinación con otros polipéptidos terapéuticos, 15 polinucleótidos que codifican otros polipéptidos terapéuticos o agentes quimioterapéuticos. En una realización representativa, el agente quimioterapéutico es taxol. El anticuerpo anti-PECAM-1 también puede usarse junto con radioterapia. El tipo de radiación ionizante que constituye la radioterapia puede seleccionarse entre el grupo que comprende rayos x, rayos gamma y microondas. En ciertas realizaciones, la radiación ionizante puede administrarse por irradiación de haces externos o mediante la administración de un radionúclido. El anticuerpo anti-PECAM-1 20 también puede usarse con regímenes de terapia génica.
- 25 **[0027]** En el presente documento se describen métodos de tratamiento para muchos cánceres humanos. El método de tratamiento comprende tratar a un paciente que tiene un neoplasma diagnosticado, típicamente un carcinoma o sarcoma u otro tipo de su tumor sólido, con una dosificación sistémica de anticuerpo anti-PECAM-1 preferiblemente liberada mediante administración subcutánea o intravenosa, o por vía intratecal en el cerebro para 30 inhibir metástasis cerebrales. Las variaciones preferidas del método incluyen el tratamiento de un paciente que tiene un carcinoma de mama, carcinoma de pulmón o carcinoma de pulmón diagnosticado, mediante la administración de una dosis eficaz de un anticuerpo anti-PECAM-1, tal como un anticuerpo monoclonal anti-PECAM-1 de secuencia humana o humanizada, a través de una vía sistémica tal como subcutánea o intravenosa.
- 30 **[0028]** En ciertos otros aspectos de la presente divulgación se proporcionan kits terapéuticos que comprenden en un recipiente adecuado, una formulación farmacéutica de un anticuerpo anti-PECAM-1. Dicho kit puede comprender además una formulación farmacéutica de un polipéptido terapéutico, polinucleótido que codifica un polipéptido terapéutico o agente quimioterapéutico. Dichos kits pueden comprender agentes de radiosensibilización, 35 instrucciones para la administración de un anticuerpo anti-PECAM-1 a un paciente humano al que se le ha diagnosticado un neoplasma - particularmente un neoplasma de pulmón, colon o mama o en una variación un melanoma - mediante administración sistémica. En una variación preferida, el kit comprende una secuencia humana o humanizada de un anticuerpo monoclonal anti-PECAM-1 que está PEGilado.
- 40 **[0029]** También se desvelan en el presente documento anticuerpos que se unen a PECAM-1 humana con una afinidad de al menos aproximadamente 1×10^7 M⁻¹ y que carecen de unión de alta afinidad específica por otros polipéptidos relacionados con PECAM. Dichos anticuerpos pueden usarse terapéuticamente por administración sistémica, intracraneal o dirigida a células neoplásicas (por ejemplo, por cationización o por administración con liposomas o inmunoliposomas).
- 45 **[0030]** También se desvelan en el presente documento agentes terapéuticos que inhiben la neoplasia, invasividad y/o metástasis mediante la modulación de la función de PECAM-1 y que no inhiben la angiogénesis; dichos agentes pueden usarse como agentes farmacéuticos.
- 50 **[0031]** También se desvela en el presente documento un método para tratar a pacientes que tienen un tumor sólido diagnosticado y para los que la inhibición de la angiogénesis sería perjudicial; tales como pacientes que han sufrido recientemente un infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, ictus, aterosclerosis de los vasos coronarios o del sistema cerebrovascular, o que tienen un proceso de curación de heridas significativo debido a lesiones o a una cirugía mayor y que se benefician de la angiogénesis como ayuda a su curación o para restaurar la 55 circulación.
- 60 **[0032]** En una variación descrita en el presente documento, se administra una dosis inmunogénica de una PECAM-1 humana desnaturalizada o una PECAM-1 no humana tal como una proteína PECAM-1 de primate, ratón, rata, perro o cerdo o una parte de la misma a un paciente humano al que se le ha diagnosticado un neoplasma, típicamente en combinación con un adyuvante y/o un polinucleótido inmunoestimulador unido covalentemente o no unido tal como los descritos por Dynavax o Coley Pharmaceuticals. De esta manera, el paciente humano puede fabricar una respuesta inmune, incluyendo una respuesta de anticuerpos, que reaccionará de forma cruzada con su propia proteína PECAM-1 a la que de otra manera sería tolerante.

[0033] Se obtendrá una comprensión adicional de la naturaleza y ventajas de la invención mediante referencia a las demás partes de la memoria descriptiva y dibujos.

[0034] Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes tras la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan sólo a modo de ilustración.

FIGURAS

[0035]

10 Las Figuras 1A y 1B muestran los efectos del tratamiento con anticuerpos en ratones.

Las Figuras 2a y 2B muestran efectos del tratamiento con anticuerpos.

15 Las Figuras 3A y 3B muestran efectos del tratamiento con anticuerpos en ratones.

Las Figuras 4A y 4B muestran efectos del tratamiento con anticuerpos en ratones.

Las Figuras 5A y 5B muestran efectos del tratamiento con anticuerpos.

20 **Descripción de las realizaciones preferidas**

[0036] A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados entendidos comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención puede usarse cualquier método o material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, se describen los métodos y materiales preferidos. Para los fines de la presente invención, a continuación se definen los siguientes términos.

[0037] Se hace referencia a los siguientes documentos de patentes: U.S. 5.968.511; WO0155178; U.S. 6.639.055; 30 U.S. 6.133.426; WO03055516; WO02085405; y U.S. 6.627.196 - incluyendo métodos y materiales descritos en los mismos.

Definiciones

35 **[0038]** El término "natural", como se usa en el presente documento cuando se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse a partir de una fuente natural y que no se ha modificado intencionadamente por el ser humano en el laboratorio es natural. En general, el término natural se refiere a un objeto como se presenta en un individuo no patológico (no enfermo), tal como sería 40 típico para la especie.

[0039] Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como base para 45 una comparación de secuencias; una secuencia de referencia puede ser una subserie de una secuencia de mayor tamaño, por ejemplo, como un segmento de un ADNc de longitud completa o una secuencia génica proporcionada en un listado de secuencias, tal como una secuencia polinucleotídica de la Fig. 2, o puede comprender una ADNc o secuencia génica completa. En general, una secuencia de referencia tiene al menos 20 nucleótidos de longitud, frecuentemente al menos 25 nucleótidos de longitud y a menudo al menos 50 nucleótidos de longitud. Como dos 50 polinucleótidos pueden (1) comprender una secuencia (es decir, una parte de la secuencia polinucleotídica completa) que es similar entre los dos nucleótidos y (2) puede comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos típicamente se realizan comparando secuencias de los dos polinucleótidos en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia.

55 **[0040]** Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones de nucleótidos contiguas en el que una secuencia polinucleotídica puede compararse con una secuencia de referencia de al menos 20 nucleótidos contiguos y donde la parte de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (es decir, huecos) de un 60 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482, por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444, por 65 aplicaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software,

Edición 7.0, de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (es decir, el que da como resultado el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generado por los diversos métodos.

5 [0041] La expresión “identidad de secuencia” significa que dos secuencias polinucleotídicas son idénticas (es decir, en una base nucleótido por nucleótido) sobre la ventana de comparación. La expresión “porcentaje de identidad de secuencia” se calcula comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparece una base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) en las dos secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el
10 número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. La expresión “identidad sustancial”, como se usa en el presente documento, indica una característica de una secuencia polinucleotídica, donde el polinucleótido comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 por ciento, preferiblemente una identidad de al menos el 85 por ciento y con frecuencia una identidad
15 de secuencia del 90 al 95 por ciento, más habitualmente una identidad de secuencia de al menos el 99 por ciento en comparación con una secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótidos, con frecuencia sobre una ventana de al menos 25-50 nucleótidos, calculándose el porcentaje de identidad de secuencia comparando la secuencia de referencia con la secuencia polinucleotídica que puede incluir
20 delecciones o adiciones que suman un total del 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser una subserie de una secuencia de mayor tamaño.

[0042] Cuando se aplica a polipéptidos, la expresión “identidad sustancial” significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante el programa GAP o BESTFIT usando pesos de huecos por defecto, comparten al menos un 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un
25 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia o más (por ejemplo, un 99 por ciento de identidad de secuencia). Preferiblemente, las posiciones de restos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas.

30 [0043] Sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos
35 que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Son grupos preferidos de sustitución conservativa de aminoácidos: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina asparagina-glutamina.

40 [0044] El término “fragmento”, como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxi-terminal, pero en el que el resto de la secuencia de aminoácidos es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia deducida a partir del ADNC de longitud completa. Los fragmentos típicamente tienen al menos 14 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 20 aminoácidos de longitud, normalmente al menos 50 aminoácidos de longitud o más, hasta la longitud de un polipéptido natural de longitud completa.

45 [0045] El término “agente” se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una matriz de compuestos localizados espacialmente (por ejemplo, una matriz de péptidos VLSIPS, una matriz de polinucleótidos y/o una matriz combinatoria de moléculas pequeñas), una macromolécula biológica, una biblioteca de presentación de anticuerpos en bacteriófagos (por ejemplo, scFv), una biblioteca de
50 presentación de péptidos en polisomas o un extracto obtenido a partir de materiales biológicos tales como bacterias y células o tejidos de plantas, hongos o animales (particularmente mamíferos). Los agentes se evalúan con respecto a su actividad potencial como antineoplásicos, antiinflamatorios o moduladores de la apoptosis por inclusión en ensayos de exploración descritos más adelante. Los agentes se evalúan con respecto a la actividad potencial como inhibidores específicos de la interacción de proteínas (es decir, un agente que inhibe selectivamente una interacción
55 de unión entre dos polipéptidos predeterminados pero que no interfiere sustancialmente con la viabilidad celular) por inclusión en ensayos de exploración descritos más adelante.

[0046] La expresión “inhibidor de la interacción de proteínas” se usa en el presente documento para hacer referencia a un agente que se identifica por uno o más métodos de exploración descritos en el presente documento
60 como un agente que inhibe selectivamente la unión proteína-proteína entre un primer polipéptido de interacción y un segundo polipéptido de interacción. Algunos inhibidores de la interacción de proteínas pueden tener potencial terapéutico como fármacos para uso humano y/o pueden servir como reactivos comerciales para investigación de laboratorio o control de bioprocessos. Los inhibidores de la interacción de proteínas que son fármacos candidatos después se ensayan adicionalmente con respecto a la actividad en ensayos que se usan rutinariamente para

predecir la idoneidad para uso como fármacos humanos y veterinarios, incluyendo la administración *in vivo* en animales no humanos e incluyendo con frecuencia la administración a humanos en ensayos clínicos aprobados.

[0047] La expresión “agente antineoplásico” se usa en el presente documento para hacer referencia a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir el desarrollo o progresión de un neoplasma en un ser humano, particularmente un tipo de tumor sólido propenso a metástasis.

[0048] Como se usan en el presente documento, los términos “marcador” o “marcado” se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, por incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de restos biotinilados que pueden detectarse por avidina marcada, (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse por métodos ópticos o calorimétricos). Se conocen en la técnica y pueden usarse diversos métodos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos biotinilo, epítitos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, polipéptido activador de la transcripción, dominios de unión a metales, marcadores de epítitos). En algunas realizaciones, los marcadores se unen por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

[0049] Como se usa en el presente documento, “sustancialmente puro” significa que la especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie macromolecular individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto constituye al menos aproximadamente un 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En general, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente un 80 a un 90 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. Aún más preferiblemente, la especie objeto se purifica hasta una homogeneidad esencial (no pueden detectarse especies contaminantes en la composición por métodos de detección convencionales) donde la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular. Las especies de disolventes, moléculas pequeñas (<500 Dalton) y especies de iones elementales no se consideran especies macromoleculares.

[0050] Como se usa en el presente documento, “sangre normal” o “sangre humana normal” se refiere a sangre de un individuo humano sano que no tiene una enfermedad neoplásica activa u otro trastorno de proliferación linfocítica, o una predisposición identificada a desarrollar una enfermedad neoplásica. De forma similar, “células normales”, “muestra celular normal”, “tejido normal” y “ganglio linfático normal” se refieren a la muestra respectiva obtenida a partir de un individuo humano sano que no tiene una enfermedad neoplásica activa u otro trastorno linfoproliferativo.

[0051] Como se usa en el presente documento, la expresión “condición fisiológica” se refiere a la temperatura, pH, intensidad iónica, viscosidad y parámetros bioquímicos similares que son compatibles con un organismo viable, y/o que típicamente existen intracelularmente en una célula de mamífero o célula de levadura cultivada viable. Por ejemplo, las condiciones intracelulares en una célula de levadura cultivada en condiciones de cultivo de laboratorio típicas son condiciones fisiológicas. Las condiciones de reacción *in vitro* adecuadas para cócteles de transcripción *in vitro* generalmente son condiciones fisiológicas. En general, las condiciones fisiológicas *in vitro* comprenden NaCl o KCl 50-200 mM, pH 6,5-8,5, 20-45°C y catión divalente (por ejemplo Mg^{++} , Ca^{++}) 0,001-10 mM; preferiblemente NaCl o KCl aproximadamente 150 mM, pH 7,2-7,6, catión divalente 5 mM, y con frecuencia incluyen un 0,01-1,0 por ciento de proteína no específica (por ejemplo, BSA). Con frecuencia puede estar presente un detergente no iónico (Tween, NP-40, Triton X-100), normalmente aproximadamente a un 0,001-2%, típicamente a un 0,05-0,2% (v/v). Las condiciones acuosas particulares pueden seleccionarse por el experto de acuerdo con métodos convencionales. Como pauta general, pueden ser aplicables las siguientes condiciones acuosas tamponadas: NaCl 10-250 mM, Tris HCl 5-50 mM, pH 5-8, con la adición opcional de uno o más cationes divalentes y/o quelantes metálicos y/o detergentes no iónicos y/o fracciones de membrana y/o agentes antiespumantes y/o agentes de centelleo.

[0052] Como se usan en el presente documento, las expresiones “segmento polipeptídico de interacción” y “secuencia polipeptídica de interacción” se refieren a una parte de una proteína híbrida que puede formar una interacción de unión específica con una parte de una segunda proteína híbrida en condiciones de unión adecuadas. En general, una parte de la primera proteína híbrida preferiblemente se une a una parte de la segunda proteína híbrida formando un heterodímero o un heteromultímero de orden superior que comprende la primera y segunda proteínas híbridas; las partes de unión de cada proteína híbrida se denominan segmentos de polipéptidos de interacción. En general, los polipéptidos de interacción pueden formar heterodímeros con una constante de disociación (K_D) de al menos aproximadamente $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, normalmente de al menos $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, típicamente de al menos $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, preferiblemente de al menos $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ a $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ o mayor, en condiciones fisiológicas adecuadas.

[0053] Como se usa en el presente documento, el término “multímero” comprende un dímero y complejos de orden superior (trímero, tetrámero, pentámero, hexámero, heptámero, octámero, etc.). “Homomultímero” se refiere a complejos compuestos por las mismas especies de subunidad. “Heteromultímero” se refiere a complejos compuestos de más de una especie de subunidad.

5

[0054] El término “recombinante” usado en el presente documento se refiere a PECAM-1 producida por técnicas de ADN recombinante donde el gen que codifica la proteína se clona por tecnología de ADN recombinante conocida. Por ejemplo, el gen humano de *PECAM-1* puede insertarse en un vector de ADN adecuado, tal como un plásmido bacteriano, y el plásmido puede usarse para transformar un hospedador adecuado. El gen después se expresa en el 10 hospedador para producir la proteína recombinante. El hospedador transformado puede ser procariota o eucariota, incluyendo células de mamífero, levadura, *Aspergillus* y células de insecto.

[0055] “Anticuerpos” (Ab) e “inmunoglobulinas” (Ig) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Aunque los anticuerpos presentan especificidad de unión a un antígeno específico, las 15 inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad de antígeno. Se producen polipéptidos de este último tipo, por ejemplo, a bajos niveles por el sistema linfático y a niveles mayores por mielomas. El término “anticuerpo” se usa en su sentido más amplio e incluye específicamente, sin limitación, anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y 20 fragmentos de anticuerpos siempre que presenten la actividad biológica deseada.

[0056] “Anticuerpos nativos” e “inmunoglobulinas nativas” normalmente son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque el número 25 de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tienen enlaces disulfuro intracatenarios separados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en el otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera 30 está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada.

[0057] El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren considerablemente en secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo 35 particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena pesada como en los de cadena ligera. Las partes más conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden, cada uno, cuatro regiones FR, que adoptan 40 en gran medida una configuración de lámina beta, conectada por tres CDR, que forma bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura de lámina beta. Las CDR de cada cadena se mantienen muy próximas entre sí por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígenos de los anticuerpos (véase Kabat et al., NIH Publ. Nº 91-3242, Vol. 1, páginas 647-669 (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan 45 diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

[0058] La expresión “región hipervariable”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende 50 restos de aminoácido de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (es decir, restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md. [1991]) y/o los restos de un “bucle hipervariable” (es decir, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en 55 el dominio variable de cadena pesada; Clothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 [1987]). Los restos “marco” o “FR” son los restos de dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable como se define en el presente documento.

[0059] Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región 60 de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0060] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y también es capaz de entrecruzarse con un antígeno.

5

[0061] "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión y de reconocimiento de antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_HV_L. Colectivamente, las 10 seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con menor afinidad que el sitio de unión completo.

[0062] El fragmento Fab también contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio 15 constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para el Fab' en el que el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos.

20 También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0063] Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) procedentes de cualquier especie de vertebrados pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos denominados kappa (κ) y lambda (λ) basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

25

[0064] Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a clases diferentes. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las clases diferentes de 30 inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulina son conocidas.

[0065] La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos 35 individuales que constituyen la población son idénticos con la excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, al dirigirse contra un solo sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (políclonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los 40 anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que se sintetizan por el cultivo de hibridoma, sin contaminarse por otras inmunoglobulinas. El calificativo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe considerarse que se requiera la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la 45 presente invención pueden obtenerse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature 256: 495 [1975], o pueden obtenerse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., Nature, 352: 624-628 [1991] y Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

50 **[0066]** Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "químéricos", en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes de anticuerpos procedentes de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de 55 anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 81: 6851-6855 [1984]).

[0067] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas químéricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras 60 subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulinas no humanas. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una CDR del receptor se han reemplazado por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los restos FR de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos 65 no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se

encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR o las secuencias marco importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente y maximizar el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o 5 sustancialmente todas las regiones FR son de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana. Si se desean más detalles, véanse Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329 [1988]; y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).
El anticuerpo humanizado incluye el anticuerpo PRIMATIZED.TM en el que la región de unión a antígeno del
10 anticuerpo procede de un anticuerpo producido por inmunización de monos macacos con el antígeno de interés.

[0068] Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura 15 deseada para la unión al antígeno. Como revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

[0069] El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de 20 cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Al usar un enlazador demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejar con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen con más detalle, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

[0070] Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente 25 de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95% en peso de anticuerpo 30 como se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria o (3) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del medio natural del anticuerpo 35 no estará presente. Sin embargo, normalmente, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación

Descripción detallada de la invención

[0071] La nomenclatura usada más adelante en el presente documento y los procedimientos de laboratorio de cultivo celular, genética molecular y química e hibridación de ácidos nucleicos descritos más adelante pueden implicar procedimientos bien conocidos y empleados comúnmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para métodos de ácidos nucleicos recombinantes, síntesis de polinucleótidos y cultivo y transformación microbiana (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las técnicas y procedimientos generalmente se realizan de acuerdo con 45 métodos convencionales en la técnica y diversas referencias generales (véase, en general, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.,) que se proporcionan a lo largo de este documento.

[0072] Los oligonucleótidos pueden sintetizarse en un sintetizador de oligonucleótidos Applied Bio Systems de 50 acuerdo con las especificaciones proporcionadas por el fabricante.

[0073] En la técnica se describen métodos para la amplificación por PCR (PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification ed. HA Erlich, Freeman Press, New York (1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, Gelfland, Sninsky, y White, Academic Press, San Diego, CA (1990); Mattila et 55 al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 4967; Eckert, KA y Kunkel, T.A. (1991) *PCR Methods and Applications* 1: 17; PCR, eds. McPherson, Quirk, y Taylor, IRL Press, Oxford; y Patente de Estados Unidos Nº 4.683.202).

[0074] Puede usarse la producción y aplicaciones de anticuerpos α -PECAM, proteínas PECAM-1 humanas nativas, fragmentos de las mismas, o análogos de las mismas para inmunizar a un animal para la producción de 60 anticuerpos específicos. Estos anticuerpos pueden comprender un antisero políclonal o pueden comprender un anticuerpo monoclonal producido por células de hibridoma. Como métodos generales para preparar anticuerpos, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, (1988) E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

[0075] Por ejemplo, pero sin limitación, un fragmento producido de forma recombinante de PECAM-1 puede inyectarse en un ratón junto con un adyuvante siguiendo protocolos de inmunización conocidos para los expertos en la materia para generar una respuesta inmune. Típicamente, se usan aproximadamente al menos 1-50 µg de un fragmento de PECAM-1 o análogo para la inmunización inicial, dependiendo de la longitud del polipéptido. Como alternativa o en combinación con un polipéptido *PECAM-1* producido de forma recombinante, puede usarse un péptido sintetizado químicamente que tenga una secuencia de *PECAM-1* como inmunógeno para inducir anticuerpos que se unen a una proteína *PECAM-1*, tal como el polipéptido *PECAM-1* nativo que tiene la secuencia mostrada esencialmente en la Fig. 1(a), un polipéptido *PECAM-1* humano nativo, un polipéptido que comprende un epítopo de *PECAM-1*, o una proteína de fusión de *PECAM-1*. Pueden recogerse inmunoglobulinas que se unen al fragmento recombinante con una afinidad de unión de al menos $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ a partir del animal inmunizado como un antisuero, y pueden purificarse adicionalmente por cromatografía de inmunoafluencia u otros medios. Además, se recogen células de bazo a partir del animal inmunizado (típicamente rata o ratón) y se fusionan a células de mieloma para producir un banco de células de hibridoma de secreción de anticuerpos. En el banco de hibridomas pueden seleccionarse clones que secretan inmunoglobulinas que se unen al polipéptido *PECAM-1* producido de forma recombinante (o polipéptido *PECAM-1* sintetizado químicamente) con una afinidad de al menos $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Pueden usarse animales distintos de ratones y ratas para inducir anticuerpos; por ejemplo, también pueden emplearse cabras, conejos, ovejas y pollos para inducir anticuerpos reactivos con una proteína *PECAM-1*. También pueden inmunizarse ratones transgénicos que tienen la capacidad de producir anticuerpos sustancialmente humanos y usarse como fuente de antisuero α -*PECAM-1* y/o para obtener hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales.

20

[0076] También pueden explorarse bibliotecas de presentación de anticuerpos en bacteriófagos con respecto a la unión a un polipéptido *PECAM-1*, tal como una proteína *PECAM-1* de longitud completa, un fragmento de *PECAM-1* o una proteína de fusión que comprende una secuencia polipeptídica de *PECAM-1* que comprende un epítopo de *PECAM-1* (generalmente al menos 3-5 aminoácidos contiguos). En general, dichos péptidos *PECAM-1* y las partes de las proteínas de fusión que consisten en secuencias de *PECAM-1* para explorar bibliotecas de anticuerpos comprenden aproximadamente de al menos 3 a 5 aminoácidos contiguos de *PECAM-1*, frecuentemente al menos 7 aminoácidos contiguos de *PECAM-1*, normalmente comprenden al menos 10 aminoácidos contiguos de *PECAM-1* y más normalmente comprenden una secuencia de *PECAM-1* de al menos 14 aminoácidos contiguos.

30

[0077] Se han generado bibliotecas combinatorias de anticuerpos en sistemas de expresión del bacteriófago lambda que pueden explorarse como placas de bacteriófagos o como colonias de lisógenos (Huse et al. (1989) Science 246: 1275; Caton y Koprowski (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 87: 6450; Mullinax et al (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 87: 8095; Persson et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 2432). Se han descrito diversas realizaciones de bibliotecas de presentación de anticuerpos en bacteriófagos y bibliotecas de expresión en fago lambda (Kang et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 4363; (U.S.A) 88: 4363; Clackson et al. (1991) Nature 352: 624; McCafferty et al. (1990) Nature 348: 552; Burton et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 10134; Hoogenboom et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4133; Chang et al. (1991) J. Immunol. 147: 3610; Breitling et al. (1991) Gene 104: 147; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581; Barbas et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89: 4457; Hawkins y Winter (1992) J. Immunol. 22: 867; Marks et al. (1992) Biotechnology 10: 779; Marks et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 16007; Lowman et al (1991) Biochemistry 30: 10832; Lerner et al. (1992) Science 258: 1313. Típicamente, una biblioteca de presentación de anticuerpos en bacteriófagos se explora con un polipéptido *PECAM-1* que está inmovilizado (por ejemplo, por unión covalente a una resina de cromatografía para enriquecer con respecto al fago reactivo por cromatografía de afinidad) y/o marcado (por ejemplo, para explorar levantamientos de placas o de colonias).

45

[0078] Los polipéptidos *PECAM-1* que son útiles como inmunógenos, para la detección de diagnóstico de anticuerpos α -*PECAM-1* en una muestra, para la detección de diagnóstico y cuantificación de proteína *PECAM-1* en una muestra (por ejemplo, por ELISA competitivo estandarizado), o para la exploración de una biblioteca de presentación de anticuerpos en bacteriófagos, se obtienen convenientemente en una forma sustancialmente pura, es decir, típicamente en una pureza de aproximadamente un 50 por ciento (p/p) o mayor, sustancialmente sin proteínas y contaminantes de interferencia. Preferiblemente, estos polipéptidos se aislan o sintetizan con una pureza de al menos un 80 por ciento (p/p) y, más preferiblemente, con una pureza de al menos aproximadamente un 95 por ciento (p/p), careciendo sustancialmente de otras proteínas de humanos, ratones u otros contaminantes.

55

[0079] Para algunas aplicaciones de estos anticuerpos, tales como la identificación de proteínas que presentan reacción inmunológica cruzada, el o los anticuerpos monoclonales o el antisuero deseados no son monoespecíficos. En estos casos, puede ser preferible usar un fragmento sintético o recombinante de *PECAM-1* como antígeno en lugar de usar la proteína nativa entera. La producción de fragmentos recombinantes o sintéticos que tienen dichos extremos amino y carboxi definidos se proporciona por *PECAM-1*.

60

[0080] Si se induce un antisuero contra un polipéptido de fusión *PECAM-1*, tal como una proteína de fusión que comprende un epítopo inmunogénico de *PECAM-1* fusionado a β -galactosidasa o glutatión S-transferasa, el antisuero preferiblemente se preadsorbe con el compañero de fusión que no es *PECAM-1* (por ejemplo, β -galactosidasa o glutatión S-transferasa) para retirar del antisuero anticuerpos que reaccionan con (es decir, se unen

- específicamente a) la parte no *PECAM-1* de la proteína de fusión que sirve como inmunógeno. Pueden usarse anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen a la proteína *PECAM-1* humana y/o murina para detectar la presencia de polipéptidos *PECAM-1* humanos o murinos en una muestra, tal como una transferencia de Western de proteína desnaturalizada (por ejemplo, una mancha de transferencia de nitrocelulosa de una SDS-PAGE) obtenida a 5 partir de una muestra de linfocitos de un paciente. Preferiblemente, se realiza una detección cuantitativa, tal como por exploración densitométrica e integración de señales de una transferencia de Western. Los anticuerpos monoclonales o policlonales se unirán a los epítopes de *PECAM-1* desnaturalizados y pueden identificarse visualmente o por otros medios ópticos con un segundo anticuerpo marcado o proteína A marcada de *Staphylococcus aureus* por métodos conocidos en la técnica.
- 10 [0081] Un uso de dichos anticuerpos es explorar bibliotecas de expresión de ADNc, preferiblemente que contienen ADNc derivado de ARNm humano o murino de diversos tejidos, para identificar clones que contienen insertos de ADNc que codifican proteínas que presentan reacciones inmunológicas cruzadas relacionadas estructuralmente, que son nuevos factores de unión a *PECAM-1* candidatos o proteínas relacionadas con *PECAM-1*. Dicha exploración de 15 bibliotecas de expresión de ADNc es bien conocida en la técnica y se describe adicionalmente en Young et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 1194-1198 (1983)) así como otras fuentes publicadas. Otro uso de dichos anticuerpos es identificar y/o purificar proteínas que presentan reacción inmunológica cruzada que están relacionadas estructural o 20 evolutivamente con la proteína *PECAM-1* nativa o con el fragmento de *PECAM-1* correspondiente (por ejemplo, dominio funcional; dominio de unión a la proteína de interacción con *PECAM-1*) usados para generar el anticuerpo.
- 25 Los anticuerpos anti-*PECAM-2* descritos en el presente documento pueden usarse para medir niveles de proteína *PECAM-1* en una célula o población celular, por ejemplo en un explante celular (por ejemplo, muestra de linfocitos) obtenida a partir de un paciente. Los anticuerpos anti-*PECAM-1* pueden usarse para medir los niveles de proteína correspondiente por diversos métodos, incluyendo, pero sin limitación: (1) ELISA estandarizado en extractos celulares, (2) inmunoprecipitación de extractos celulares seguida de electroforesis en gel de poliacrilamida de los 30 productos inmunoprecipitados y detección cuantitativa de la banda o bandas que corresponden a *PECAM-1* y (3) detección *in situ* por tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti-*PECAM-1* y detección con un segundo anticuerpo marcado. La medición de la relación de proteínas *PECAM-1* y proteínas constitutivas de control en una célula o población celular es informativa con respecto al estado invasivo y metastásico de la célula o población celular.
- 35 [0082] Un antisuero que puede utilizarse para este fin puede obtenerse por procedimientos convencionales. Un procedimiento ejemplar implica la inmunización de un mamífero, tal como conejos, que induce la formación de anticuerpos policlonales contra *PECAM-1*. También se están generando anticuerpos monoclonales a partir de hámsteres ya inmunizados. Este anticuerpo puede usarse para detectar la presencia y nivel de la proteína *PECAM-1*.
- [0083] También es posible usar las proteínas para la detección inmunológica de *PECAM-1* y asociaciones de la misma con ensayos convencionales, así como con ensayos que usan marcadores, que son radioinmunoensayos o inmunoensayos enzimáticos.
- 40 [0084] La detección y determinación de *PECAM-1* tienen una importancia de diagnóstico significativa. Por ejemplo, la detección de una disminución de *PECAM-1* que favorece la invasibilidad y metástasis sería ventajosa en terapias para el cáncer y para controlar hipertrofias. La detección o determinación de proteínas que favorecen metástasis e invasión sería beneficiosa para detectar y diagnosticar cáncer, enfermedades neurodegenerativas y muerte celular 45 isquémica. De esta manera, estas proteínas y sus anticuerpos pueden emplearse como un marcador para controlar, comprobar o detectar el transcurso de una enfermedad.
- [0085] Pueden usarse complejos entrecruzados de *PECAM-1* con polipéptidos que interaccionan con *PECAM-1* como inmunógenos, y los antisueros resultantes, ya que el antisuero restante comprende anticuerpos que se unen a 50 epítopes conformacionales presentes en los complejos pero no a los monómeros (por ejemplo, epítopes específicos de complejos). De forma similar, pueden generarse hibridomas específicos de complejos y anticuerpos monoclonales. Dichos anticuerpos pueden usarse como diagnóstico para detectar y cuantificar la presencia de complejos específicos y correlacionar estos datos con enfermedades o tipos celulares o similares.
- 55 [0086] En la técnica se conocen bien métodos para humanizar anticuerpos no humanos. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en su interior a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos con frecuencia se denominan restos "importados", que típicamente se cogen de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 60 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al. Science 239: 1534-1536 (1988)], sustituyendo las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano por CDR o secuencias de CDR de roedor. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos químicos (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567), donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados típicamente son anticuerpos humanos en

los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se han sustituido por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

[0087] También pueden producirse anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en este campo, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991)]. También están disponibles las técnicas de Cole et al., y Boerner et al., para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)]. De forma similar, pueden fabricarse anticuerpos humanos mediante la introducción de loci de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que se han inactivado parcial o completamente los genes de inmunoglobulina endógenos. Después de la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los sentidos, incluyendo transposición de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

[0088] Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo se preparan para el almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^a edición, Osol, A. ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinal; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales TWEEN.TM., PLURONICS.TM. o polietenglicol (PEG).

[0089] El anticuerpo anti-PECAM-1 descrito en el presente documento puede administrarse a un paciente con cáncer junto con otros agentes quimioterapéuticos y sensibilizadores a radioterapia.

[0090] Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención, pero no son limitantes de la misma. Todos los porcentajes proporcionados a lo largo de la memoria descriptiva están basados en peso a menos que se indique otra cosa. Todos los pesos moleculares de proteínas están basados en pesos moleculares medios ponderales a menos que se indique otra cosa.

[0091] La descripción anterior de las realizaciones preferidas de la presente invención se ha presentado con fines ilustrativos y descriptivos. No debe considerarse exhaustivo o limitante de la invención en la forma precisa descrita, y son posibles muchas modificaciones y variaciones a la luz de las enseñanzas anteriores.

45

Ejemplos experimentales

Materiales y Métodos;

50 **[0092]** Para todos los estudios se usaron ratones hembra de 6-8 semanas de edad. Los ratones C57B1/6 y BalbC se adquirieron en Simonson Labs, (Gilroy, CA) y los ratones Nu/Nu se adquirieron en Charles River. Las células tumorales se inocularon por inyección en la vena de la cola. Para los modelos de cáncer de pulmón altamente metastásico (LLC-HM) carcinoma de pulmón de Lewis y tumor melanoma murino B16-F10, cada ratón C57B1/6 recibió 25.000 células tumorales suspendidas en 200 µl de medio de cultivo. Para los modelos de cáncer de mama murino 4T1 y cáncer de colon murino CT26, cada ratón Balb/C recibió 50.000 células tumorales suspendidas en 200 µl de medio de cultivo. Para el modelo de xenoinjerto de melanoma humano de células Lox, los ratones Nu/Nu recibieron un total de 2,5 millones de células Lox en medio de cultivo en dos inyecciones separadas en la vena de la cola. La primera inyección se administró por la mañana y la segunda inyección cuatro horas después. Cada inyección contenía 1,25 millones de células en 300 µl de medio de cultivo.

60

[0093] Para la primera serie de experimentos, grupos de ocho ratones recibieron 25.000 células tumorales B16-F10 por inyección en la vena de cola el día 0, y después recibieron 5 dosis de 200 µg de anti-PECAM-1 de rata anti-ratón (mAb 390) (proporcionado por Dr. H. Delisser, University of Pennsylvania) o anticuerpo de control de isotipo IgG2(a) de rata (Sigma) mediante los siguientes programas. Un grupo de ratones recibió 5 dosis de 200 µg de anti-

PECAM-1 de rata anti-ratón (mAb 390) o anticuerpo de control de isotipo IgG2(a) de rata empezando el día 0 (justo antes de la inyección de las células tumorales), y después los días 1, 3, 6 y 8. Además, un grupo de ratones recibió 5 dosis de 200 µg de anti-PECAM-1 de rata anti-ratón (mAb 390) o anticuerpo de control de isotipo IgG2(a) de rata empezando el día 7 después de la inyección de células tumorales, y después los días 8, 10, 13 y 15. Los ratones 5 portadores de células CT26, 4T1, B16 y Lox se sacrificaron los días 20, 22, 23 y 28 después de la inoculación de células tumorales, respectivamente.

- [0094] En todos los casos, todos los ratones del grupo respectivo se sacrificaron cuando un animal indicador parecía estar gravemente enfermo o muerto, y se documentaron números significativos de tumores pulmonares 10 después del sacrificio y análisis de pulmones diseccionados. Se diseccionaron los pulmones de cada ratón y después se pesaron. Los pulmones después se infundieron por vía intratraqueal con formalina tamponada al 5% en el caso de los ratones portadores de melanoma B16-F10. En todos los demás ratones portadores de tumores (los modelos de tumor 4T1, CT26, LLC-HM y Lox), los pulmones después se infundieron por vía intratraqueal con la solución de fijación que contenía tinta china. Todas las muestras de pulmón después se fijaron en formalina 15 tamponada al 5% (50% de formalina tamponada al 10% (Fisher) y 50% de PBS). Los tumores de pulmón se contaron bajo un microscopio de disección por un observador que desconocía el grupo del que procedían. El significado potencial de las diferencias entre los diversos grupos se evaluó usando un ensayo t de Student bilateral de muestras independientes.
- 20 [0095] Posteriormente, los pulmones se sometieron a los siguientes estudios. Las cifras mitóticas y apoptóticas se contaron en portaobjetos teñidos con hematoxilina y eosina de cuatro micrómetros usando un microscopio óptico convencional. Los recuentos reales de las cifras mitóticas y apoptóticas se realizaron a partir de los diez nódulos más grandes. Se contaron las cifras de cuerpos apoptóticos y mitóticas de acuerdo con los criterios morfológicos descritos previamente (1,2). Las tasas apoptótica y mitótica se calcularon basándose en el grado de celularidad 25 tumoral, y se expresaron como el número de cifras apoptóticas o mitóticas por mil células. Se realizó una detección *in situ* de fragmentos de ADN apoptóticos escindidos (TUNEL) usando el Kit de Detección TdT-FragEL (Oncogene Science) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La frecuencia de células marcadas se calculó contando al menos 1.000 células en áreas con el mayor número de núcleos marcados con TdT. El ensayo de Matrigel y el análisis de cámara Boyden se realizaron como se describe (3). Todos los análisis de apoptosis, mitosis, 30 angiogénesis e histopatología se realizaron por un investigador que desconocía la identidad de las muestras que estaba evaluando. La expresión de PECAM-1 en las diversas líneas de células tumorales evaluadas se realizó por análisis FACS.

Referencias:

- 35 [0096]
1. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972) Br. J. Cancer 26, 239-257.
 2. van Diest, P. J., Brugal, G., & Baak, J. P. (1998) J. Clin. Pathol. 51, 716-724.
 - 40 3. Desprez, P. Y., Lin, C.Q., Thomasset, N., Sympson, C.J., Bissell, M.J., & Campisi, J. (1998) Mol. Cell Biol. 18, 4577-4588.

Resultados de los estudios anti-tumor metastásico:

- 45 [0097] Se ensayó la unión del anticuerpo anti-PECAM-1 a las diversas líneas de células tumorales.
- [0098] Se evaluó la unión del anticuerpo anti-PECAM-1 a células de melanoma B16-F10 murino, células de carcinoma mamario 4T1 murino y células de carcinoma de pulmón de Lewis altamente metastásico (LLC-HM).
- 50 [0099] No se detectó expresión de PECAM-1 (ni unión específica de anticuerpo anti-PECAM-1 a ninguno de estos tipos celulares (datos no mostrados)). El análisis de la expresión de PECAM-1 en células de tumor de colon CT26 murino y células de melanoma LOX humano está pendiente.
- [0100] Efectos de anti-PECAM-1 sobre la progresión metastásica de melanoma B16-F10. En primer lugar, los 55 presentes solicitantes compararon los efectos antitumorales potenciales de cinco dosis intravenosas de 200 µg de anti-PECAM-1 o el anticuerpo de control de isotipo IgG, iniciando el tratamiento el día de la inyección del tumor (día 0) o 7 días después de la inyección de las células tumorales (día 7). La inyección del anticuerpo de control de isotipo IgG, que empezó el día 0 el día 7, así como la inyección del anticuerpo anti-PECAM-1, que empezó el día 0, no tuvieron ningún efecto sobre el peso total del pulmón (un indicador de la carga metastásica total) o el número de 60 tumores de pulmón metastásicos, en comparación con ratones de control no tratados portadores de tumores. La ausencia de eficacia antitumoral producida por la terapia de anticuerpos anti-PECAM iniciada el día 0 contrasta con los resultados de un estudio previo que ensaya esta dosis y programa de anticuerpo anti-PECAM contra tumores de melanoma B16 subcutáneos inoculados localmente. En este estudio previo, cinco dosis intraperitoneales de 200 µg del mismo anticuerpo anti-PECAM-1 iniciadas el mismo día (día 0) que la inoculación 65 subcutánea local de tumores de melanoma B16 produjeron una actividad antitumoral significativa, reduciendo

significativamente el crecimiento tumoral además de reducir significativamente la angiogénesis tumoral (Zhou et al. Angiogenesis 3: 181-188, 1999). Por el contrario, los estudios de los presentes solicitantes demostraron que la inyección de este mismo anticuerpo anti-PECAM-1 empezando el día 0 no mostraba actividad antitumoral contra metástasis pulmonares de melanoma B16. Sin embargo, los presentes solicitantes descubrieron que la inyección 5 intravenosa del anticuerpo anti-PECAM empezando el día 7 después de la inyección de células tumorales era altamente eficaz contra tumores de melanoma B16 metastásicos, reduciendo significativamente tanto los pesos pulmonares totales ($p < 0,005$) como el número total de tumores de pulmón de melanoma B16-F10 metastásicos ($p < 0,0001$) en comparación con ratones de control (Figuras 1A y 1B). De esta manera, los resultados anti-tumorales obtenidos usando anticuerpo anti-PECAM administrado IP contra tumores locales pueden diferir sustancialmente de 10 los obtenidos usando anticuerpo anti-PECAM injectado por vía intravenosa contra tumores metastásicos.

[0101] Despues, los presentes solicitantes intentaron repetir estos resultados en un experimento de seguimiento, comparando de nuevo los efectos del anticuerpo anti-PECAM-1 o el control de isotipo, iniciados 7 días después de la inyección IV de células B16-F10. Descubrieron que el anticuerpo anti-PECAM-1 reducía significativamente tanto los 15 pesos pulmonares totales ($p < 0,05$) como el número total de tumores pulmonares ($p < 0,0001$) en comparación con ratones que portadores de B16-F10 tratados con el mismo programa y dosis de anticuerpo de control de isotipo (Figuras 2A y 2B). (Los presentes solicitantes usaron ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo como controles en todos los experimentos posteriores porque previamente habían demostrado que los pesos pulmonares totales y los números totales de tumores pulmonares no diferían entre los ratones tratados con anticuerpo de control 20 de isotipo y los ratones no tratados (véanse las Figuras 1A y 1B)). La terapia de anticuerpos anti-PECAM iniciada el día 7 después de la inyección de células tumorales de nuevo redujo significativamente la carga tumoral total y el número total de tumores metastásicos de pulmón, como se había observado previamente en el experimento 1 anterior. La administración intraperitoneal de este mismo anticuerpo anti-PECAM, según se ha notificado previamente, reduce significativamente la angiogénesis tumoral en tumores de melanoma B16 inoculados por vía 25 subcutánea. Los presentes solicitantes evaluaron la angiogénesis tumoral, así como las tasas apoptótica y mitótica tumorales en tumores de pulmón B16-F10 de los grupos inyectados con anticuerpo de control de isotipo y anti-PECAM. Sorprendentemente, el número de vasos sanguíneos en los tumores de pulmón parecía mayor en el grupo tratado con el anticuerpo anti-PECAM ($17,9 + 4,5$ vasos sanguíneos de tumor/HPF (media + S.E.)) que en el grupo tratado con control de isotipo ($8,79 + 2,9$), aunque esta diferencia no alcanza el significado estadístico ($p = 0,12$). El 30 nivel de apoptosis tumoral ($9,9 + 1,1$) en los ratones tratados con anti-PECAM frente a los ratones tratados con control de isotipo ($9,7 + 0,8$) también fue comparable. Sin embargo, la tasa de mitosis en las células tumorales fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los ratones tratados con control de isotipo ($4,7 + 0,5$) frente a los ratones tratados con anti-PECAM ($2,9 + 0,7$). Histopatológicamente, se detectaron necrosis tumoral, hemorragia, congestión pulmonar y/o embolia intravascular en 7 de 9 ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo, mientras que no 35 se detectó ninguno de estos hallazgos en los ratones tratados con anticuerpo anti-PECAM-1 (datos no mostrados). En general, la terapia con anticuerpos anti-PECAM reducía significativamente el número total de tumores B16-F10 metastásicos y la carga tumoral total, además de reducir significativamente las tasas mitóticas de células tumorales y los cambios histopatológicos de pulmón. La terapia con anticuerpos anti-PECAM-1 no reducía la angiogénesis tumoral o la apoptosis tumoral.

40 **[0102]** Para demostrar que la actividad anti-metastásica del anticuerpo anti-PECAM-1 era específica para un amplio espectro de tumores sólidos, además de los tumores de melanoma B16-F10, los presentes solicitantes ensayaron su actividad anti-metastásica potencial contra una diversidad de líneas celulares tumorales distintas inyectadas en ratones. Estas líneas incluían células de carcinoma mamario 4T1 murino, células de tumor de colon 45 CT26 murino, células de carcinoma de pulmón de Lewis altamente metastásico (LLC-HM) murino y células de melanoma LOX humano. Usaron protocolos establecidos para generar la extensión metastásica de cada una de estas líneas, como se describe en la sección de materiales y métodos anterior. Se descubrió que cinco dosis de 200 µg de terapia con anticuerpo anti-PECAM IV iniciada el día 7 producía una actividad anti-metastásica significativa contra cada una de estas líneas tumorales en los ratones portadores de tumores.

50 **[0103]** Específicamente, el anticuerpo anti-PECAM era muy eficaz contra la extensión metastásica de tumores de carcinoma mamario 4T1, produciendo reducciones significativas de la carga tumoral total ($p < 0,005$) y tumores pulmonares metastásicos totales ($p < 0,0001$), en comparación con ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo (véanse las figuras 3A y 3B). De nuevo, a diferencia de los informes previos por otros investigadores, aunque 55 la terapia de anticuerpos anti-PECAM era muy eficaz contra la extensión metastásica de tumores 4T1, no tenía ningún efecto sobre la vascularidad del tumor, ya que los ratones tratados con anti-PECAM mostraron $27,8 + 2,5$ vasos sanguíneos tumorales/HPF, mientras que los ratones tratados con control de isotipo mostraron $26,5 + 2,1$ vasos sanguíneos tumorales/HPF (datos no mostrados). De esta manera, a diferencia de los efectos antitumorales de este mismo anticuerpo anti-PECAM contra tumores subcutáneos (Zhou et al. Angiogenesis 3: 181-188, 1999), los 60 efectos del anticuerpo anti-PECAM contra los tumores metastásicos no parecen estar mediados por efectos sobre la angiogénesis tumoral. (El análisis de los efectos del anticuerpo anti-PECAM sobre las tasas mitótica y apoptótica de los tumores para los tumores 4T1 está en curso).

[0104] El anticuerpo anti-PECAM era menos activo contra la extensión metastásica de tumores de colon CT26, pero aún reducía significativamente el número total de tumores pulmonares metastásicos ($p < 0,05$), en comparación con ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo (véanse las figuras 4A y 4B).

- 5 **[0105]** La terapia de anticuerpos anti-PECAM no reducía significativamente ($p = 0,74$) los pesos pulmonares en ratones portadores de tumores LLC-HM ($0,85 \pm 0,2$ g) en comparación con los ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo ($0,94 \pm 0,1$ g). Como las metástasis pulmonares crecían en gran medida como masas confluentes en lugar de tumores discretos en este experimento, no fue posible contar de forma precisa el número de tumores pulmonares individuales en los ratones. Sin embargo, el número de metástasis de pulmón extrapulmonares parecía 10 reducirse significativamente en los ratones tratados con el anticuerpo anti-PECAM. Específicamente, los ocho ratones tratados con control de isotipo mostraron tumores extrapulmonares voluminosos discretos en la cavidad torácica, mientras que sólo 3 de 9 ratones tratados con anticuerpo anti-PECAM mostraron tumores extrapulmonares. (Debe indicarse que uno de los nueve ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo murió con una carga 15 tumoral extensiva 4 días antes de sacrificar los demás ratones). Este ratón no se incluyó en el análisis final de tumores LLC-HM metastásicos. Además, 3 de 8 ratones tratados con control de isotipo mostraron metástasis hepáticas, mientras que sólo 1 de 9 ratones tratados con anticuerpo anti-PECAM mostró tumores hepáticos. De esta manera, aunque no se reduce claramente el número de tumores LLC-HM metastásicos de pulmón, la terapia con anticuerpos anti-PECAM parecía reducir significativamente la extensión extrapulmonar de tumores LLC-HM.
- 20 **[0106]** Por último, como la terapia de anticuerpos anti-PECAM reducía la extensión metastásica de cuatro tumores sólidos murinos diferentes en cepas de ratones singénicos inmunocompetentes, se evaluó si la terapia con anticuerpo anti-PECAM alteraba la extensión metastásica de tumores de xenoinjerto LOX humano en ratones desnudos. Como ocurría en los modelos tumorales murinos, la terapia de anticuerpo anti-PECAM reducía 25 significativamente la extensión metastásica de células LOX en ratones desnudos, como se mide tanto por los pesos pulmonares ($p < 0,05$) como por el número total de tumores de pulmón ($p < 0,005$) en comparación con los ratones portadores de LOX tratados con anticuerpo de control de isotipo (véanse las figuras 5A y 5B).

- [0107]** Considerados en conjunto, estos datos muestran que la terapia sistémica con anticuerpo anti-PECAM puede reducir significativamente la extensión metastásica de una amplia diversidad de tumores sólidos fatales 30 comunes (melanoma, mama, colon y cáncer de pulmón) en modelos de metástasis de ratón. Es importante destacar que ninguna de las células tumorales ensayadas expresa PECAM-1 detectable, lo que indica que el anticuerpo anti-PECAM no produce sus efectos anti-tumor metastásico mediante la unión directa a las propias células tumorales. En su lugar, el anticuerpo anti-PECAM parece funcionar como un agente antitumoral mediante la unión a PECAM-1 expresada en células del endotelio vascular. Sin embargo, los anticuerpos anti-PECAM no parecen ejercer la 35 actividad anti-metastásica por efectos sobre la formación de vasos sanguíneos en el tumor. De esta manera, a diferencia de los anticuerpos antitumorales usados actualmente para tratar cánceres humanos, el anti-PECAM no es específico del tipo de tumor, ni requiere la expresión de su receptor afín en las células tumorales para producir efectos anti-metastásicos significativos.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un anticuerpo anti-PECAM-1 en la fabricación de un medicamento para administración sistémica destinado a reprimir la metástasis o la invasividad de una célula neoplásica en un mamífero.
5
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula neoplásica es una célula de melanoma, una célula de carcinoma de mama, una célula de carcinoma de colon o una célula de carcinoma de pulmón.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la célula neoplásica es una célula humana.
10
4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo anti-PECAM-1 es un anticuerpo monoclonal.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la célula neoplásica carece de unión a un anticuerpo anti-
15 PECAM-1 y PECAM-1 no es detectable en dicha célula neoplásica.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, en el que el medicamento es un medicamento para inyección intraperitoneal.
- 20 7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la administración es una administración después de que se haya determinado el crecimiento tumoral en dicho mamífero.
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la administración es una administración después de que las células tumorales hayan estado presentes en el sistema circulatorio de dicho mamífero durante al menos 7 días.
25
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el crecimiento tumoral se comprende de al menos una colonia multicelular de células neoplásicas.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que las células neoplásicas son células tumorales humanas.
30
11. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la administración es una administración de una pluralidad de dosis de dicho medicamento, donde dicha pluralidad de dosis comprende al menos cinco dosis, administrándose cada dosis con una diferencia de al menos dos días, en donde cada dosis comprende al menos 200 µg del anticuerpo anti-PECAM-1.
- 35 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho mamífero tiene células neoplásicas en su cuerpo durante al menos siete días antes de la administración de dicho medicamento.

Efecto de tratamiento con anticuerpo

* $p < 0,005$ frente al control no tratado

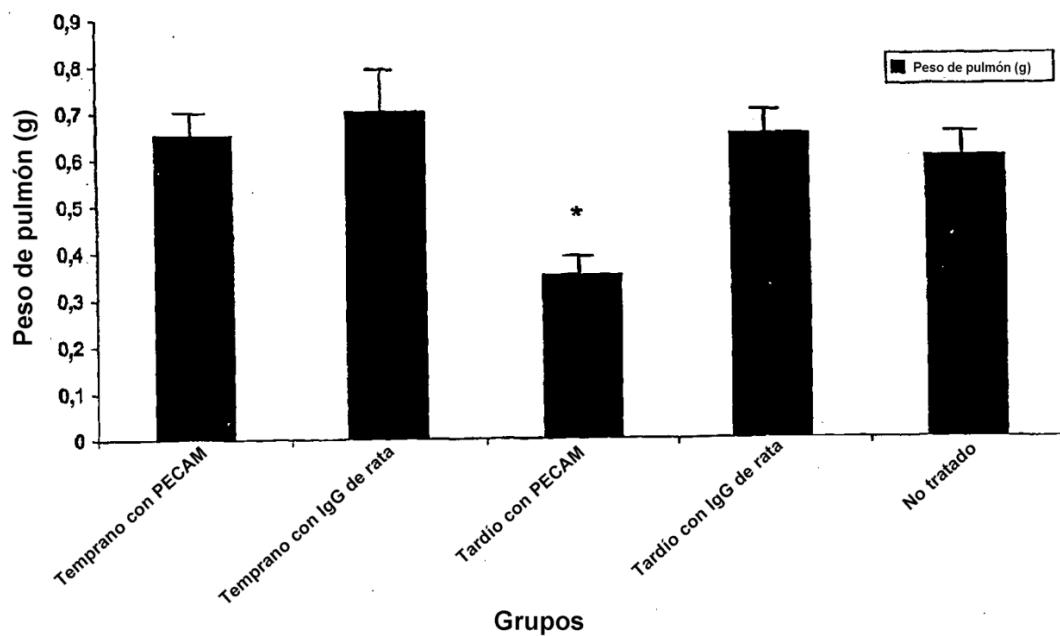


Fig. 1A

* $p > 0,0001$ frente al control

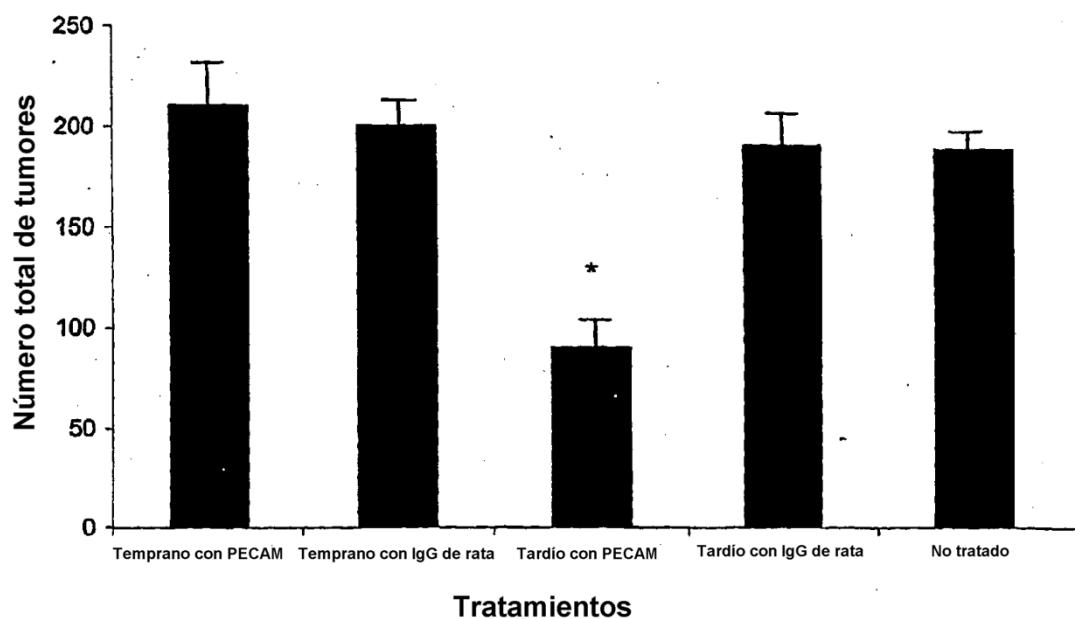
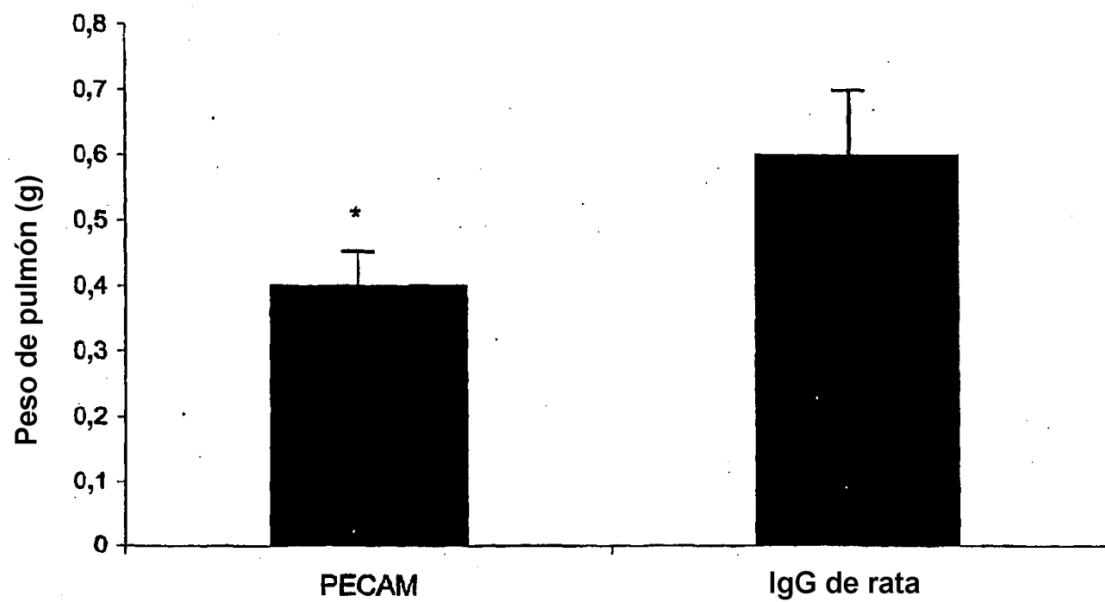


Fig. 1B

* $p < 0,05$ frente a IgG de rata



Anticuerpo inyectado

Fig. 2A

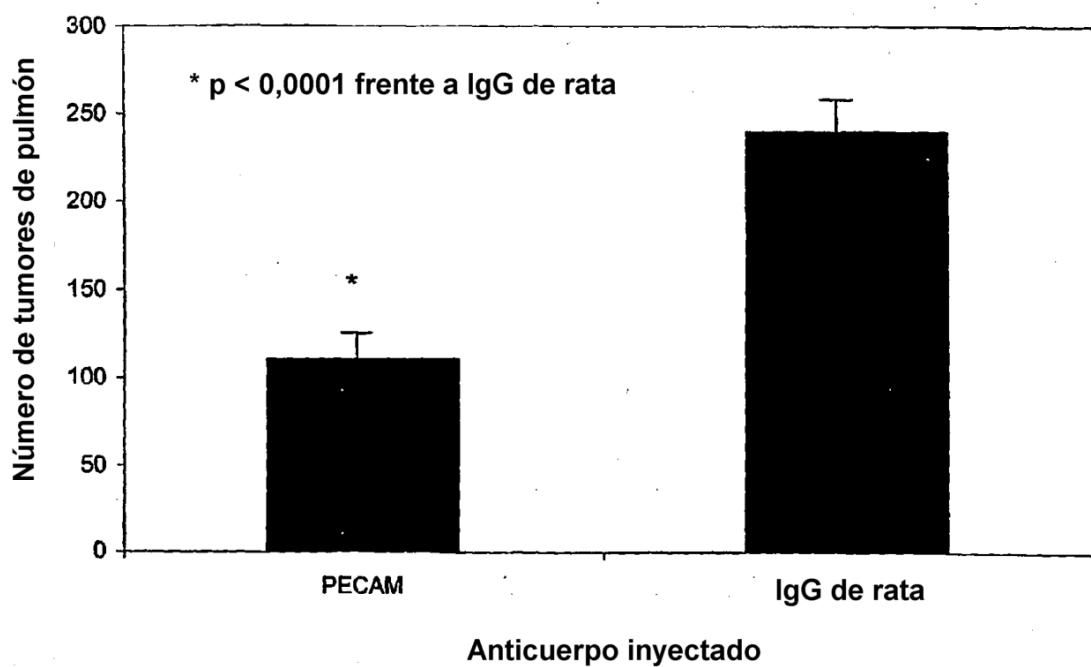


Fig. 2B

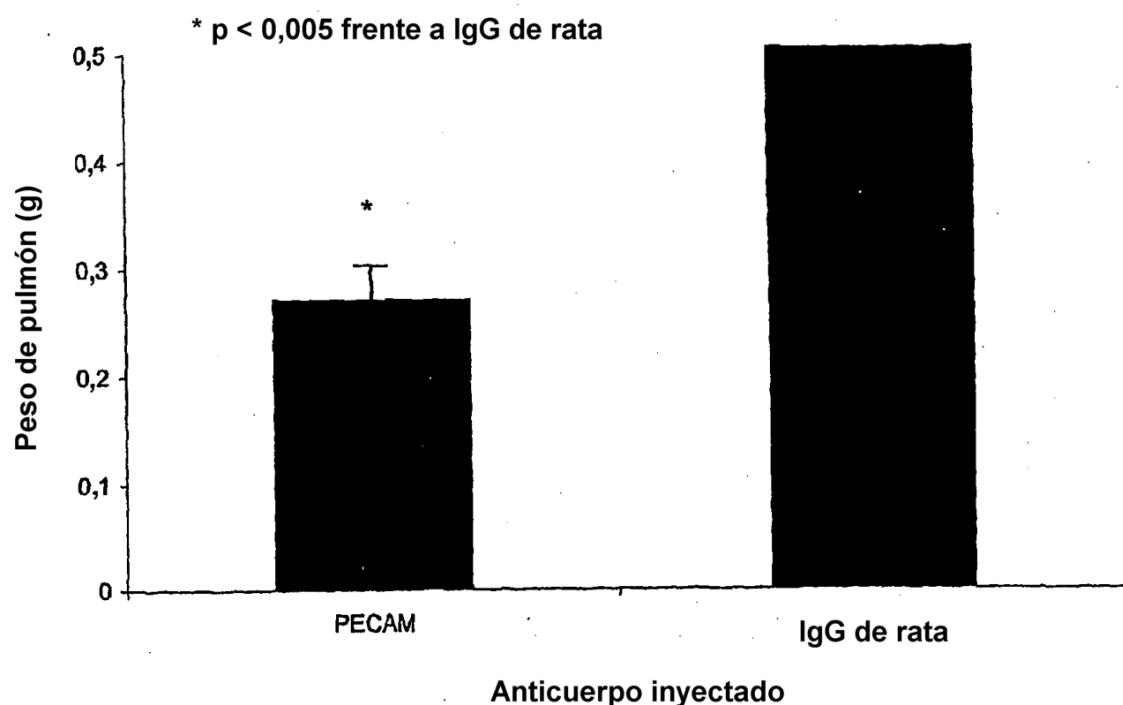


Fig. 3A

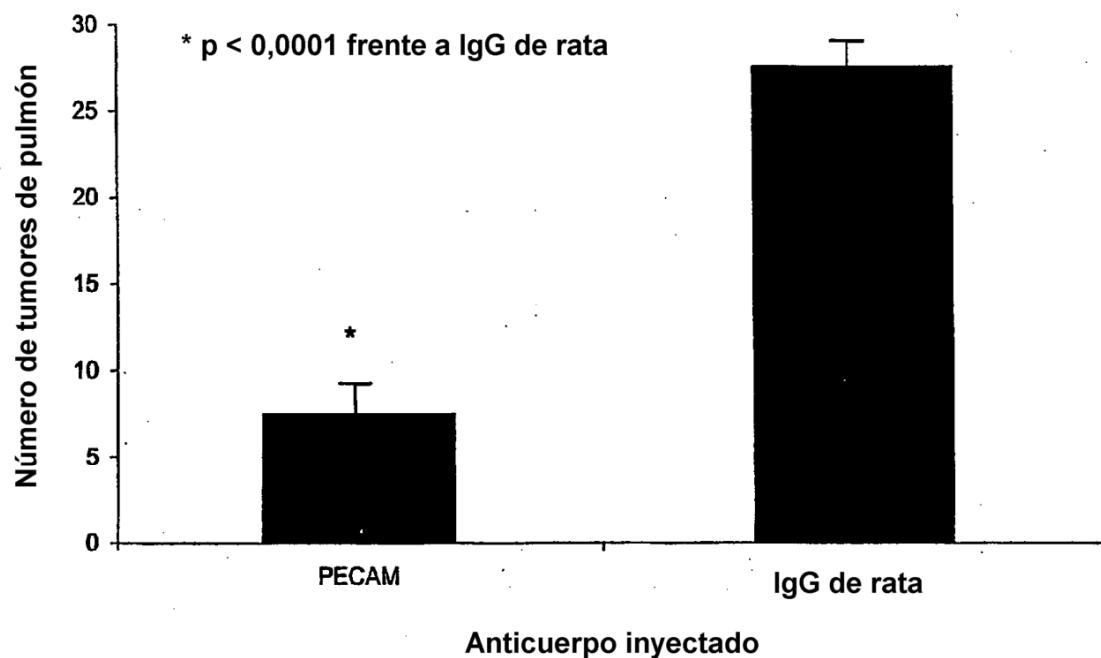


Fig. 3B

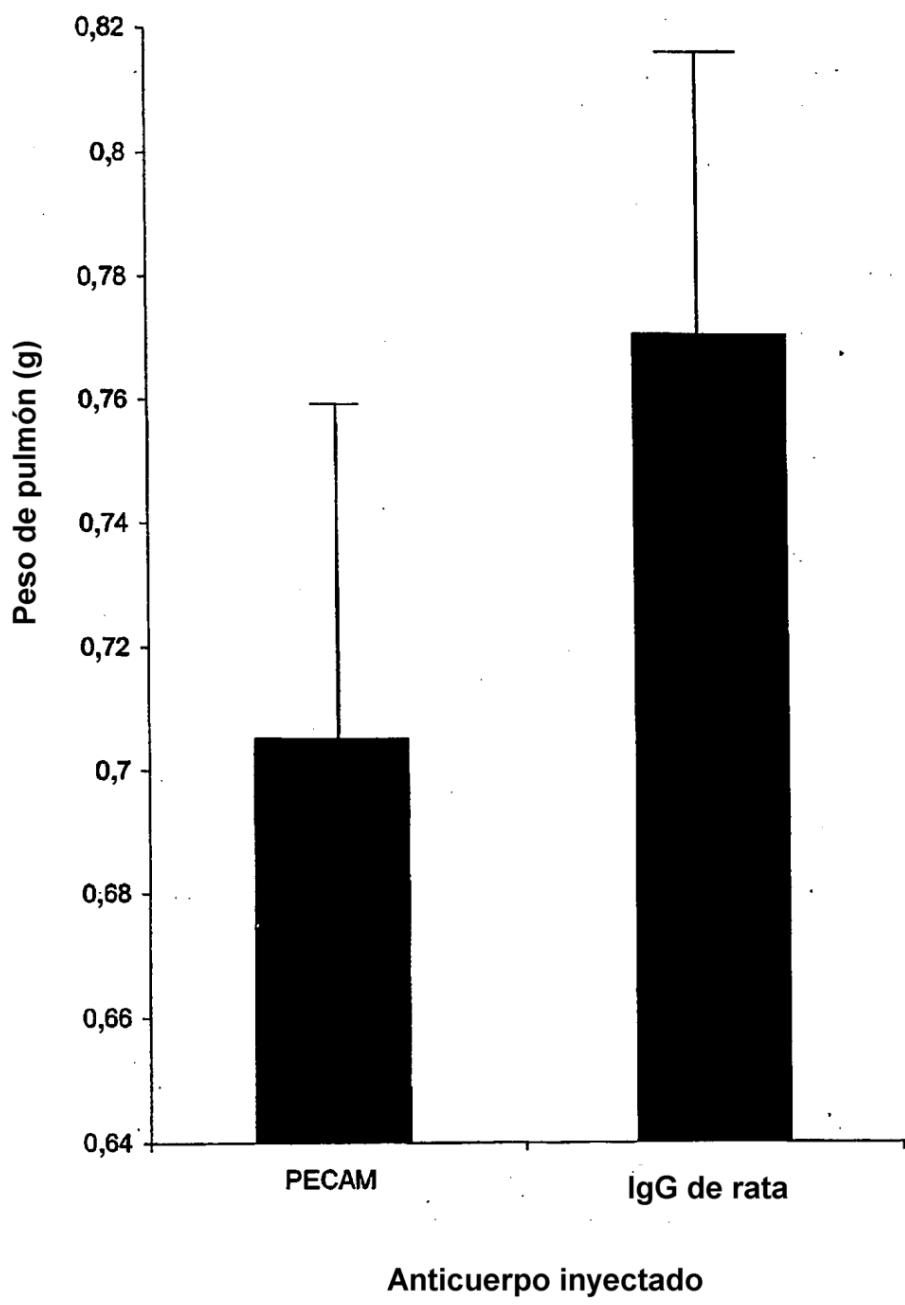


Fig. 4A

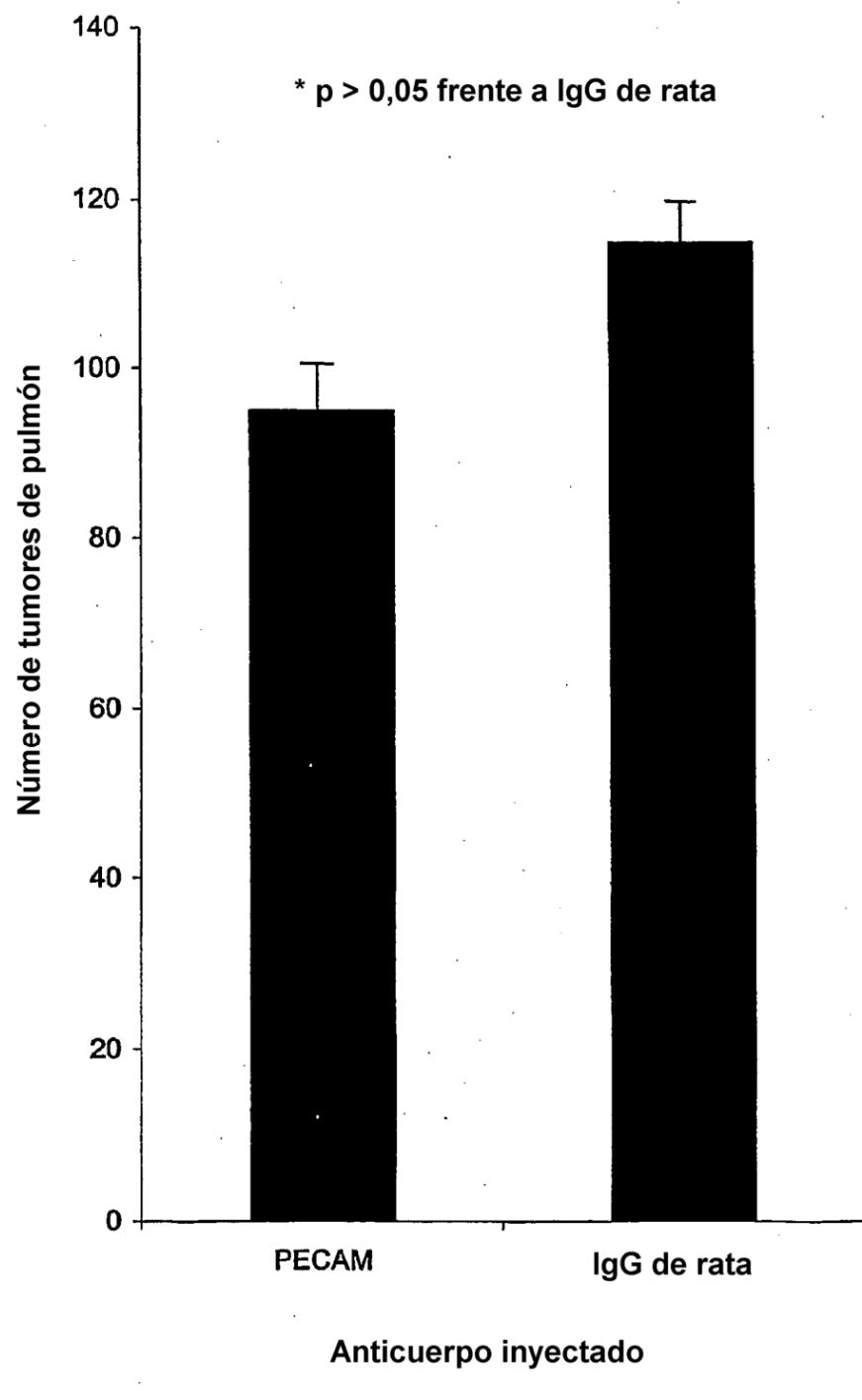


Fig. 4B

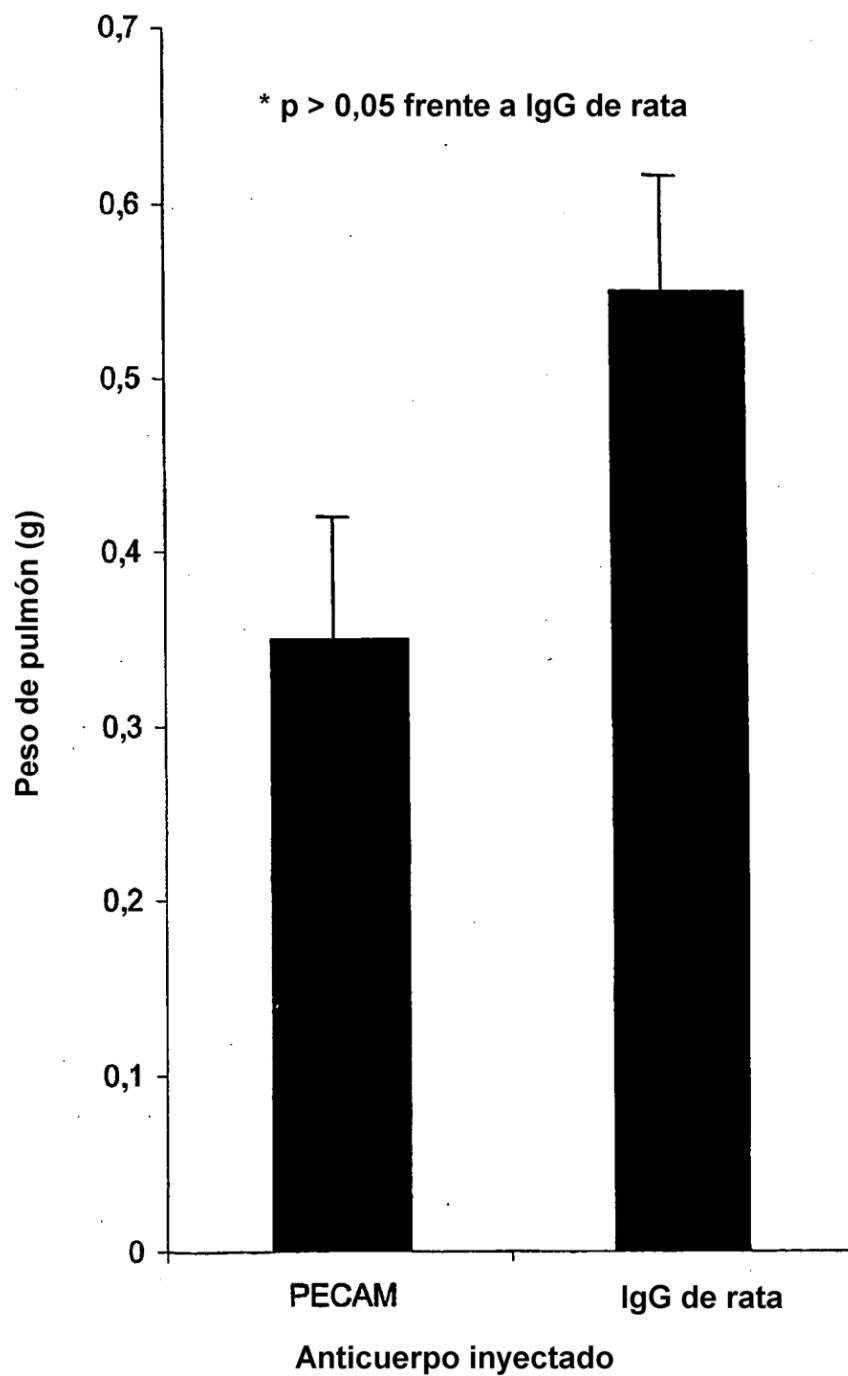


Fig. 5A

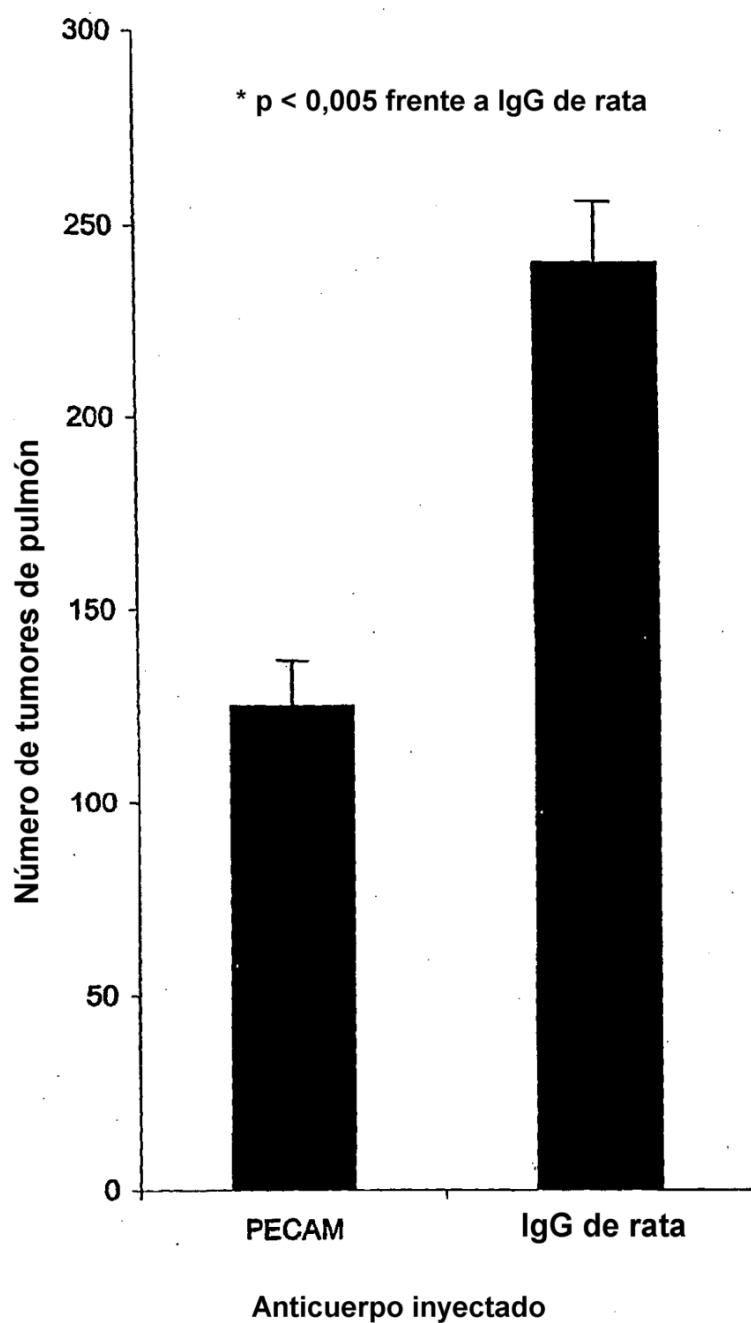


FIG. 5B

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden 5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • WO 03055516 A1 [0005]
- US 5968511 A [0037]
- WO 0155178 A [0037]
- US 6639055 B [0037]
- US 6133426 A [0037]
- 15 • WO 03055516 A [0037]
- WO 02085405 A [0037]
- US 6627196 B [0037]
- US 4816567 A [0065] [0066] [0086]
- 20 • EP 404097 A [0069]
- WO 9311161 A [0069]
- US 4683202 A [0073]
- US 5545807 A [0087]
- US 5545806 A [0087]
- US 5569825 A [0087]
- US 5625126 A [0087]
- US 5633425 A [0087]
- US 5661016 A [0087]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 25 • NAKADA et al. *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, 452-462 [0005]
- DUNCAN et al. *J. Immunol.*, 1999, vol. 162, 3022-3030 [0005]
- ZHOU et al. *Angiogenesis*, 1999, vol. 3, 181-188 [0005] [0100] [0103]
- 30 • CAO et al. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2002, vol. 282, C1181-C1190 [0005]
- ZHOU et al. *Angiogenesis*, 1999, vol. 3 (2), 181-188 [0009]
- 35 • SMITH ; WATERMAN. *Adv. Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 482 [0040]
- NEEDLEMAN ; WUNSCH. *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443 [0040]
- 40 • PEARSON ; LIPPMAN. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 1988, vol. 85, 2444 [0040]
- KABAT et al. *NIH Publ. No. 91-3242*, 1991, vol. I, 647-669 [0057]
- 45 • CLOTHIA ; LESK. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0058]
- ZAPATA et al. *Protein Eng.*, 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0059]
- KOHLER et al. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0065]
- 50 • CLACKSON et al. *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0065]
- MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0065]
- MORRISON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0066]
- 55 • JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0067] [0086]
- REICHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0067]
- 60 • PRESTA. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0067]
- PLUCKTHUN. *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*. Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 269-315 [0068]
- HOLLINGER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0069]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0071]
- PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. Freeman Press, 1992 [0073]
- PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, 1990 [0073]
- MATTILA et al. *Nucleic Acids Res.*, 1991, vol. 19, 4967 [0073]
- ECKERT, K.A. ; KUNKEL, T.A. *PCR Methods and Applications*. IRL Press, 1991, vol. 1, 17 [0073]
- E. HARLOW ; D. LANE. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 [0074]
- HUSE et al. *Science*, 1989, vol. 246, 1275 [0077]
- CATON ; KOPROWSKI. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 1990, vol. 87, 6450 [0077]
- MULLINAX et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 1990, vol. 87, 8095 [0077]
- PERSSON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 1991, vol. 88, 2432 [0077]
- KANG et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 1991, vol. 88, 4363 [0077]
- CLACKSON et al. *Nature*, 1991, vol. 352, 624 [0077]
- MCCAFFERTY et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 552 [0077]
- BURTON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 1991, vol. 88, 10134 [0077]
- HOOGENBOOM et al. *Nucleic Acids Res.*, 1991, vol. 19, 4133 [0077]
- CHANG et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 3610 [0077]

- BREITLING et al. *Gene*, 1991, vol. 104, 147 [0077]
- MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0077] [0087]
- 5 • BARBAS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 1992, vol. 89, 4457 [0077]
- HAWKINS ; WINTER. *J. Immunol.*, 1992, vol. 22, 867 [0077]
- 10 • MARKS et al. *Biotechnology*, 1992, vol. 10, 779 [0077]
- MARKS et al. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 16007 [0077]
- 15 • LOWMAN et al. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 10832 [0077]
- LERNER et al. *Science*, 1992, vol. 258, 1313 [0077]
- YOUNG et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1983, vol. 80, 1194-1198 [0081]
- 20 • RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0086]
- VERHOEYEN et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0086]
- HOOGENBOOM ; WINTER. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0087]
- COLE et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, 1985, 77 [0087]
- BOERNER et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0087]
- MARKS et al. *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0087]
- LONBERG et al. *Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0087]
- MORRISON. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13 [0087]
- FISHWILD et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51 [0087]
- NEUBERGER. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0087]
- LONBERG ; HUSZAR. *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0087]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. 1980 [0088]
- KERR, J. F. ; WYLLIE, A. H. ; CURRIE, A. R. *Br. J. Cancer*, 1972, vol. 26, 239-257 [0096]
- VAN DIEST, P. J. ; BRUGAL, G. ; BAAK, J. P. J. *Clin. Pathol.*, 1998, vol. 51, 716-724 [0096]
- DESPREZ, P. Y. ; LIN, C.Q. ; THOMASSET, N. ; SYMPSON, C.J. ; BISSELL, M.J. ; CAMPISI, J. *Mol. Cell Biol.*, 1998, vol. 18, 4577-4588 [0096]