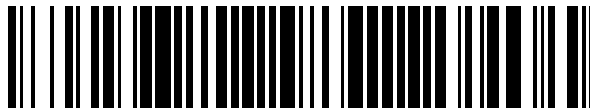


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 037**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/28** (2006.01) **C12N 5/20** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 17/06** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 13/12** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)  
**A61P 1/16** (2006.01)  
**G01N 33/577** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03755325 .2**
- 96 Fecha de presentación: **13.03.2003**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1490110**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2004**

54 Título: **Anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_6$ .**

30 Prioridad:  
**13.03.2002 US 364991 P**  
**13.11.2002 US 426286 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.10.2012**

73 Titular/es:  
**BIAGEN IDEC MA INC.**  
**14 CAMBRIDGE CENTER**  
**CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02142, US y**  
**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF**  
**CALIFORNIA**

72 Inventor/es:  
**VIOLETTE, Shelia, M.;**  
**WEINREB, Paul, H.;**  
**SIMON, Kenneth, J.;**  
**SHEPPARD, Dean y**  
**LEONE, Diane, R.**

74 Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Mireia**

ES 2 389 037 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

Anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_6$ .

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere de manera general al campo de la biología molecular y concretamente a anticuerpos contra las integrinas  $\alpha_v\beta_6$ .

**Antecedentes de la invención**

10 Las integrinas son una superfamilia de receptores de superficie celular que media en la adhesión célula-célula y célula-matriz. Estas proteínas es conocido que proporcionan anclaje, así como señales, para el crecimiento, migración y diferenciación celulares durante el desarrollo y la reparación de tejidos. Las integrinas también se han implicado en la desdiferenciación e invasión celulares, especialmente en el caso de que las células pierdan su forma especializada y se conviertan en células cancerosas metastatizantes.

15 Las integrinas son proteínas heterodiméricas compuestas de dos subunidades unidas no covalentemente:  $\alpha$  y  $\beta$ . La especificidad de unión de las integrinas está dictada por la combinación de 8 cadenas  $\alpha$  diferentes con 8 cadenas  $\beta$  diferentes. La integrina  $\alpha_v\beta_6$  puede unirse a varios ligandos, entre ellos la fibronectina, la tenascina, la vitronectina y el recientemente identificado péptido asociado a latencia, "LAP", un péptido de 278 aminoácidos sintetizado como parte de la proteína precursora TGF- $\beta$  (Munger *et al.*, Cell 96(3):319-328, 1999). El LAP es cortado a partir de la forma madura de la proteína TGF- $\beta$  en forma de péptido N-terminal durante la secreción, pero sigue asociado no covalentemente a TGF- $\beta$  para mantener su estado latente. Este complejo no puede unirse al receptor de TGF- $\beta$  y por lo tanto no es biológicamente activo. La integrina  $\alpha_v\beta_6$  puede unirse directamente a un motivo RGD contenido dentro de LAP, resultando en la liberación del mismo y en la activación de TGF- $\beta$ . Debido a que la unión de  $\alpha_v\beta_6$  a LAP podría resultar importante en la conversión de TGF- $\beta$  a su estado activo, el bloqueo de la unión podría resultar en la inhibición de la activación de TGF- $\beta$  mediada por  $\alpha_v\beta_6$  y en la patología fibrótica asociada.

20 El D1 (Huang *et al.*, patente US nº 2001/0056076A1) da a conocer métodos y composiciones que comprenden antagonistas de  $\alpha_v\beta_6$ . Se dan a conocer para el tratamiento de la fibrosis por lesión aguda pulmonar. Se dan a conocer además métodos de tratamiento de la fibrosis por lesión aguda pulmonar.

25 El D2 (Xue *et al.*, BBRC vol. 288, páginas 610-618, 2001) da a conocer el papel de la integrina  $\alpha_v\beta_6$  en el crecimiento *in vivo* e *in vitro* del carcinoma oral de células escamosas humano. La expresión de  $\alpha_v\beta_6$  se describe en muestras diferentes; su función en la adhesión y en otros fenómenos ha sido descrita y se informa de estudios en ratones.

**Sumario de la invención**

30 La presente invención se basa en el descubrimiento y la caracterización de anticuerpos de alta afinidad contra  $\alpha_v\beta_6$ , incluyendo la identificación y análisis de residuos aminoácidos clave en las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de dichos anticuerpos.

35 La presente invención comprende un anticuerpo monoclonal que: (a) se une específicamente a  $\alpha_v\beta_6$ , (b) inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  a su ligando, tal como LAP, fibronectina, vitronectina y tenascina con un valor de IC50 inferior al de 10D5 (solicitud publicada de patente internacional WO 99/07405), (c) bloquea la activación de TGF- $\beta$ , (d) contiene determinadas secuencias de aminoácidos en las CDR (por ejemplo aquellas mostradas en las figuras 7A y 7B) que proporcionan especificidad de unión a  $\alpha_v\beta_6$ , (e) se une específicamente a la subunidad  $\beta_6$ , y/o (f) reconoce  $\alpha_v\beta_6$  en los procedimientos de inmunotinción, tales como la inmunotinción de tejidos incluidos en parafina.

40 Se ha descubierto que los anticuerpos que se unen a  $\alpha_v\beta_6$  pueden agruparse en clases y subclases biofísicamente diferenciadas. Una clase de anticuerpos muestra la capacidad de bloquear la unión de un ligando (por ejemplo LAP) a  $\alpha_v\beta_6$  (bloqueantes). Esta clase de anticuerpos puede dividirse adicionalmente en subclases de bloqueantes dependientes de cationes y bloqueantes independientes de cationes. Algunos de los bloqueantes dependientes de cationes contienen una secuencia peptídica de arginina-glicina-aspartato (RGD), mientras que los bloqueantes independientes de cationes no contienen una secuencia RGD. Otra clase de anticuerpos muestra la capacidad de unirse a  $\alpha_v\beta_6$  y sin embargo no bloquea la unión de  $\alpha_v\beta_6$  a un ligando (no bloqueantes).

45 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en algunas formas de realización de la presente invención, algunos anticuerpos de la presente invención son dependientes de cationes divalentes para la unión a  $\alpha_v\beta_6$ , mientras que otros son independientes de cationes. Son cationes ejemplares  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ .

La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que:

- 50 (a) se une específicamente a  $\alpha_v\beta_6$  y no a otras integrinas  $\alpha_v$ ,  
 (b) inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  a péptido asociado a latencia (LAP) con un valor de IC50 inferior al del anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  10D5 en un tampón que comprende los cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , y

- (c) compite con el anticuerpo producido por el hibridoma 6.8G6, que presenta el número de acceso de la ATCC PTA-3645 para la unión a  $\alpha_v\beta_6$  biotinilado en un tampón que comprende los cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .

La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha mencionado anteriormente, en el que el anticuerpo comprende:

- 5 a) las mismas secuencias polipeptídicas de cadenas pesada y ligera que un anticuerpo producido por el hibridoma 6.1A8, número de acceso de la ATCC PTA-3647, o
- b) las mismas secuencias polipeptídicas de cadenas pesada y ligera que un anticuerpo producido por el hibridoma 6.3G9, número de acceso de la ATCC PTA-3649, o
- 10 c) las mismas secuencias polipeptídicas de cadenas pesada y ligera que un anticuerpo producido por el hibridoma 6.8G6, número de acceso de la ATCC PTA-3645, o
- d) las mismas secuencias polipeptídicas de cadenas pesada y ligera que un anticuerpo producido por el hibridoma 6.2B1, número de acceso de la ATCC PTA-3646, o
- e) las mismas secuencias polipeptídicas de cadenas pesada y ligera que un anticuerpo producido por el hibridoma 7.1G10, número de acceso de la ATCC PTA-3898, o
- 15 f) las mismas secuencias polipeptídicas de cadenas pesada y ligera que un anticuerpo producido por el hibridoma 7.7G5, número de acceso de la ATCC PTA-3899, o
- g) las mismas secuencias polipeptídicas de cadenas pesada y ligera que un anticuerpo producido por el hibridoma 7.1C5, número de acceso de la ATCC PTA-3900,

Convenientemente, la unión entre el anticuerpo y  $\alpha_v\beta_6$  es independiente de los cationes divalentes.

- 20 La invención se refiere a un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  tal como se ha mencionado anteriormente, comprendiendo dicho anticuerpo una secuencia de dominio variable de cadena pesada de cualquiera de entre SEC ID nº 19 a nº 24, SEC ID nº 34, SEC ID nº 35 o SEC ID nº 36, en la que dicho anticuerpo se une específicamente a  $\alpha_v\beta_6$  y no a otras integrinas  $\alpha_v$  o integrinas no específicas, e inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  al péptido asociado a latencia (LAP) con un valor de IC50 inferior al del anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  10D5.

- 25 La invención se refiere a un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  tal como se ha indicado anteriormente, comprendiendo dicho anticuerpo una secuencia de aminoácidos de cualquiera de entre SEC ID nº 19 a nº 24, nº 34 a nº 38, nº 40, nº 41, nº 43 a nº 45, en la que dicho anticuerpo se une específicamente a  $\alpha_v\beta_6$  y no a otras integrinas  $\alpha_v$  o integrinas no específicas, e inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  al péptido asociado a latencia (LAP) con un valor de IC50 inferior al del anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  10D5.

- 30 La invención se refiere a un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  tal como se ha indicado anteriormente, en el que el anticuerpo comprende las regiones determinantes de complementariedad 1, 2 y 3 de cadena pesada y las regiones determinantes de complementariedad 1, 2 y 3 de cadena ligera, en las que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 de cadena pesada comprenden las secuencias SEC ID nº 3, nº 6 y nº 9, respectivamente, y en las que las CDR de cadena ligera comprenden las SEC ID nº 12, nº 14 y nº 18, respectivamente, en las que dicho anticuerpo se une específicamente a  $\alpha_v\beta_6$  y no a otras integrinas  $\alpha_v$  o integrinas no específicas, e inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  al péptido asociado a latencia (LAP) con un valor de IC50 inferior al del anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  10D5.

La invención se refiere a un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  tal como se ha indicado anteriormente, en el que dicho anticuerpo se une a  $\alpha_v\beta_6$  soluble pero no se une a la subunidad  $\beta_6$ .

- 40 La invención se refiere a un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  tal como se ha indicado anteriormente, en el que dicho anticuerpo impide la activación de TGF- $\beta$ .

- La invención se refiere a un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  tal como se ha indicado anteriormente, en el que el anticuerpo comprende las regiones determinantes de complementariedad 1, 2 y 3 de cadena pesada y las regiones determinantes de complementariedad 1, 2 y 3 de cadena ligera, en el que dicho anticuerpo compite con 6.8G6 número de acceso de la ATCC PTA-3645 para la unión a  $\alpha_v\beta_6$  y contiene un motivo FXY en CDR3 de la cadena pesada, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a  $\alpha_v\beta_6$  y no a otras integrinas  $\alpha_v$  o integrinas no específicas, e inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  al péptido asociado a latencia (LAP) con un valor de IC50 inferior al del anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  10D5.

- 50 La invención se refiere a un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  tal como se ha indicado anteriormente, en el que dicho anticuerpo contiene una mutación en un residuo aminoácido que es un sitio para la glucosilación, de manera que se elimina el sitio de glucosilación.

La invención se refiere a un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  tal como se ha indicado anteriormente producido por un hibridoma

seleccionado de entre el grupo constituido por 6.1A8 número de acceso de la ATCC PTA-3647, 6.3G9 número de acceso de la ATCC PTA-3649, 6.8G6 número de acceso de la ATCC PTA-3645, 6.2B1 número de acceso de la ATCC PTA-3646, 7.1G10 número de acceso de la ATCC PTA-3898, 7.7G5 número de acceso de la ATCC PTA-3899, 7.1C5 número de acceso de la ATCC PTA-3900, o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo producido por dicho hibridoma.

La invención se refiere a un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  tal como se ha indicado anteriormente que se une específicamente a  $\alpha_v\beta_6$  y no a otras integrinas  $\alpha_v$  o integrinas no específicas, e inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  al péptido asociado a latencia (LAP) con un valor de IC50 inferior al del anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  10D5 seleccionado de entre el grupo constituido por un anticuerpo:

- 5 a) cuyas regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 de cadena pesada comprenden las secuencias de SEC ID nº 1, nº 4 y nº 7, respectivamente, y cuyas CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera comprenden las secuencias de SEC ID nº 10, nº 13 y nº 15, respectivamente,
- b) cuyas regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 de cadena pesada comprenden las secuencias de SEC ID nº 3, nº 5 y nº 8, respectivamente, y cuyas CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera comprenden las secuencias de SEC ID nº 11, nº 14 y nº 17, respectivamente,
- 15 c) cuyas regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 de cadena pesada comprenden las secuencias SEC ID nº 3, nº 6 y nº 9, respectivamente, y cuyas CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera comprenden las secuencias SEC ID nº 12, nº 14 y nº 18, respectivamente,
- d) cuyas regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 de cadena pesada comprenden las secuencias de SEC ID nº 2, nº 46 y nº 47, respectivamente, y cuyas CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera comprenden las secuencias de SEC ID nº 48, nº 13 y nº 16, respectivamente.

Convenientemente, dicho anticuerpo contiene una mutación en un residuo aminoácido que es un sitio para la glucosilación, de manera que se elimina el sitio de glucosilación.

La invención se refiere a un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  tal como se ha indicado anteriormente o un fragmento de unión a antígeno del mismo seleccionado de entre el grupo constituido por un anticuerpo que comprende:

- a) una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID nº 19 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 37,
- b) una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID nº 20 o nº 21 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 38,
- 30 c) una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID nº 22 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 43,
- d) una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID nº 23 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 44,
- e) una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID nº 24 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 45,
- 35 f) una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID nº 34 o nº 35 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 40,
- g) una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID nº 36 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 41.

40 Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 que: (a) se une específicamente a  $\alpha_v\beta_6$ , y (b) inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  al péptido asociado a latencia (LAP) con un valor de IC50 inferior al del anticuerpo 10D5, en el que el anticuerpo es producido por el hibridoma 6.3G9, depositado con el número de acceso de la ATCC PTA-3649 o el hibridoma 6.8G6, depositado con el número de acceso de la ATCC PTA 3645. Convenientemente, la unión entre el anticuerpo y  $\alpha_v\beta_6$  es dependiente de los cationes divalentes. Convenientemente, el catión divalente es  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ .

45 Convenientemente, la unión entre el anticuerpo y  $\alpha_v\beta_6$  es independiente de cationes divalentes. La invención se refiere a un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  tal como se ha indicado anteriormente, comprendiendo dicho anticuerpo una secuencia de dominio variable de cadena pesada SEC ID nº 20 o nº 21, y una secuencia de dominio variable de cadena ligera SEC ID nº 38.

La invención se refiere a un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  tal como se ha indicado anteriormente que comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada SEC ID nº 24 y una secuencia de dominio variable de cadena ligera SEC ID nº 45.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición para prevenir o tratar una enfermedad mediada por  $\alpha_v\beta_6$  en un mamífero, en la que la enfermedad es fibrosis, soriasis, esclerosis, cáncer, lesión aguda pulmonar, lesión renal, lesión hepática o síndrome de Alport, que comprende el anticuerpo indicado anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. Convenientemente, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico.

5 Convenientemente, el anticuerpo es dependiente de cationes divalentes.

En otro aspecto, la invención se refiere a la utilización de un anticuerpo tal como se ha indicado anteriormente, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un sujeto que presenta, o que presenta el riesgo de presentar, una enfermedad mediada por  $\alpha_v\beta_6$ , en la que la enfermedad es fibrosis, soriasis, esclerosis, cáncer, lesión aguda pulmonar, lesión renal, lesión hepática o síndrome de Alport. Convenientemente el sujeto es un ser humano.

10 Convenientemente la fibrosis es esclerodermia, cicatrización, fibrosis hepática, fibrosis renal o fibrosis pulmonar. Convenientemente el cáncer es epitelial, oral, de piel, cervical, ovárico, faríngeo, esofágico, de cabeza y cuello, prostático, de colon, pancreático, laríngeo, pulmonar, mamario, renal o colorrectal.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para detectar  $\alpha_v\beta_6$  en una muestra de tejido de un mamífero, que comprende poner en contacto la muestra de tejido con el anticuerpo tal como se ha indicado anteriormente.

15

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula seleccionada de entre el grupo constituido por una célula de hibridoma 6.1A8, número de acceso de la ATCC PTA-3647; una célula de hibridoma 6.3G9, número de acceso de la ATCC PTA-3649; una célula de hibridoma 6.8G6, número de acceso de la ATCC PTA-3645; una célula de hibridoma 6.2B1, número de acceso de la ATCC PTA-3646; una célula de hibridoma 7.1G10, número de acceso de la ATCC PTA-3898; una célula de hibridoma 7.7G5, número de acceso de la ATCC PTA-3899; una célula de hibridoma 7.1C5, número de acceso de la ATCC PTA-3900.

20

En algunas formas de realización, los anticuerpos se unen específicamente a  $\alpha_v\beta_6$  pero no inhiben la unión de  $\alpha_v\beta_6$  al péptido asociado a latencia (LAP). Por lo menos algunos de dichos anticuerpos son capaces de unirse a  $\alpha_v\beta_6$  en secciones de tejido incluidas en parafina y, por lo tanto, pueden utilizarse con fines diagnósticos. Entre los anticuerpos ejemplificativos se incluyen 6.2A1 y 6.2E5.

25

La presente invención también comprende composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas de dichas composiciones, los anticuerpos se encuentran conjugados con un agente citotóxico (es decir, un agente que perjudica la viabilidad y/o las funciones de una célula), tal como una toxina o un radionucleido. Los anticuerpos en dichas composiciones pueden ser anticuerpos dependientes de cationes. Las composiciones pueden administrarse en un sujeto (por ejemplo un mamífero, tal como un ser humano) que presenta, o en riesgo de presentar, una enfermedad mediada por  $\alpha_v\beta_6$ , de manera que se trate (por ejemplo se alivie, se mitigue, se reduzca, se prevenga o se posponga la aparición) una enfermedad. Entre los ejemplos de dichas enfermedades se incluyen, aunque sin limitación, fibrosis (por ejemplo esclerodermia, cicatrización, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar y fibrosis renal), psoriasis, cáncer (por ejemplo

30 cáncer epitelial, oral, de piel, cervical, ovárico, faríngeo, laríngeo, esofágico, pulmonar, mamario, renal o colorrectal), síndrome de Alport, lesiones agudas y crónicas de pulmón, hígado, riñón y otros orgánicos internos, y esclerosis de pulmón, hígado, riñón y otros órganos internos. Pueden resultar riesgos de presentar dichas enfermedades debidos a una predisposición genética, determinados estilos de vida, tales como el tabaquismo y el alcoholismo, la exposición a contaminantes ambientales, tales como el amianto, algunas condiciones fisiológicas tales como la diabetes, la infección por virus de la hepatitis (por ejemplo la infección por virus de la hepatitis C), las enfermedades autoinmunitarias y algunos tratamientos médicos, tales como la terapia de radiación.

35

40

La presente exposición comprende además métodos para detectar  $\alpha_v\beta_6$  en una muestra de tejido de un mamífero (por ejemplo un ser humano), que comprende poner en contacto la muestra de tejido con el anticuerpo de la exposición, tal como 6.2A1 y 6.2E5.

45

La presente exposición comprende además células de los hibridomas 6.1A8, 6.2B10, 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 6.2A1, 6.2E5, 7.1G10, 7.7G5 y 7.1C5; ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia codificante de cualquiera de entre SEC ID n° 19 a n° 45 y n° 61 a n° 64; polipéptidos aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos de cualquiera de entre SEC ID n° 19 a n° 45 y n° 61 a n° 64.

50

Un anticuerpo de la presente invención se refiere a un anticuerpo completo, por ejemplo un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, o a un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo completo, tal como un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')<sub>2</sub> o un fragmento F(v). Un anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo murino o un homólogo del mismo, o un anticuerpo totalmente humano. Un anticuerpo de la presente invención también puede ser un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo de cadena sencilla. Un anticuerpo de la presente invención puede ser cualquier isotipo y subtipo, por ejemplo IgA (por ejemplo IgA1 e IgA2), IgG (por ejemplo IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>), IgE, IgD, IgM, en las que las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas pueden ser de tipo  $\kappa$  o  $\lambda$ .

55

En algunas formas de realización, el anticuerpo de la invención puede comprender una mutación (por ejemplo una delección, una sustitución o una adición) en una o más (por ejemplo 2, 3, 4, 5 o 6) posiciones determinadas en la

- cadena pesada, de manera que la función efectora del anticuerpo (por ejemplo la capacidad del anticuerpo de unirse a un receptor de Fc o un factor del complemento) se altera sin afectar a la capacidad de unión a antígenos del anticuerpo. En otras formas de realización, el anticuerpo de la presente invención puede contener una mutación en un residuo aminoácido que es un sitio para la glucosilación, de manera que se elimina el sitio de glucosilación. Dicho anticuerpo puede presentar funciones efectoras reducidas que resulten clínicamente beneficiosas u otras funciones no deseadas, conservando simultáneamente su afinidad de unión a antígeno. La mutación de un sitio de glucosilación también puede resultar beneficiosa para el desarrollo de procedimientos (por ejemplo de expresión y purificación de proteínas). En todavía otras formas de realización, las cadenas pesadas o ligeras pueden contener mutaciones que incrementen la afinidad o la potencia.
- 5 Algunos de los hibridomas de fusión nº 6 y nº 7 han sido depositados en la American Type Culture Collection ("ATCC", P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA) bajo el Tratado de Budapest. Los clones de hibridoma 6.1A8, 6.2B10, 6.3G9, 6.8G6 y 6.2B1 fueron depositados el 16 de agosto de 2001, y presentan los números de acceso ATCC nº PTA-3647, PTA-3648, PTA-3649, PTA-3645 y PTA-3646, respectivamente. Los clones de hibridoma 6.2A1, 6.2E5, 7.1G10, 7.7G5 y 7.1C5 fueron depositados el 5 de diciembre de 2001 y presentan los números de acceso de la ATCC PTA-3896, PTA-3897, PTA-3898, PTA-3899 y PTA-3900, respectivamente. Ver la Tabla 1 a continuación.
- 10 Los anticuerpos de la invención resultan útiles para tratar cualquier afección o enfermedad clínicamente no deseable (tal como se comenta en la presente memoria) que se encuentre mediada por la unión de  $\alpha_v\beta_6$  a su ligando, tal como LAP y fibronectina. Dichos anticuerpos pueden ser más potentes, por su mayor afinidad o avidéz, y dependencia o independencia de cationes de la unión a ligando, que los anticuerpos de  $\alpha_v\beta_6$  de la técnica anterior.
- 20 Además de las aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos de la invención, especialmente los bloqueantes, la clase no bloqueante de anticuerpo puede utilizarse con fines diagnósticos, tales como los ensayos de captura de antígenos, los ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISA), la inmunohistoquímica y similares.
- Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada, dibujos y reivindicaciones, posteriormente.
- 25 **Breve descripción de los dibujos**
- Las figuras 1A y 1B son gráficos de columnas que muestran los resultados de un ensayo de captura celular que determina la capacidad de diversos anticuerpos monoclonales ("mAb") anti- $\alpha_v\beta_6$  de unirse a células FDC-P1 transfectadas con  $\beta_6$  (control: células no transfectadas).
- 30 La figura 2A es un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de ELISA que determinan la capacidad de diversos anticuerpos monoclonales anti- $\alpha_v\beta_6$  purificados "Fusión nº 6" de unirse a  $\alpha_v\beta_6$  humana recombinante soluble (" $\alpha_v\beta_6$ \_hs"). Dichos anticuerpos se generaron mediante inmunización de ratones  $\beta_6^{-/-}$  con  $\alpha_v\beta_6$  truncada humana soluble. Los números en la leyenda indican los números de los clones. Para los nombres de clon correspondientes, ver la Tabla 2.
- 35 La figura 2B es un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de ELISA que determinan la capacidad de diversos anticuerpos monoclonales "Fusión 7" anti- $\alpha_v\beta_6$  purificados de unirse a  $\alpha_v\beta_6$ \_hs recombinante soluble. Dichos anticuerpos se generaron mediante inmunización de ratones  $\beta_6^{-/-}$  con células NIH 3T3 transfectadas con  $\beta_6$  (Fusión nº 7).
- Las figuras 3A-F son gráficos que muestran la diferente dependencia de cationes de la unión de diversos anticuerpos monoclonales anti- $\alpha_v\beta_6$  a  $\alpha_v\beta_6$ \_hs.
- 40 Las figuras 4A y 4B son gráficos que muestran que los anticuerpos monoclonales Fusión nº 6 y Fusión nº 7, respectivamente, inhiben la unión de biotina- $\alpha_v\beta_6$ \_hs a LAP.
- Las figuras 5A-E son gráficos que muestran que los anticuerpos monoclonales ejemplares de la invención inhiben la unión de las células FDC-P1 transfectadas con  $\beta_6$  a LAP. Las figuras 5A y 5B muestran los resultados de los anticuerpos Fusión nº 6. Las figuras 5C-E muestran los resultados de los anticuerpos Fusión nº 7.
- 45 Las figuras 6A y 6B son gráficos que muestran que los anticuerpos Fusión nº 6 y Fusión nº 7, respectivamente, inhiben la activación mediada por  $\alpha_v\beta_6$  de TGF- $\beta$ , utilizando un ensayo de gen informador PAI-1-luciferasa para realizar un seguimiento de la activación de TGF- $\beta$ .
- 50 La figura 7A ilustra las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de las cadenas pesadas de los anticuerpos monoclonales de  $\alpha_v\beta_6$  6.1A8, 6.8G6 (subclones A y B), 7.7G5, 6.2B1, 6.3G9, 6.2B10 (subclones A y B), 6.2G2, 6.2A1, 6.4B4 (subclones A, B y C), 7.10H2, 7.9H5, 7.4A3 (subclones A y B), 7.1C5 (subclones A y B) y 7.1G10. Los anticuerpos 6.1A8, 6.8G6 y 7.7G5 presentan unión dependiente de cationes a  $\alpha_v\beta_6$ , mientras que los anticuerpos 6.2B1, 6.2A1, 6.3G9, 6.2B10, 6.4B4, 7.1C5 y 7.1G10 son independientes de cationes (ver posteriormente). Los números entre paréntesis indican las posiciones de los residuos aminoácidos. Las CDR se indican en las cajas grandes, mientras que las cajas pequeñas que contienen aminoácidos en fuente cursiva representan los polimorfismos presentes en los diferentes clones de un anticuerpo particular.
- 55

La figura 7B ilustra las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de las cadenas ligeras de los anticuerpos monoclonales de  $\alpha_v\beta_6$  6.1A8, 6.8G6, 6.4B4, 6.2A1, 7.1C5, 7.1G10, 6.2B10, 7.7G5, 6.2B1 y 6.3G9.

5 La figura 8 es un diagrama de dispersión que muestra la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  en secciones de tejido de cáncer mamario humano y de carcinoma escamoso humano. Los tejidos humanos normales sólo muestran niveles negligibles de expresión de  $\alpha_v\beta_6$ .

Las figuras 9A y 9B son gráficos de curvas cuadráticas que ilustran las afinidades de unión en solución de dos anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_6$ , 6.8G6 y 6.3G9, respectivamente, para la  $\alpha_v\beta_6$  soluble.

Las figuras 10A y 10B son gráficos de columnas que demuestran la capacidad de los anticuerpos monoclonales purificados para competir con 6.3G9 biotinilado y 6.8G6 biotinilado, respectivamente, para la unión a  $\alpha_v\beta_6$ .

10 La figura 11 es un gráfico de columnas que muestra el porcentaje de tinción de la actina lisa en riñones de animales sometidos a UUO y tratados con mAb anti- $\alpha_v\beta_6$ .

La figura 12 muestra la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  sobre líneas celulares tumorales mediante análisis de FACS (parte derecha de la figura) y la inhibición de la unión de líneas celulares tumorales al ligando LAP por los mAb 6.3G9 y 6.4B4 (parte izquierda de la figura).

15 La figura 13 es un gráfico de columnas que muestra la inhibición de tres líneas celulares tumorales al ligando LAP por parte de los mAbs anti- $\alpha_v\beta_6$  6.3G9, 6.8G6 y 6.4B4. La unión de mAb se comparó con la unión total sin adición de mAbs de ensayo (TB) y la unión no específica a control de sólo BSA (NSB).

20 Las figuras 14A y 14B son gráficos que muestran los efectos de los mAb anti- $\alpha_v\beta_6$  6.3G9 y 6.4B4, respectivamente, durante un periodo de estudio de 33 días sobre tumores aparecidos a partir de células Detroit 562 implantadas subcutáneamente.

25 Las figuras 15A-C son gráficos que muestran los efectos de mAb anti- $\alpha_v\beta_6$  sobre fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. (A) El tratamiento de anticuerpos con mAb 6.3G9 se inició el día 0 en el tiempo de administración de la bleomicina y se realizó un seguimiento durante un periodo de 30 días, (B) el tratamiento de anticuerpos con mAb 6.3G9 se inició 15 días después del tratamiento de bleomicina y se realizó un seguimiento durante un periodo de 30 días, (C) el tratamiento de anticuerpos con los mAb 6.3G9, 6.8G6 y 6.4B4 se inició 15 días después del tratamiento de bleomicina y se realizó un seguimiento durante un periodo extendido de 60 días. En las dos figuras 15A y 15B, los gráficos de columnas en la parte izquierda representan los  $\mu\text{g}$  de hidroxiprolina/pulmón, mientras que los gráficos de columnas en la parte derecha muestran el porcentaje de incremento de hidroxiprolina respecto a los ratones tratados con solución salina (sin bleomicina). En la figura 15C, el gráfico muestra el contenido de hidroxiprolina por pulmón.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención describe clases y subclases de anticuerpos que son específicos para la integrina  $\alpha_v\beta_6$ . Por lo menos una clase de los anticuerpos (los bloqueantes) es capaz de bloquear la unión de  $\alpha_v\beta_6$  a LAP o de impedir la activación de TGF- $\beta$ .

35 A continuación se describen diversos métodos de preparación de los anticuerpos de la presente invención. También pueden utilizarse los métodos ya conocidos en la técnica pero que no se describen específicamente en la presente memoria. Por ejemplo, también pueden identificarse anticuerpos de la presente invención utilizando bibliotecas de anticuerpos de expresión fágica, tales como los descritos en Smith, Science 228:1315-7, 1985; patentes US nº 5.565.332, nº 5.733.743, nº 6.291.650 y nº 6.303.313. Pueden prepararse anticuerpos adicionales de la presente invención mediante acoplamiento de las cadenas pesadas identificadas en la presente memoria con una cadena ligera no afín, por ejemplo una cadena ligera identificada mediante tecnología de expresión fágica.

#### Anticuerpos de hibridomas no humanos

45 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden generarse mediante tecnología de hibridomas bien conocida. Para ello, se inmunizan animales  $\beta_6^-/-$  (por ejemplo ratones, ratas o conejos) con preparaciones purificadas o crudas de  $\alpha_v\beta_6$ , con células con constructos de ADNc codificantes de  $\alpha_v$ ,  $\beta_6$  o ambos antígenos, con células que expresan constitutivamente  $\alpha_v\beta_6$ , y similares. El antígeno puede administrarse en forma de proteína purificada, proteína expresada sobre células, fragmento de proteína o péptido del mismo, o en forma de ADN desnudo o vectores víricos codificantes de la proteína, fragmento de proteína o péptido. A continuación, los sueros de los animales inmunizados se someten a ensayo para la presencia de anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_6$ . Se aíslan las células B a partir de animales con resultado positivo en los ensayos y se preparan hibridomas con estas células B.

50 Se criban los anticuerpos secretados por los hibridomas para su capacidad de unirse específicamente a  $\alpha_v\beta_6$  (por ejemplo la unión a células transfectadas con  $\beta_6$  y no a células parentales, no transfectadas) y para cualquier otra característica deseable, por ejemplo la presencia de secuencias de consenso de CDR deseadas, la inhibición (o la no inhibición en el caso de los no bloqueantes) de la unión entre LAP y  $\alpha_v\beta_6$  con un valor de IC50 inferior al del

anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  conocido 10D5 o la inhibición de la activación de TGF- $\beta$ .

Las células de hibridoma con resultado positivo en los ensayos de cribado se cultivan en un medio nutritivo bajo condiciones que permitan que las células secreten los anticuerpos monoclonales al medio de cultivo. A continuación, se recoge el sobrenadante de cultivo de hibridoma condicionado y se purifican los anticuerpos contenidos en el sobrenadante. Alternativamente, el anticuerpo deseado puede producirse mediante inyección de las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un animal no inmunizado (por ejemplo un ratón). Las células de hibridoma proliferan en la cavidad peritoneal, secretando el anticuerpo, que se acumula en forma de líquido de ascitis. A continuación, el anticuerpo puede recolectarse extrayendo el líquido de ascitis de la cavidad peritoneal con una jeringa.

- 5
- 10 Los anticuerpos monoclonales también pueden generarse mediante aislamiento de los ADNc codificantes de anticuerpos a partir de los hibridomas deseados, mediante transfección de células huésped de mamífero (por ejemplo células CHO o NS0) con los ADNc, cultivo de las células huésped transfectadas y recuperación del anticuerpo a partir del medio de cultivo.

#### Anticuerpos quiméricos

- 15 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención también pueden generarse mediante manipulación de un anticuerpo de hibridoma afín (por ejemplo murino, de rata o de conejo). Por ejemplo, puede alterarse un anticuerpo afín mediante tecnología de ADN recombinante, de manera que parte o la totalidad de las regiones de bisagra y/o constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras sean sustituidas por los componentes correspondientes de un anticuerpo de otra especie (por ejemplo el ser humano). Generalmente, los dominios variables del anticuerpo manipulado permanecen idénticas, o sustancialmente idénticas, a los dominios variables del anticuerpo afín. Un anticuerpo manipulado de esta manera se denomina anticuerpo quimérico y es menos antigénico que el anticuerpo afín al administrarlo en un individuo de la especie a partir de la que se ha derivado la región bisagra y/o constante (por ejemplo un ser humano). Los métodos de preparación de anticuerpos quiméricos son bien conocidos en la técnica.
- 20
- 25 Los anticuerpos quiméricos comprendidos en la presente invención pueden contener un dominio variable de cadena pesada que presenta una secuencia idéntica (o sustancialmente idéntica) a cualquiera de entre SEC ID nº 19 a nº 36 y/o un dominio variable de cadena ligera que presenta una secuencia idéntica (o sustancialmente idéntica) a cualquiera de entre SEC ID nº 37 a nº 45.

Entre las regiones constantes humanas preferidas se incluyen las derivadas de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>4</sub>.

#### Anticuerpos completamente humanos

- Los anticuerpos monoclonales de la presente invención también incluyen los anticuerpos completamente humanos. Pueden prepararse utilizando esplenocitos humanos expuestos *in vitro*, tal como se describe en Boerner *et al.*, J. Immunol. 147:86-95, 1991, o utilizando bibliotecas de anticuerpos de expresión fágica, tal como se describe en, por ejemplo, la patente US nº 6.300.064.
- 30
- 35 Algunos otros métodos para producir anticuerpos completamente humanos implican la utilización de animales no humanos que presentan sitios de Ig endógenos inactivados y que son transgénicos para genes no reorganizados de cadena pesada y de cadena ligera de anticuerpo humano. Estos animales transgénicos pueden inmunizarse con  $\alpha_v\beta_6$  y a continuación se preparan hibridomas a partir de células B derivadas de ellos. Estos métodos se describen en, por ejemplo, las diversas publicaciones/patentes de GenPharm/Medarex (Palo Alto, CA) referentes a ratones transgénicos que contienen miniloci de Ig humanas (por ejemplo la patente US nº 5.789.650, de Lonberg), las diversas publicaciones/patentes de Abgenix (Fremont, CA) con respecto a XENOMICE (por ejemplo las patentes US nº 6.075.181, nº 6.150.584 y nº 6.162.963, de Kucherlapati; Green *et al.*, Nature Genetics 7:13-21, 1994, y Méndez *et al.*, Nature Genetics 15(2):146-56, 1997) y las diversas publicaciones/patentes de Kirin (Japón) referentes a los ratones "transómicos" (por ejemplo el documento EP 843.961, y Tomizuka *et al.*, Nature Genetics 16:133-1443, 1997).
- 40
- 45

#### Anticuerpos humanizados

- Los anticuerpos monoclonales de la presente invención también incluyen las versiones humanizadas de los anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_6$  afines derivados de otras especies. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo producido mediante tecnología de ADN recombinante, en la que algunos o todos los aminoácidos de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humana que no resultan necesarios para la unión de antígenos (por ejemplo las regiones constantes y las regiones de marco de los dominios variables) se utilizan para sustituir los aminoácidos correspondientes de la cadena ligera o pesada del anticuerpo afín no humano. A título de ejemplo, una versión humanizada de un anticuerpo murino contra un antígeno dado presenta en las dos cadenas pesadas y ligeras (1) regiones constantes de un anticuerpo humano, (2) regiones de marco de los dominios variables de un anticuerpo humano, y (3) algunas CDR del anticuerpo murino. En caso necesario, pueden modificarse uno o más residuos en las regiones de marco humanas por residuos en las posiciones correspondientes en el anticuerpo murino, de manera que se conserve la afinidad de unión del anticuerpo humanizado para el antígeno. Este cambio en
- 50
- 55



ocasiones se denomina "retromutación". Los anticuerpos humanizados generalmente es menos probable que induzcan una respuesta inmunológica en el ser humano en comparación con anticuerpos humanos quiméricos debido a que los primeros contienen considerablemente menos componentes no humanos.

5 Los métodos para preparar anticuerpos humanizados se describen en, por ejemplo, Winter, documento EP 239.400; Jones *et al.*, Nature 321:522-525, 1986; Riechmann *et al.*, Nature 332:323-327, 1988; Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536, 1988; Queen *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:10029, 1989; patente US nº 6.180.370, y Orlandi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833, 1989. Generalmente, el trasplante de las CDR murinas (u otras no humanas) en un anticuerpo humano se lleva a cabo de la manera siguiente. Los ADNc codificantes de dominios variables de cadenas pesada y ligera se aíslan a partir de un hibridoma. Las secuencias de ADN de los dominios variables, incluyendo las CDR, se determinan mediante secuenciación. Los ADN codificantes de las CDR se transfieren a las regiones correspondientes de una secuencia codificante de dominio variable de cadena pesada o ligera de anticuerpo humana mediante mutagénesis dirigida a sitio específico. A continuación, se añaden segmentos génicos de región constante humana de un isotipo deseado (por ejemplo  $\gamma$ l para CH y k para CL). Los genes humanizados de las cadenas pesadas y ligeras se coexpresan en las células huésped de mamífero (por ejemplo las células CHO o NS0) para producir anticuerpo humanizado soluble. Para facilitar la producción a gran escala de los anticuerpos, con frecuencia resulta deseable producir dichos anticuerpos humanizados en biorreactores que contienen las células que expresan los anticuerpos, o producir mamíferos transgénicos (por ejemplo cabras, vacas u ovejas) que expresan el anticuerpo en la leche (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.827.690).

20 En ocasiones, la transferencia directa de las CDR a un marco humano conduce a una pérdida de la afinidad de unión a antígeno del anticuerpo resultante. Lo anterior se debe a que en algunos anticuerpos afines, determinados aminoácidos en las regiones de marco interactúan con las CDR e influyen de esta manera sobre la afinidad global de unión del anticuerpo para el antígeno. En estos casos, resultaría crítico introducir "retromutaciones" (*supra*) en las regiones de marco del anticuerpo aceptor con el fin de conservar la actividad de unión a antígeno del anticuerpo afín.

25 El procedimiento general de producción de retromutaciones es conocido en la técnica. Por ejemplo, Queen *et al.* (*supra*), Co *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869-2873, 1991, y el documento WO 90/07861 (Protein Design Labs Inc.) describen un enfoque que implica dos etapas clave. En primer lugar, se seleccionan las regiones de marco V humanas mediante análisis informático para una homología óptima de las secuencias de la proteína con la región de marco V del anticuerpo murino afín. A continuación, se modela informáticamente la estructura terciaria de la región V murina con el fin de visualizar los residuos aminoácidos de marco que es probable que interactúen con las CDR murinas, y estos residuos aminoácidos murinos seguidamente se superponen sobre el marco humano homólogo.

35 En este enfoque en dos etapas existen varios criterios para diseñar los anticuerpos humanizados. El primer criterio es utilizar a modo de aceptor humano el marco de una inmunoglobulina humana particular que habitualmente es homólogo de la inmunoglobulina del donante no humano, o utilizar un marco de consenso de muchos anticuerpos humanos. El segundo criterio es utilizar el aminoácido donante y no el aceptor en el caso de que el residuo aceptor humano sea poco habitual y el residuo donante sea típico de secuencias humanas en un residuo específico del marco. El tercer criterio es utilizar el residuo aminoácido del marco donante y no del aceptor en posiciones inmediatamente contiguas a las CDR.

40 También puede seguirse un enfoque diferente, tal como el descrito en, por ejemplo, Tempest, Biotechnology 9:266-271, 1991. En este enfoque, los marcos de región V derivados de las cadenas pesadas y ligeras de NEWM y REI, respectivamente, se utilizan para la injertación de las CDR sin la introducción radical de residuos de ratón. Una ventaja de la aplicación de este enfoque es que las estructuras tridimensionales de las regiones variables de NEWM y REI son conocidas a partir de la cristalografía de rayos X y de esta manera pueden modelarse fácilmente las interacciones específicas entre las CDR y los residuos de marco de la región V.

#### Otras fracciones

50 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden comprender además otras fracciones para realizar las funciones deseadas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden incluir una fracción toxina (por ejemplo toxoide tetánico o ricina) o un radionucleido (por ejemplo  $^{111}\text{In}$  o  $^{90}\text{Y}$ ) para eliminar las células que son la diana de los anticuerpos (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.307.026). Los anticuerpos pueden comprender una fracción (por ejemplo biotina, fracciones fluorescentes, fracciones radioactivas, etiqueta histidina u otros péptidos de etiqueta) para el fácil aislamiento o detección. Los anticuerpos también pueden comprender una fracción que pueda prolongar su semivida sérica, por ejemplo una fracción polietilenglicol (PEG).

#### Estados de enfermedad y modelos animales

55 Los anticuerpos de la invención resultan útiles en el tratamiento, incluyendo la prevención, de enfermedades mediadas por  $\alpha_v\beta_6$ . Por ejemplo, dichos anticuerpos pueden utilizarse para tratar las fibrosis (por ejemplo la fibrosis pulmonar, la lesión aguda pulmonar, la fibrosis renal, la fibrosis hepática, el síndrome de Alport y la esclerodermia) mediante el bloqueo de la activación de TGF- $\beta$  o el bloqueo de la unión de  $\alpha_v\beta_6$  a cualesquier otros ligandos, tales

como fibronectina, vitronectina y tenascina. La novedad de este enfoque incluye: (1) bloquea la activación de TGF- $\beta$  y no la unión de TGF- $\beta$  a su receptor, (2) puede inhibir TGF- $\beta$  localmente (es decir, en sitios de regulación positiva de  $\alpha_v\beta_6$ ) y no sistémicamente, y (3) inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  a un ligando. Aparte de las enfermedades o condiciones fibróticas, los anticuerpos de la invención resultan útiles en el tratamiento del cáncer o metástasis cancerosa (incluyendo el crecimiento e invasión tumoral), en particular los cánceres epiteliales. Un subconjunto de los cánceres epiteliales es el carcinoma de células escamosas, por ejemplo los cánceres de cabeza y cuello, oral, mamario, pulmonar, prostático, cervical, faríngeo, de colon, pancreático y ovárico. Los estudios de los presentes inventores utilizando los nuevos anticuerpos monoclonales de  $\alpha_v\beta_6$  demuestran que  $\alpha_v\beta_6$  se expresa a nivel elevado en muchos cánceres epiteliales, especialmente en el margen en crecimiento de los tumores. Los nuevos anticuerpos también pueden utilizarse para cualquier otra enfermedad mediada por  $\alpha_v\beta_6$ , incluyendo la soriasis.

Los tratamientos de la presente invención resultan efectivos tanto en sujetos humanos como animales que presentan dichos estados. Los sujetos animales en los que resulta aplicable la invención se extienden tanto a animales domésticos como al ganado, criados como animales de compañía o con fines comerciales. Son ejemplos los perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos y cabras.

La eficacia de los anticuerpos de la invención puede someterse a ensayo en diversos modelos animales. Entre los modelos de ratón para la fibrosis pulmonar se incluyen la fibrosis pulmonar inducible por bleomicina (Pittet *et al.*, J. Clin. Invest. 107(12):1537-1544, 2001, y Munger *et al.*, *supra*) e inducible por radiación (Franko *et al.*, Rad. Res. 140:347-355, 1994). En los ratones tratados con bleomicina, la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  se incrementa en las células alveolares epiteliales de los pulmones. Sin embargo, los ratones con inactivación de  $\beta_6$  se encuentran protegidos de las lesiones y fibrosis inducidas por la bleomicina.

Entre los modelos de ratón de la fibrosis renal se incluyen los ratones COL4A3 -/- (ver, por ejemplo, Cosgrove *et al.*, Amer. J. Path. 157:1649-1659, 2000), los ratones con lesiones inducidas por adriamicina (Wang *et al.*, Kidney International 58:1797-1804, 2000; Deman *et al.*, Nephrol. Dial. Transplant 16:147-150, 2001), los ratones db/db (Ziyadeh *et al.*, PNAS USA 97:8015-8020, 2000) y los ratones con obstrucción uretral unilateral (Fogo *et al.*, Lab. Investigation 81:189A, 2001, y Fogo *et al.*, Journal of the American Society of Nephrology 12:819A, 2001). En todos estos modelos, los ratones desarrollan lesiones y fibrosis renal que puede progresar hasta la insuficiencia renal.  $\alpha_v\beta_6$  se encuentra regulado positivamente en el revestimiento epitelial de los túbulos ascendentes y descendentes e los riñones de los ratones COL4A3 -/-, en ratones tratados con adriamicina y en ratones sometidos a obstrucción uretral unilateral. Es probable que la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  también se encuentre incrementada en una diversidad de modelos de lesión renal.

Los anticuerpos monoclonales anti- $\alpha_v\beta_6$  también pueden someterse a ensayo para su capacidad de inhibir el crecimiento, progresión y metástasis tumorales en dichos modelos animales como modelos estándares de crecimiento y metástasis tumorales *in vivo*. Ver, por ejemplo, Rockwell *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 49:735, 1972; Guy *et al.*, Mol. Cell Biol. 12:954, 1992; Wyckoff *et al.*, Cancer Res. 60:2504, 2000, y Oft *et al.*, Curr. Biol. 8:1243, 1998. Entre los ligandos de  $\alpha_v\beta_6$  importantes pueden incluirse TGF- $\beta$ , que se encuentra implicado en la metástasis (para una revisión ver Akhurst *et al.*, Trends in Cell Biology 11:S44-S51, 2001), la fibronectina y la vitronectina.

La eficacia de los tratamientos de la presente invención puede medirse utilizando diversas herramientas diagnósticas disponibles, incluyendo el examen físico, los análisis de sangre, las mediciones de proteinuria, los niveles de creatinina y la eliminación de la creatinina, los análisis de función pulmonar, los niveles plasmáticos de nitrógeno de urea en sangre (BUN), la observación y puntuación de cicatrices o lesiones fibróticas, la deposición de matriz extracelular, tal como colágeno, la actina y la fibronectina del músculo liso, las pruebas de la función renal, los ultrasonidos, las imágenes de resonancia magnética (MRI) y los escaneos de TC.

#### Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden uno o más anticuerpos de la presente invención, o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, opcionalmente con cualquier portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador" tal como se utiliza en la presente memoria incluye los adyuvantes y vehículos aceptables conocidos.

Según la presente invención, las composiciones farmacéuticas pueden encontrarse en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse según técnicas conocidas en la técnica utilizando agentes dispersantes, humectantes y de suspensión adecuados.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vías oral, tópica, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intramedular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática o intracraneal, según se desee, o sólo localmente en los sitios de inflamación o de crecimiento tumoral. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden administrarse mediante inhalación, utilizando, por ejemplo, un nebulizador, un inhalador de polvos secos o un inhalador de dosis medidas.

La dosis y tasa de dosis de los anticuerpos de la presente invención efectivas para producir los efectos deseados dependerán de una diversidad de factores, tales como la naturaleza de la enfermedad que debe tratarse, el tamaño

del sujeto, el objetivo del tratamiento, la composición farmacéutica específica que se utiliza y el criterio del médico responsable. Los niveles de dosis de entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día, por ejemplo de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal al día del compuesto ingrediente activo resultan útiles. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se administra en una dosis comprendida entre aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal/día y aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal/día, por ejemplo de entre aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal/día y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día y a intervalos de uno a catorce días. En otra forma de realización, el anticuerpo se administra a una dosis de entre aproximadamente 0,3 y 1 mg/kg de peso corporal al administrarlo por vía intraperitoneal. En todavía otra forma de realización, el anticuerpo se administra a una dosis de entre aproximadamente 5 y 12,5 mg/kg de peso corporal al administrarlo por vía intravenosa. En una forma de realización, una composición de anticuerpo se administra en una forma efectiva para proporcionar un nivel plasmático de anticuerpo de por lo menos 1 mg/ml.

#### Métodos diagnósticos

Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para diagnosticar estados de enfermedad asociadas a niveles alterados de expresión de  $\alpha, \beta_6$ . Puede someterse a ensayo una muestra de tejido de un sujeto, tal como una biopsia de tejido, una muestra de líquido corporal o lavado (por ejemplo de lavado alveolar) en un ensayo de captura de antígenos, ELISA, ensayo de inmunohistoquímica y similar utilizando los anticuerpos. A modo de control se utiliza una muestra de tejido procedente de un individuo normal.

Para la puesta en práctica de la presente invención se utilizan, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, química de proteínas e inmunología, que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia. Dichas técnicas se encuentran descritas en la literatura. Ver, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a edición (Sambrook *et al.*, editores), 1989; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, editor), 1984; patente US nº 4.683.195, de Mullis *et al.*; *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames y S.J. Higgins), 1984; *Transcription and Translation* (B.D. Hames y S.J. Higgins), 1984; *Culture of Animal Cells* (R.I. Freshney, editor), 1987; *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press, 1986; *A Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal), 1984; *Methods in Enzymology*, volúmenes 154 y 155 (Wu *et al.*, editores), Academic Press, New York; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.H. Miller y M.P. Calos, editores), 1987; *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Mayer y Walker, editores), 1987; *Handbook of Experiment Immunology*, volúmenes I a IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, editores), 1986; *Manipulating the Mouse Embryo*, 1986.

A menos que se define de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el significado comúnmente entendido por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Los métodos y materiales ejemplificativos se describen a continuación, aunque también pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los indicados en la presente memoria para la práctica de la presente invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria, incluyendo las definiciones. Los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Durante la presente memoria, el término "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprenden" debe apreciarse que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

#### **Ejemplos**

Los ejemplos siguientes pretenden ilustrar los métodos y materiales de la presente invención.

En los ejemplos siguientes, se generaron los ratones  $\beta_6^{-/-}$  tal como se describe en Huang *et al.*, *J. Cell Biol.* 133:921, 1996. Se obtuvo la LAP humana recombinante de R & D Systems (Minneapolis, MN). El anticuerpo 10D5 se obtuvo de Chemicon (Temecula, CA). El hibridoma L230 se obtuvo de la ATCC y el anticuerpo secretado se purificó a partir del sobrenadante de cultivos saturados, mediante cromatografía de afinidad sobre proteína A inmovilizada. El isotipado de los anticuerpos se llevó a cabo utilizando el kit ISOSTRIP (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. La línea celular SW480 transfectada con  $\beta_6$  se preparó tal como se describe en Weinacker *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:6940-6948, 1994.

#### **Ejemplo 1: generación de líneas celulares transfectadas con $\beta_6$ estables**

Se generaron células NIH 3T3 y FDC-P1 transfectadas con  $\beta_6$  mediante electroporación de las líneas celulares parentales con un constructo de ADN que contenía el ADNc de  $\beta_6$  murino de longitud completa y un marcador seleccionable de neomicina. Se seleccionaron las células establemente transfectadas mediante pase de las células en medio de cultivo que contenía G418 durante 14 días, seguido de la separación de células activadas por fluorescencia (FACS) para aislar las células que expresaban el nivel más alto de  $\beta_6$  en superficie. Las células FDC-P1 transfectadas se cultivaron en DMEM suplementado con L-glutamina 4 mM ajustada para contener 1,5 g/l de bicarbonato sódico, 4,5 g/l de glucosa y piruvato sódico 1,0 mM, FBS al 10%, suplemento de cultivo de IL-3 de ratón al 2,5% y 1,5 mg/ml de G418 activo. Las células NIH 3T3 transfectadas se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina y 1 mg/ml de G418 activo.

**Ejemplo 2: purificación de  $\alpha_v\beta_6$  soluble humano**

La proteína  $\alpha_v\beta_6$  se purificó esencialmente tal como se describe en Weinacker, *supra*. Se cultivó una línea celular CHO que expresaba  $\alpha_v\beta_6$ hs, y el sobrenadante resultante se recogió mediante centrifugación. La integrina se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando anticuerpo anti- $\alpha_v$  L230. Se entrecruzó L230 purificado a seferosa 4B activada con CNBr (Sigma) a razón de 4,8 mg de anticuerpo/ml de resina. Se cargó el sobrenadante de  $\alpha_v\beta_6$  a razón de 0,5 mg de anticuerpo/ml de resina en la columna de afinidad de L230, y la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de cada uno de (1) Tris-Cl 50 mM, pH 7,5, NaCl 1 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, (2) Tris-Cl 50 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, y (3) Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7,0. Se eluyó  $\alpha_v\beta_6$ hs con glicina 100 mM, pH 2,5, en 1:10 de volumen de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M, pH 8,0. La proteína se dializó con varios cambios frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se almacenó a -20°C.

**Ejemplo 3: inmunización de ratones  $\beta_6$ -/-**

Se inmunizaron ratones  $\beta_6$ -/- mediante inyección intraperitoneal (IP) con 25  $\mu$ g de  $\alpha_v\beta_6$  humano recombinante purificado emulsionado en adyuvante de Freund completo (CFA) a una proporción de volúmenes de 1:1 en un volumen total de 200  $\mu$ l. Alternativamente, se inmunizaron ratones  $\beta_6$ -/- mediante inyección IP con  $4 \times 10^6$  células NIH 3T3 transfectadas con  $\beta_6$  resuspendidas en 100  $\mu$ l de PBS suplementado con 1 mg/ml de CaCl<sub>2</sub> y 1 mg/ml de MgCl<sub>2</sub>, y los mismos ratones se inyectaron en un sitio contiguo con 100  $\mu$ l de CFA. Dos semanas y cuatro semanas después de la inmunización inicial, los ratones recibieron un refuerzo de manera similar con los mismos reactivos, con la excepción de que se utilizó adyuvante de Freund incompleto en lugar de CFA. Los ratones se sangraron 7 días después del refuerzo final y se determinaron los títulos anti- $\beta_6$  mediante unión del suero a  $\alpha_v\beta_6$  humano recombinante purificado o a células transfectadas con  $\beta_6$ . En el caso de los ratones inmunizados con  $\alpha_v\beta_6$  humano recombinante purificado, se dejaron reposar durante 3 meses y se inmunizaron nuevamente con el mismo antígeno mezclado con ImmunEasy (Qiagen). Tres días antes del aislamiento de bazos para las fusiones de hibridoma, los ratones se inmunizaron con 12,5  $\mu$ g de proteína  $\alpha_v\beta_6$  humana recombinante purificada por vías tanto IP como intravenosa. El día de la fusión, se sacrificaron los animales, y se extirparon los bazos y trituraron formando suspensiones de células individuales. Los esplenocitos se immortalizaron mediante fusión con una pareja de fusión celular seleccionable con fármaco.

**Ejemplo 4: cribado de hibridomas**

Se generaron dos grupos de anticuerpos mediante la inmunización de ratones  $\beta_6$ -/. Se generó un juego de anticuerpos mediante inmunización con  $\alpha_v\beta_6$  truncado humano soluble (fusión n° 6). El otro juego de anticuerpos se generó mediante inmunización con células NIH 3T3 transfectadas con  $\beta_6$  murinas (fusión n° 7). El cribado para anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_6$  se llevó a cabo utilizando ensayos de unión y funcionales basados en células y sin células, tal como se describe posteriormente. La selección inicial de los clones positivos se basó en la unión a células humanas y murinas transfectadas con  $\alpha_v\beta_6$ hs o con  $\beta_6$  purificadas (control: células no transfectadas). Se expandieron los clones seleccionados y los cultivos terminales se evaluaron nuevamente para la unión a tanto células transfectadas con  $\beta_6$  como a células no transfectadas, en ensayos de captura celular (Ejemplo 5b, anteriormente) (se muestran ejemplos representativos en las figuras 1A y 1B, en los que se omiten los prefijos "6" o "7" de los nombres de mAb, que indican la fusión n° 6 y la fusión n° 7, respectivamente; ver también la Tabla 2, a continuación). Algunos anticuerpos se unen preferentemente a las células transfectadas con  $\beta_6$ , mientras que otros se unieron tanto a células transfectadas como a células no transfectadas, indicando que sólo un subconjunto de los anticuerpos presentaba una preferencia para  $\beta_6$  (figs. 1A y 1B). La selección posterior se basó en la capacidad de los anticuerpos de bloquear la unión a LAP de tanto células murinas transfectadas con  $\alpha_v\beta_6$ \_hs biotinilado como de células murinas transfectadas con  $\beta_6$ . Los clones seleccionados se subclonaron utilizando FACS y se almacenaron bajo congelación hasta la utilización.

Los anticuerpos monoclonales se cribaron para especificidad de unión a  $\alpha_v\beta_6$  basándose en su capacidad de unirse a células transfectadas con  $\beta_6$  y no a células parentales, no transfectadas. Los anticuerpos monoclonales se confirmaron adicionalmente como ligantes específicos de  $\alpha_v\beta_6$  y no de otras integrinas  $\alpha_v$  o integrinas no específicas (es decir, integrinas no  $\alpha_v$  que se unen a ligandos que contienen RGD) basándose en su falta de unión a líneas celulares que expresan  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_8$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$  o  $\alpha_5\beta_1$ . Éstas incluían células transfectadas establemente, así como líneas celulares no transfectadas JY, K562, SW480, NIH3T3 y FDCP1.

Algunos de los anticuerpos que han sido depositados en la ATCC se listan a continuación, en la Tabla 1.

Tabla 1. Hibridomas depositados

Clones de hibridoma	ATCC n°	Fecha de depósito
6.1A8	PTA-3647	16 de agosto, 2001
6.2B10	PTA-3648	16 de agosto, 2001
6.3G9	PTA-3649	16 de agosto, 2001

Clones de hibridoma	ATCC nº	Fecha de depósito
6.8G6	PTA-3645	16 de agosto, 2001
6.2B1	PTA-3646	16 de agosto, 2001
6.2A1	PTA-3896	5 de diciembre, 2001
6.2E5	PTA-3897	5 de diciembre, 2001
7.1G10	PTA-3898	5 de diciembre, 2001
7.7G5	PTA-3899	5 de diciembre, 2001
7.1C5	PTA-3900	5 de diciembre, 2001

### Ejemplo 5: ensayos de cribado y caracterización

#### a. ELISA de $\alpha_v\beta_6$

5 Se recubrió una placa de microtitulación de 96 pocillos (Corning COSTAR EASY-WASH) con 50  $\mu$ l/pocillo de 5  $\mu$ g/ml de  $\alpha_v\beta_6$ hs a 4°C durante la noche. La placa se lavó con tampón de lavado (TWEEN-20 al 0,1% en PBS) cuatro veces en una lavadora de placas automática. A continuación, se añadieron 180  $\mu$ l/pocillo de BSA al 3% en TBS y se incubaron durante 1 hora a 25°C para bloquear la unión no específica. La placa se lavó tal como se ha indicado anteriormente y se añadieron diluciones de sobrenadante de hibridoma (para los ensayos de cribado) o de anticuerpo purificado (para la caracterización) en TBS que contenía 1 mg/ml de BSA,  $\text{CaCl}_2$  1 mM y  $\text{MgCl}_2$  1 mM (50  $\mu$ l/pocillo). La placa se incubó durante 1 hora a 25°C, se lavó y después se incubó durante 1 hora con 50  $\mu$ l/pocillo de anticuerpo IgG+A+M de cabra antiratón conjugado con peroxidasa (Cappel). El anticuerpo unido se detectó utilizando 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La unión estaba indicada por la absorbancia medida a 450 nm.

#### b. Ensayo de captura celular

15 Se recubrió una palca de microtitulación de 96 pocillos con 50  $\mu$ l/pocillo de anticuerpo secundario (IgG de burro antiratón (Jackson Immunoresearch); 5  $\mu$ g/ml diluidos en bicarbonato sódico 50 mM, pH 9,2) a 4°C durante la noche. Las placas se lavaron dos veces con 100  $\mu$ l/pocillo de tampón de ensayo (RPMI + BSA al 2%) y después se bloquearon con 100  $\mu$ l/pocillo del tampón de ensayo a 37°C durante 1 hora. Para las células FDC-P1 y las células FDC-P1 transfectadas con  $\beta_6$ , las placas se bloquearon con IgG antiratón (Jackson ImmunoResearch; 20  $\mu$ g/ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente para reducir la unión no específica del receptor de Fc por parte del anticuerpo secundario (omitido para otros tipos celulares). Durante el bloqueo de las placas, las células se marcaron con 2  $\mu$ M de pigmento fluorescente (calceína-AM, Molecular Probes) en el tampón de ensayo a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/ml. Las células se incubaron en el tampón de ensayo bajo agitación suave en un baño de agua a 37°C durante 15 minutos, se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón de ensayo hasta alcanzar una densidad de  $5 \times 10^6$  células/ml. Tras la etapa de bloqueo, se descartó el tampón mediante decantación de la placa y se añadieron 25  $\mu$ l/pocillo de sobrenadante o de anticuerpo purificado a la placa. Tras una incubación de 15 minutos a 37°C, se añadieron 25  $\mu$ l/pocillo de células marcadas y la placa se incubó durante 1 hora a 37°C. La placa se lavó 3 a 5 veces con el tampón de ensayo (100  $\mu$ l/pocillo) y se registró la fluorescencia emitida por las células capturas en la placa. Se determinó el porcentaje de unión mediante comparación de la fluorescencia antes de la última etapa de lavado (es decir, del total de células añadidas) y la posterior al lavado (es decir, de las células unidas).

#### c. FACS

35 Las células se recolectaron mediante tripsinización, se lavaron una vez en PBS y después se resuspendieron en tampón FACS (1X PBS, FBS al 2%,  $\text{NaN}_3$  al 0,1%,  $\text{CaCl}_2$  1 mM y  $\text{MgCl}_2$  1 mM). A continuación, se incubaron  $0,2 \times 10^5$  células sobre hielo durante 1 hora en tampón FACS que contenía sobrenadante de hibridoma en un volumen total de 100  $\mu$ l. Tras la incubación, las células se lavaron dos veces con tampón FACS helado, se resuspendieron en 100  $\mu$ l de tampón FACS que contenía 5  $\mu$ g/ml de IgG-PE de burro antiratón (Jackson ImmunoResearch) y se incubaron sobre hielo durante 30 minutos. A continuación, las células se lavaron dos veces con tampón FACS helado y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de tampón FACS. Se realizó un seguimiento mediante citometría de flujo de la unión de anticuerpo secundario marcado con PE.

#### d. Unión de biotina- $\alpha_v\beta_6$ hs a LAP

Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Corning COSTAR EASY-WASH) con 0,3  $\mu$ g/ml de LAP humano recombinante (R&D Systems, nº de cat. 246-LP) diluidos en PBS (50  $\mu$ l/pocillo) a 4°C durante la noche. Tras el recubrimiento, se retiró la solución, se bloquearon las placas con 180  $\mu$ l/pocillo de BSA al 3%/TBS a 25°C durante 1 hora. En una placa separada de 96 pocillos de fondo redondo, 60  $\mu$ l/pocillo de una solución madre 2X (0,5

5  $\mu\text{g/ml}$  (1,25 nM) de biotina- $\alpha_v\beta_6$ ,  $\text{CaCl}_2$  2 mM y  $\text{MgCl}_2$  2 mM en TBS que contenía 1 mg/ml de BSA) se combinaron con 60  $\mu\text{l}$ /pocillo de una solución madre 2X de un sobrenadante de hibridoma (para el cribado) o un anticuerpo purificado (también en TBS que contenía 1 mg/ml de BSA) y se incubaron a 25°C durante 1 hora. Tras el lavado de la placa recubierta con LAP utilizando tampón de lavado (TWEEN-20 al 0,1% en PBS) 4 veces en una lavadora de placas automática, se transfirieron 100  $\mu\text{l}$  de la mezcla de anticuerpo- $\alpha_v\beta_6$  a la placa y se incubaron durante 1 hora a 25°C. Se lavó la placa tal como anteriormente y se incubó con 50  $\mu\text{l}$ /pocillo de una dilución 1:1.000 de conjugado de extravidina-peroxidasa de rábano picante (Sigma) en TBS (1 mg/ml de BSA) durante 1 hora a 25°C. Se detectó la proteína unida utilizando el sustrato TMB.

#### e. Adhesión de células $\beta_6$ -FDC-P1 a LAP

10 Se recubrió una placa de microtitulación de 96 pocillos con 50  $\mu\text{l}$ /pocillo de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de LAP humano recombinante (R&D Systems) diluidos en bicarbonato sódico 50 mM, pH 9,2, a 4°C durante la noche. La placa se lavó dos veces con PBS (100  $\mu\text{l}$ /pocillo) y se bloqueó con BSA al 1% en PBS (100  $\mu\text{l}$ /pocillo) durante 1 hora a 25°C. La placa se lavó dos veces con 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de tampón de ensayo (TBS completo más  $\text{CaCl}_2$  1 mM y  $\text{MgCl}_2$  1 mM). A continuación, a los pocillos individuales de la placa se añadieron 25  $\mu\text{l}$  de un sobrenadante de hibridoma (o un anticuerpo purificado) y 25  $\mu\text{l}$  de células  $\beta_6$ -FDC-P1 ( $5 \times 10^6$  células/ml, marcadas con calceína-AM tal como se ha indicado anteriormente). La placa se incubó a 25°C durante 1 hora y después se lavó 4 a 6 veces con el tampón de ensayo (100  $\mu\text{l}$ /pocillo). Se registró la fluorescencia emitida por las células capturadas sobre la placa. Se determinó el porcentaje de unión mediante comparación de la señal de fluorescencia antes de la etapa final de lavado (es decir, el total de células añadidas) con la posterior al lavado (es decir, de las células unidas).

#### 20 f. Bioensayo de TGF- $\beta$

El bioensayo de TGF- $\beta$  utilizado en la presente memoria es una variación del ensayo de cocultivo de células epiteliales pulmonares de Mink (MLEC) con PAI-1-luciferasa, descrito en Abe *et al.*, Anal. Biochem. 216:276-284, 1994, en el que se cocultivan células transfectadas con  $\beta_6$  con las células informadoras para realizar un seguimiento de la activación de TGF- $\beta$  por parte de  $\alpha_v\beta_6$  (Munger, *supra*). Es un bioensayo cuantitativo para TGF- $\beta$  basado en su capacidad de inducir la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1). En este ensayo, las células MLEC se transfectan establemente con un constructo de expresión que contiene un promotor del PAI-1 truncado que se ha fusionado con el gen informador de la luciferasa de luciérnaga. La exposición de las células MLEC transfectadas a TGF- $\beta$  activo (0,2 a  $>30$  pM) resulta en un incremento dependiente de la dosis de la actividad de la luciferasa en los lisados celulares.

30 Para llevar a cabo este ensayo, las TMLC (línea celular epitelial pulmonar de Mink Mv1 Lu) se transfectaron con el constructo de PAI-1-luciferasa. Las células transfectadas se cultivaron en DMEM + FBS al 10% con L-Gln, Pen/Strep y 200  $\mu\text{g/ml}$  de G418. Se transfectaron células SW480 con un constructo de integrina  $\beta_6$  (" $\beta_6$ -SW480" o células "SW480  $\beta_6$  ") en DMEM + FBS al 10% con L-Gln y Pen/Strep. Las células se levantaron de los matracos con PBS + EDTA 5 mM, se lavaron en PBS + BSA al 0,5%, se contaron con un hemocitómetro y se sembraron en placas de 96 pocillos. Las células SW480- $\beta_6$  se sembraron a una densidad de  $4 \times 10^4$  células/pocillo en el tampón de lavado. Los anticuerpos monoclonales se diluyeron en DMEM (sin suero), se añadieron a las células SW480- $\beta_6$  y se preincubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron células TMLC a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/pocillo hasta un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ . Las placas se incubaron durante 20 horas en un incubador humidificado enriquecido en  $\text{CO}_2$ . Se descartaron los sobrenadantes de las placas y se sustituyeron por 100  $\mu\text{l}$  de PBS +  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM y  $\text{Mg}^{2+}$  1 mM. A continuación, se lisaron las células en las placas y se detectó el nivel de actividad de luciferasa con la reacción de tipo luminiscente kit Packard LUCLITE (nº 6016911) y el luminómetro de microplacas TROPIX.

#### Ejemplo 6: purificación de anticuerpos

45 Se seleccionaron ocho clones de hibridoma de la fusión nº 6 (indicada con el prefijo "6") y catorce clones de hibridoma de la fusión nº 7 (indicado con el prefijo "7") para la ampliación y caracterización adicionales (Tabla 2).

Se preparó un cultivo a pequeña escala (150 ml) de cada hibridoma y se recogió el sobrenadante mediante centrifugación. Se purificaron los anticuerpos a partir de dichos sobrenadantes mediante cromatografía de afinidad con proteína A. Para los anticuerpos de isotipo IgG<sub>2a</sub>, el sobrenadante se cargó directamente sobre proteína A sefarosa 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Uppsala, Suecia) (1 ml de volumen de lecho en reposo). La columna se lavó con PBS y la fracción de IgG se eluyó con ácido fosfórico 25 mM, NaCl 100 mM, pH 2,8 en un volumen 1:20 de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0,5 M, pH 8,6. Para los anticuerpos IgG1 murinos, el sobrenadante se ajustó a glicina 1,5 M, NaCl 3 M, pH 8,9, previamente a la carga, y la columna se lavó con  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  25 mM, NaCl 3 M, pH 8,6, previamente a la elución. Estas preparaciones se utilizaron para la caracterización bioquímica *in vitro* descrita en la presente memoria.

55

Tabla 2: caracterización de clones de hibridoma

Nombre del clon	Clon nº	Isotipo	Bloqueante*
6.1A8	2	IgG2a	Y
6.2B10	10	IgG2a	Y
6.3G9	25	IgG1	Y
6.4B4	30	IgG1	N
6.6B5	46	IgG1	N
6.8B4	55	IgG1	N
6.8G6	56	IgG1	Y
6.2B1	85	IgG1	Y
7.1C5	2	IgG2a	Y
7.1G10	5	IgG2a	Y
7.2A1	6	IgG2a	Y
7.2F5	11	IgG2a	Y
7.2H2	12	IgG2a	Y
7.4A3	17	IgG2a	Y
7.7G5	32	IgG1	Y
7.8H12	39	IgG2a	Y
7.9D4	40	IgG2a	N
7.9G8	41	IgG2a	Y
7.9H5	43	IgG2a	Y
7.10D7	44	IgG2a	Y
7.10H2	46	IgG2a	Y

\* Se define bloqueante como un anticuerpo que bloquea la unión de  $\alpha_v\beta_6$  a LAP, determinada mediante bloqueo de la unión del ligando a  $\alpha_v\beta_6$  hs purificado o a células expresantes de  $\beta_6$

- 5 Para la utilización en modelos animales, los clones de hibridoma se ampliaron a 2 litros de medio y se cultivaron durante 4 semanas en bolsas de cultivo Lifecell PL732 (Nexell, nº de cat. R4R2113). Se purificaron los anticuerpos de los hibridomas mediante cromatografía de afinidad con proteína A tal como se ha indicado anteriormente, seguido de una etapa de intercambio iónico en Q-sefarosa (Amersham Pharmacia). El eluido de la etapa cromatográfica con proteína A se ajustó a pH 8,6 utilizando base Tris 2 M, se diluyó 10 veces con agua y se cargó en una columna de Q-sefarosa (20 mg de proteína/ml de resina) que había sido equilibrado en  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  10 mM, NaCl 25 mM, pH 8,6. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado y la proteína unida se eluyó utilizando  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2. Las proteína eluidas se filtraron a esterilidad (0,45  $\mu\text{m}$ ) y se almacenaron a -70°C hasta la utilización.

#### Ejemplo 7: caracterización de los anticuerpos purificados

- 15 Los anticuerpos purificados (Tabla 2, *supra*) se caracterizaron cuantitativamente con respecto a su capacidad de (1) unirse a  $\alpha_v\beta_6$  hs, (2) unirse a células SW480 y FDC-P1 transfectadas con  $\beta_6$ , (3) inhibir la unión de biotina- $\alpha_v\beta_6$  a LAP, (4) inhibir la unión de células FDC-P1 transfectadas con  $\beta_6$  a LAP, y (5) bloquear la activación mediada por  $\alpha_v\beta_6$  de TGF- $\beta$  en el ensayo de MLEC (*supra*). Se comparó la potencia relativa de cada uno de dichos ensayos al del anticuerpo conocido de  $\alpha_v\beta_6$  10D5 (Huang *et al.*, J. Cell Sci. 111:2189, 1998) y, en algunos casos, el anticuerpo anti- $\alpha_v$  L230. Para la caracterización de los anticuerpos Fusión nº 7, también se utilizó el anticuerpo Fusión nº 6 6.8G6 a modo de control positivo.

Un experimento inicial de unión (Ejemplo 5a, *supra*), llevado a cabo en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM y  $\text{Mg}^{2+}$  1 mM, indicó que la mayoría de los anticuerpos purificados se unía a  $\alpha_v\beta_6$ hs (figs. 2A y 2B). Sin embargo, inesperadamente no se observó unión de 10D5 ni de los clones 7.2F5 y 7.10D7. Un experimento posterior estableció que la unión de 10D5 (fig. 3E), 7.2F5 y 7.10D7 era soportada sólo débilmente por  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , y mucho más fuertemente por  $\text{MnCl}_2$  1 mM.

Entre los nuevos clones, tres (6.1A8 (fig. 3A), 7.7G5 y 6.8G6 (fig. 3C)) mostraron una necesidad de cationes divalentes, aunque no se observó ninguna diferencia entre el estado de unión a  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  y de unión a  $\text{Mn}^{2+}$ .

Los clones restantes no mostraron ninguna necesidad de cationes divalentes, es decir, podían unirse al antígeno en presencia de EDTA 10 mM (figs. 3B, 3D y 3F). El análisis de FACS de la unión de anticuerpos a las células NIH 3T3 o SW480 transfectadas con  $\beta_6$  reveló un patrón similar, con la excepción de que 10D5, en el presente contexto, se unió equivalentemente en los estados de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . Las necesidades de unión a  $\alpha_v\beta_6$  soluble pueden diferir de las de unión a  $\alpha_v\beta_6$  expresado sobre la superficie celular, debido a diferencias en la conformación de la proteína o a efectos de avidéz.

Estos resultados sugieren que existen por lo menos 3 clases diferentes de anticuerpos bloqueantes de  $\beta_6$  en este grupo. Una de las clases (10D5) distingue entre las condiciones de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . Otra clase (que incluye 6.1A8, 7.7G5 y 6.8G6) requiere cationes pero no distingue entre  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . La última clase (que incluye el anticuerpos anti- $\alpha_v$  L230, 6.2B10, 6.3G9 (fig. 3B) y 6.2B1 (fig. 3D), 7.1C5 y 7.1G10) es independiente de los cationes.

A continuación, se evaluaron los anticuerpos purificados para su capacidad de inhibir la interacción  $\alpha_v\beta_6$ -LAP. En el ensayo sin células del Ejemplo 5d, *supra*, los anticuerpos 6.1A8, 6.2B1, 6.3G9 y 6.8G6 mostraron valores de IC50 inferiores a los de 10D5 (fig. 4A, Tabla 3). El anticuerpo 6.2B10 mostró un IC50 superior pero todavía mostró una inhibición completa (fig. 4A). El anticuerpo 6.4B4 mostró una inhibición sólo parcial, mientras que 6.6B5 y 6.8B4 no mostraron inhibición (fig. 4A). Utilizando el mismo sistema de ensayo, los anticuerpos 7.1C5, 7.1G10, 7.2A1, 7.4A3, 7.7G5, 7.9G8, 7.9H5 y 7.10H2 mostraron valores de IC50 inferiores a los de 10D5 (fig. 4B, Tabla 3). Los anticuerpos 7.2F5, 7.2H2 y 7.8H12 mostraron valores de IC50 prácticamente idénticos o más altos y sin embargo todavía proporcionaron una inhibición completa (fig. 4B).

En el ensayo celular descrito en el Ejemplo 5e, *supra*, se observó una tendencia similar, con las excepciones de 6.1A8, 6.2B10 y 7.9D4, que fueron mucho menos potentes sobre las células que sobre la proteína purificada (figs. 5A-E, Tabla 3).

En conjunto, dichos resultados indican que los presentes inventores generaron con éxito anticuerpos que inhiben específicamente la interacción de  $\alpha_v\beta_6$  tanto humano como murino con LAP. Algunos de estos anticuerpos se unían a  $\alpha_v\beta_6$  con afinidad elevada ( $K_d$  aparentes  $\geq 0,3$  nM, determinadas mediante citometría de flujo), inhibían la unión de las células transfectadas con  $\beta_6$  a LAP con una IC50 de  $\geq 0,05$  nM (8 ng/ml) e impedían la activación mediada por  $\alpha_v\beta_6$  de TGF- $\beta$ 1 con una IC50 de  $\geq 0,58$  nM (87 ng/ml).

Finalmente, los anticuerpos purificados se evaluaron para su capacidad de bloquear la activación mediada por  $\alpha_v\beta_6$  de TGF- $\beta$  en el ensayo de gen informador PAI-1/luciferasa (Ejemplo 5f, *supra*). Nuevamente, los anticuerpos 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 7.1G10 y 7.7G5 fueron capaces de inhibir la activación mediada por  $\alpha_v\beta_6$  de TGF- $\beta$  con valores de IC50 inferiores al de 10D5, aunque los anticuerpos restantes aparentemente eran significativamente menos potentes en este ensayo (figs. 6A y 6B, Tabla 3). De esta manera, la capacidad de bloquear la interacción de  $\alpha_v\beta_6$  con LAP correlaciona con la capacidad de inhibir la activación de TGF- $\beta$  *in vitro*.

Tabla 3 Caracterización de los clones de hibridoma

Nombre del clon	Clon nº	EC <sub>IC50</sub> en el ELISA de la unión a $\alpha_v\beta_6$ (ng/ml)	IC50 del bloqueo de $\alpha_v\beta_6$ -LAP (ng/ml)	IC50 del bloqueo de FDC1-LAP (ng/ml)	IC50 dePAI-1-luciferasa (ng/ml)
6.2B1	85	34.7	225	8	87
6.3G9	25	76.7	271	17	375
6.8G6	56	17.5	169	23	312
10D5	-	-	605	50	2070
6.1A8	2	3.7	179	2520	~40,000
6.2B10	10	78.9	1950	>30,000	>40,000
6.4B4	30	25.4	>50,000	>30,000	>40,000
6.6B5	46	17.1	>50,000	>30,000	>40,000



Nombre del clon	Clon nº	EC <sub>IC50</sub> en el ELISA de la unión a $\alpha_v\beta_6$ (ng/ml)	IC50 del bloqueo de $\alpha_v\beta_6$ -LAP (ng/ml)	IC50 del bloqueo de FDC1-LAP (ng/ml)	IC50 dePAI-1-luciferasa (ng/ml)
6.8B4	55	94.4	>50,000	>30,000	>40,000
L230	-	27.1	229	<b>n.t.**</b>	n.t.
7.1G10	5	4.2	113	30	250
7.7G5	32	13.0	155	51	700
7.1C5	2	2.5*	80*	83	n.t.
7.2A1	6	5*	<b>300*</b>	<b>101</b>	<b>n.t.</b>
10D5	-	<b>43*</b>	377	<b>n.t.</b>	<b>2,000</b>
7.4A3	17	5.7	204	67	3,500
7.10H2	46	6.6	254	63	3,500
7.2H2	12	9.3	370	106	5,500
7.9H5	43	7.3	230	55	7,000
7.9G8	41	6.2	264	284	>20,000
7.8H12	39	46.0	1140	969	>20,000
7.2F5	11	>5000	529	1490	>20,000
7.9D4	40	1.7	incompleto	>10,000	>20,000
7.10D7	44	>5000	3000*	1120	n.t.

\* Datos obtenidos de experimentos separados.

\*\* No sometido a ensayo.

\*\*\* Todos los experimentos resumidos en la Tabla 3 se llevaron a cabo en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM y  $\text{Mg}^{2+}$  1 mM.

5 \*\*\*\* Los anticuerpos en negrita son los anticuerpos de la técnica anterior 10D5 y L230, y nuevos anticuerpos de potencia inhibidor particularmente alta para  $\alpha_v\beta_6$ .

10 A continuación, se determinaron las afinidades en solución de 6.3G9 y 6.8G6 para  $\alpha_v\beta_6$  soluble mediante la utilización de un ensayo de exclusión cinética (KinExA). Se incubó una serie de diluciones de la integrina soluble ( $1 \times 10^{-8}$  M a  $2,4 \times 10^{-12}$  M) con  $1 \times 10^{-10}$  M del anticuerpo durante 3 horas. A continuación, dichas muestras se pasaron por perlas de polimetilmetacrilato recubiertas con la integrina utilizando un instrumento KinExA (Sapidyne Instruments, Inc., Boise, Idaho). En el caso de 6,8G6, se incluyeron  $\text{CaCl}_2$  1 mM y  $\text{MgCl}_2$  1 mM en los tampones de incubación y de ensayo. Las cantidades de anticuerpo unido y libre se determinaron utilizando un anticuerpo secundario antiratón marcado con Cy5. Se llevó a cabo el ajuste a una curva cuadrática utilizando el software de KinExA para estimar una constante de disociación ( $K_d$ ) para cada interacción. Las  $K_d$  determinadas utilizando este método fueron de 15,6 pM para 6.3G9 y 22,8 pM para 6.8G6 (figs. 9A y 9B). De esta manera, ambos anticuerpos presentaban afinidades muy altas para  $\alpha_v\beta_6$ .

20 Se han identificado además clases de anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_6$  que reconocen los estados "activados" de la integrina. Existen dos estados de activación potenciales de  $\alpha_v\beta_6$ . En el primer estado, la integrina activada se define como aquella que presenta una afinidad superior para su ligando. Los anticuerpos específicos para dicho estado activado mostraban un nivel de unión incrementado a la integrina en presencia de cationes activadores, tales como  $\text{MnCl}_2$  1 mM. Una comparación del grado de unión en  $\text{MnCl}_2$  1 mM y  $\text{MgCl}_2$  1 mM (catión no activador) mediante citometría de flujo indica que algunos de los anticuerpos de  $\alpha_v\beta_6$  descritos en la presente memoria, incluyendo 6.1A8 y 6.6B5, mostraban una unión significativamente incrementada en presencia de  $\text{MnCl}_2$ .

25 En un segundo estado activado de  $\alpha_v\beta_6$ , la integrina puede activar el TGF- $\beta$  latente, tal como se ha indicado anteriormente. Se preparó una línea celular que expresaba  $\alpha_v\beta_6$  truncado (SW480( $\beta_6$ -770T)). La línea celular era capaz de unirse a LAP pero no podía activar TGF- $\beta$  en el ensayo de luciferasa de TMLC (Munger *et al.*, *supra*). Los anticuerpos que se unen a las células SW480 transfectadas con  $\beta_6$  de longitud completa, pero no a las células

transfectadas con 770T truncado, eran, de esta manera, específicas para la forma de  $\alpha_v\beta_6$  capaz de activar el TGF- $\beta$ . Los anticuerpos 7.8B3 y 7.8C9 cumplían dichos criterios.

**Ejemplo 8: mapeado de epítomos mediante la competición de anticuerpos**

5 Los anticuerpos monoclonales purificados también se sometieron a ensayo para su capacidad de competir con 6.8G6 para la unión a  $\alpha_v\beta_6$  biotinilado en un formato de ELISA. En este ensayo, se utilizó 6.8G6 para recubrir una placa de ELISA, y una mezcla del anticuerpo competidor y  $\alpha_v\beta_6$  biotinilado en un tampón que contenía 1 mM de cada uno de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . Se detectó integrina unida utilizando conjugado de extravidina-HRP y los anticuerpos competidores se puntuaron para su capacidad de bloquear la unión. Todos los bloqueantes de consenso (Tabla 2) excepto 6.2B10 (un bloqueante débil) se demostró que eran capaces de competir con 6.8G6 en diversos grados (Tabla 4). Estos datos confirman que estos bloqueantes de consenso se unen a un epítipo igual al de 6.8G6 o solapante con el mismo.

Tabla 4. Mapeado de epítomos mediante competición de anticuerpos

Clon	Bloqueante de consenso?	Competición con 6.8G6
6.2A1	N	-
6.4B4	N	-
6.6B5	N	-
6.8B4	N	-
7.9D4	S/N	-
10D5	S	++
L230	S	++
6.1A8	S	++
6.2B10	S (débil)	-
6.3G9	S	+
6.8G6	S	++
6.2B1	S	++
7.1C5	S	+++
7.1G10	S	+++
7.2A1	S	++
7.2F5	S	++
7.2H2	S	++
7.4A3	S	++
7.7G5	S	++
7.8H12	S	++
7.9G8	S	++
7.9H5	S	++
7.10D7	S	+
7.10H2	S	++

15 Los anticuerpos monoclonales purificados se sometieron a ensayo para su capacidad de competir con 6.3G9 biotinilado o 6.8G6 biotinilado para la unión a  $\alpha_v\beta_6$  en un ELISA. En este ensayo, se utilizó  $\alpha_v\beta_6$  no marcado para

- 5 recubrir una placa ELISA y una mezcla del anticuerpo competidor y se añadió el anticuerpo biotinilado a un tampón que contenía 1 mM de cada uno de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Se detectó el anticuerpo biotinilado unido mediante la utilización de conjugado de neutravidina-HRP. Los datos mostraban que los anticuerpos bloqueantes más potentes (por ejemplo 6.2B1, 7.1C5 y 7.1G10) competían tanto con 6.3G9 como con 6.8G6 para la unión a  $\alpha_v\beta_6$  (Tabla 4.1, y figuras 10A y 10B). Los anticuerpos 6.1A8 y 7.7G5 mostraban menos competición, probablemente debido a su menor afinidad para  $\alpha_v\beta_6$ . Ninguno de los anticuerpos no bloqueantes o el anticuerpo anti- $\alpha_v$  L230 mostró competición con 6.3G9 o con 6.8G3 en dicho ensayo. Estos resultados indican que los anticuerpos bloqueantes específicos para  $\alpha_v\beta_6$  se unen a los mismos epítopos o a epítopos solapantes sobre  $\alpha_v\beta_6$ .

Tabla 4.1. Mapeado de epítopos mediante competición de anticuerpos

Clon	Bloqueante de consenso?	Competición con 6.8G6 biotinilado	Competición con 6.3G9 biotinilado
6.3G9	S	+++	+++
6.2B1	S	+++	+++
6.8G6	S	+++	++
7.1C5	S	+++	+++
7.1G10	S	+++	+++
7.7G5	S	++	+
6.1A8	S	++	+
6.2A1	N	-	-
6.2E5	N	-	-
6.2G2	N	-	-
6.4B4	N	-	-
7.8B3	N	-	-
7.8C9	N	-	-
L230	S	-	-

10

**Ejemplo 9: secuencias de CDR**

Los ADNc de algunos de los anticuerpos monoclonales purificados se aislaron y se secuenciaron utilizando técnicas estándares tal como se describe en Coligan *et al.* (editores), Current Protocols in Immunology, Wiley, Media, PA, 2001. Las secuencias de aminoácidos deducidas se muestran en las figuras 7A y 7B.

- 15 Las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada de los ligantes de elevada afinidad 6.8G6, 6.1A8, 6.2B1, 6.3G9 y 6.2A1 y del no bloqueante 6.2G2 se comparan del modo siguiente (los guiones indican huecos).

CDR1

6.8G6	SYTFTDYAMH (SEC ID N°1)
6.1A8	SYTFTDYTMH (SEC ID N°2)
6.2B1	GFTFSRYVMS (SEC ID N°3)
6.3G9	GFTFSRYVMS (SEC ID N°3)
6.2A1	GYDFNNDLIE (SEC ID N°49)
6.2G2	GYAFTNYLIE (SEC ID N°50)

## ES 2 389 037 T3

### CDR2

6.8G6	VISTYYGNTNYNQKFKG (SEC ID N°4)
6.1A8	VIDTYYGKTNYNQKFEG (SEC ID N°46)
6.2B1	SISSG-GSTYYPDSVKG (SEC ID N°5)
6.3G9	SISSG-GRMYYPDTPVKG (SEC ID N°6)
6.2A1	VINPGSGRTNYNEKFKG (SEC ID N°51)
6.2G2	VISPGSGIINYNEKFKG (SEC ID N°52)

### CDR3

6.8G6	GGLRRGDRPSLRYAMDY (SEC ID N°7)
6.1A8	GGFRRGDRPSLRYAMDS (SEC ID N°47)
6.2B1	GAIYDG-----YYVFAY (SEC ID N°8)
6.3G9	GSIIYDG-----YYVFPY (SEC ID N°9)
6.2A1	IYYGPH-----SYAMDY (SEC ID N°53)
6.2G2	ID-YSG-----PYAVDD (SEC ID N°54)

En la SEC ID n° 7, el "R" en negrita (el duodécimo residuo) indica que es polimórfico y que puede ser, por ejemplo, una Q.

5 Las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de estos cuatro ligantes de alta afinidad del no bloqueante 6.2G2 se comparan del modo siguiente.

### CDR1

6.8G6	RASQSVSTSS-YSYMY (SEC ID N°10)
6.1A8	RASQSVSIST-YSYIH (SEC ID N°48)
6.2B1	SASSSVSSS----YLY (SEC ID N°11)
6.3G9	SANSSVSSS----YLY (SEC ID N°12)
6.2A1	KASLDVRTAVA (SEC ID N°55)
6.2G2	KASQAVNTAVA (SEC ID N°56)

### CDR2

6.8G6	YASNLES (SEC ID N°13)
6.1A8	YASNLES (SEC ID N°13)
6.2B1	STSNLAS (SEC ID N°14)
6.3G9	STSNLAS (SEC ID N°14)
6.2A1	SASYRYT (SEC ID N°57)
6.2G2	SASYQYT (SEC ID N°58)

CDR3

6.8G6	QHNWEIPFT (SEC ID N°15)
6.1A8	QHSWEIPYT (SEC ID N°16)
6.2B1	HQWSSYPPT (SEC ID N°17)
6.3G9	HQWSTYPPT (SEC ID N°18)
6.2A1	QQHYGIPWT (SEC ID N°59)
6.2G2	QHHYGVPT (SEC ID N°60)

Tal como se muestra en las figuras 7A y 7B, los mAbs se clasifican en la clase dependiente de cationes divalentes (por ejemplo 6.1A8 y 6.8G6) aparentemente contienen secuencias de aminoácidos muy similares dentro de las CDR, mientras que los mAb independientes de los cationes divalentes (por ejemplo 6.2B1 y 6.3G9) contienen otro juego de motivos en sus CDR.

La potencia y la especificidad de los anticuerpos monoclonales anti- $\alpha_v\beta_6$  pueden estar gobernados por residuos aminoácidos sutilmente diferentes. En el caso de 6.1A8 y 6.8G6, las secuencias de aminoácidos de los dominios variables son muy similares, conteniendo 10 diferencias de aminoácidos en la cadena pesada, tres de las cuales son conservadoras, y 11 diferencias de aminoácidos en la cadena ligera. Sin embargo, estos anticuerpos presentan una diferencia de actividad de aproximadamente 100 veces en los ensayos *in vitro*. Las diferencias de aminoácidos se encuentran dispersadas a lo largo de la totalidad de los dominios variables de las cadenas polipeptídicas y estos residuos pueden funcionar solos o sinérgicamente con los residuos en la misma cadena o en la otra cadena de la pareja, afectando a la potencia de los anticuerpos. En la cadena pesada, se encuentran siete residuos situados de manera que es probable que se encuentren muy próximos o desempeñen un papel activo en la unión a  $\alpha_v\beta_6$ .

Se observa un motivo RGD en varias proteínas de unión a integrina (ligandos). Se ha demostrado que este motivo media en sus interacciones con las integrinas al entrar directamente en contacto con el bolsillo de unión en la integrina. Debido a que RGD mismo es bastante común entre las proteínas de unión a integrina, los residuos flanqueantes en el exterior del motivo seguramente participan en la provisión de la especificidad de unión a la interacción de integrina-ligando. En 6.1A8 y 6.8G6, uno de dichos residuos flanqueantes se encuentra en la posición 101 en la cadena pesada, dentro de CDR3. Este residuo aminoácido flanquea el motivo RGD y podría encontrarse situado en el sitio de reconocimiento de antígenos, contribuyendo a la potencia y especificidad de la unión.

Entre otros residuos diferentes dentro de las mismas CDR de cadena pesada de 6.1A8 y 6.8G6 se incluyen aquellos en las posiciones 33 (CDR1), posiciones 52, 57 y 65 (CDR2) y posición 115 (CDR3). Otra diferencia en la cadena pesada se observa en la posición 4 en el marco 1, que se encuentra próximo al extremo N-terminal. Los modelos cristalográficos predicen que este residuo se pliega en una posición próxima a las CDR del anticuerpo y podría desempeñar un papel importante en la unión a  $\alpha_v\beta_6$ . Las tres diferentes restantes entre 6.1A8 y 6.8G6 son diferencias conservadoras en las posiciones 20 (marco 1), 44 (marco 2) y 82 (marco 3).

Las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos independientes de cationes también son muy homólogas. Pueden agruparse en dos clases: aquellos que compiten con el anticuerpo que contiene RGD 6.8G6 (es decir 6.2B1, 6.3G9, 7.10H2, 7.9H5, 7.1C5, 7.1G10 y 7.4A3) y con aquellos que no contienen (es decir 6.2A1, 6.2B10 y 6.4B4). La clase competidora con 6.8G6 contiene un motivo FXY en la CDR3 de la cadena pesada, mientras que la clase no competidora no lo contiene. Esta diferencia sugiere que el motivo FXY resulta importante para mediar en la unión independiente de cationes a  $\alpha_v\beta_6$ . Además, esta clase de anticuerpos que contienen FXY probablemente se une a un epítipo de  $\alpha_v\beta_6$  que se solapa, aunque es diferente, del bolsillo de unión a RGD. Los anticuerpos 6.2B10 y 6.4B4 no contienen un motivo FXY y son malos bloqueantes de  $\alpha_v\beta_6$ . Se ha demostrado que se unen a la porción similar al dominio I de  $\alpha_v\beta_6$  y definen todavía otro epítipo al que se unen los anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_6$ . Resulta interesante que el anticuerpo monoclonal 6.2A1 pertenece a la clase independiente de cationes pero no contiene la secuencia RGD, al igual que otros mAbs independientes de cationes.

El anticuerpo monoclonal 7.7G5 pertenece a la clase dependiente de cationes. Sin embargo, la secuencia de cadena ligera de 7.7G5 es muy homóloga respecto al anticuerpo 6.2B10 independiente de cationes de unión al dominio I. La cadena pesada de 7.7G5 también es similar a los anticuerpos independientes de cationes en la CDR1. Sin embargo sus CDR2 y CDR3 son más similares a las de los anticuerpos de la clase dependiente de cationes. Esta observación sugiere que las CDR específicas confieren especificidad al anticuerpo. Lo anterior resulta particularmente cierto para la CDR3 de la cadena pesada, presumiblemente debido al elevado grado de variabilidad en esta parte del anticuerpo. De hecho, dos de cada tres anticuerpos dependientes de anticuerpos y siete de cada nueve anticuerpos independientes de anticuerpos contienen secuencias de CDR3 de cadena pesada que es probable que desempeñen

un papel importante en el reconocimiento de  $\alpha_v\beta_6$ . Cabe indicar que 7.7G5 no presenta un motivo RGD sino que contiene un motivo XGD en su CDR2 de cadena pesada. Este motivo XGD puede funcionar de un modo similar a RGD y conferir afinidad/especificidad de unión a 7.7G5.

- 5 Las observaciones de secuencias anteriormente proporcionadas y las inferencias realizadas a partir de ellas proporcionan una base para el diseño racional de secuencias de aminoácidos específicas de región variable que confieren propiedades de unión específicas.

#### Ejemplo 10: anticuerpos diagnósticos

- 10 Los anticuerpos que pueden detectar la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  en secciones de tejido incluidas en parafina u otras muestras de tejidos pueden resultar útiles como diagnósticos. Estas herramientas diagnósticas pueden utilizarse para detectar, por ejemplo, la regulación positiva de  $\alpha_v\beta_6$  en secciones de tejido para indicaciones tales como cáncer o fibrosis.

- 15 Con el fin de identificar los anticuerpos que pueden detectar  $\alpha_v\beta_6$  en tejidos incluidos en parafina, los presentes inventores en primer lugar cribaron un panel de anticuerpos para la unión a la subunidad  $\beta_6$  purificada mediante HPLC. Los anticuerpos que se unen a esta subunidad es probable que reconozcan péptidos epítopos lineales, y por lo tanto se esperaba que presentasen una mayor probabilidad de éxito en los tejidos incluidos en parafina. La unión de la subunidad  $\beta_6$  purificada se llevó a cabo utilizando un formato de ELISA idéntico al descrito para medir la unión de  $\alpha_v\beta_6$  (*supra*), excepto en que se utilizó la integrina  $\beta_6$  purificada, y no la proteína  $\alpha_v\beta_6$ , inmovilizada sobre la placa. Utilizando este método se identificaron varios anticuerpos de Fusión nº 6 capaces de unirse tanto a la proteína  $\alpha_v\beta_6$  purificada como a la subunidad  $\beta_6$  purificada. Ver la Tabla 5, a continuación, en la que el prefijo "6" en los nombres de los clones ha sido omitido.

20 Tabla 5. Unión de anticuerpos a  $\alpha_v\beta_6$  purificado o a subunidad  $\beta_6$  purificada

Nombre del clon	Unión a $\alpha_v\beta_6$	Unión a subunidad $\beta_6$ purificada mediante HPLC
1A1	+	6
1A8	+	-
1A11	+	+
1E1	+	+
1E6	+	+
1H10	+/-	-
2A1	+	+
2A10	-	-
2B8	-	-
2B10	+	-
2C4	+	+
2C7	+	+
2E5	+	+
2G3	+	-
3A6	+	-
3B1	+	-
3B2	+	+
3B11	+	+
3C2	+	+
3D5	+	-
3D10	+	+

Nombre del clon	Unión a $\alpha_v\beta_6$	Unión a subunidad $\beta_6$ purificada mediante HPLC
3F1	+	-
3G3	-	-
3G5	+	-
3G9	+	-
3H2	+	-
3H11	+	-
4A4	+/-	+
4B2	+	-
4B4	+	-
4B10	+	-
4D2	+	-
4E4	+	+
4G3	+	-
4G4	+	+
4H4	+	+
4H12	+	-
5A2	+	-
5B6	+	+
5D6	+	+
5D8	-	-
5G9	+	+
5G10	+	+
5H3	+	+
6B1	+	+
6B5	+	+
6C4	+	-
6D12	+	+
6E6	+	-
6E10	+	-
6G3	+/-	-
7C7	+	+
7E5	+	-
7F8	+	-
8B4	+	+
8G6	+	-

Nombre del clon	Unión a $\alpha_v\beta_6$	Unión a subunidad $\beta_6$ purificada mediante HPLC
9B5	+	+
9B7	+	+
9B9	+	-
9B10	+	-
9D11	+	+
9E12	+	+
9F5	+	+
9F7	-	-
9G1	+	-
9H11	+	-
10A2	+	-
10A3	+/-	-
10A4	+	-
10A8	+	-
10A9	+	-
10B10	+	-
10D3	+	-
10D11	+	-
10E4	+	+
10F1	+	-
10F12	+	-
10G1	+	-
10G2	-	-
10H11	+	+
1A7	+	-
1D6	+	-
1D9	+	-
1F6	+	-
2B1	+	-
2D9	+	+
2G2	+	+
3D9	+	+
3E5	+	-
4C12	+	-
4E6	+	+



Nombre del clon	Unión a $\alpha_v\beta_6$	Unión a subunidad $\beta_6$ purificada mediante HPLC
4G5	+	-
5A3	+	-
5B3	+	-
5B8	+	+
5B9	+	-
5F7	+	-
6C10	+	+
6D8	+	-
6F4	+	-
6G9	+	-
6H8	+	+
6H9	+	-
7A5	+	+
7A11	+	-
7E6	+	+
7G9	-	+
7H3	+	-
9A2	-	-
9A3	+	+
9A4	-	-
9A9	+	-
9D2	-	-
9D3	-	-
9E4	-	-
9F1	+	-
9F12	-	-
9G11	-	-
10B5	+	-
10B7	+	-
10B9	+/-	-
10C5	+/-	-
10C7	+/-	-
10D6	+/-	-
10E12	+/-	-
10F7	-	-

Tal como se ha mostrado anteriormente, algunos anticuerpos se unieron a la subunidad  $\beta_6$  purificada. Presentan una elevada probabilidad de unirse a  $\alpha_v\beta_6$  desnaturalizado y de esta manera pueden resultar útiles en la detección de  $\alpha_v\beta_6$  en secciones de tejido incluidas en parafina. Otros anticuerpos se unieron a  $\alpha_v\beta_6$  soluble pero no a la subunidad  $\beta_6$ . Ambos tipos de anticuerpos fueron utilizados para teñir células SW480 transfectadas con  $\beta_6$  desnaturalizadas e incluidas en parafina y células parentales no transfectadas, y los datos se muestran en la Tabla 6.

Para teñir los tejidos o células incluidos en parafina, en primer lugar los portaobjetos con las muestras se desparafinaron mediante incubación en las soluciones siguientes: (1) xileno, 5 minutos, dos veces; (2) etanol al 100%, 2 minutos, dos veces; (3) etanol al 95%, 2 minutos, dos veces; (4) etanol al 50%, 2 minutos, una vez; y (5) agua destilada, 2 minutos, una vez. A continuación, se incubaron los portaobjetos en una solución que consistía de 200 ml de metanol y 3 ml de  $H_2O_2$  al 30% durante 15 minutos para bloquear la peroxidasa endógena. Los portaobjetos se enjuagaron dos veces en PBS durante 2 minutos cada vez. A continuación, las secciones en parafina sobre los portaobjetos se desmascararon con pepsina (Zymed 00-3009) durante 5 minutos a 37°C. Los portaobjetos se enjuagaron nuevamente dos veces en PBS durante 2 minutos cada vez. A continuación, se bloquearon los portaobjetos con avidina y después biotina (Vector SP-2001; Vector Laboratories, Burlingame, CA), 10 minutos cada vez a temperatura ambiente, con lavado entre cada incubación tal como se ha indicado anteriormente. Tras drenar la solución de bloqueo de los portaobjetos, se aplicó el anticuerpo primario (sobrenadante de cultivo de hibridoma) diluido en PBS/BSA al 0,1% en los portaobjetos y se incubó durante la noche a 4°C.

Al día siguiente, se enjuagaron los portaobjetos en PBS tal como se ha indicado anteriormente. Simultáneamente, se preparó la solución de complejo de avidina-biotina-peroxidasa de rábano picante (reactivo ABC) del modo siguiente: se mezcló 1 ml de PBS con 20  $\mu$ l de solución A (1:50) y 20  $\mu$ l de solución B (1:50) del kit vector PK-6102; la mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la utilización. Durante este tiempo, los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo antiratón biotinilado (1:200) del kit Vector con 15  $\mu$ l/ml de suero normal. A continuación, se enjuagaron los portaobjetos dos veces en PBS, 2 minutos cada vez. Seguidamente se aplicó el reactivo ABC anteriormente indicado en los portaobjetos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se enjuagaron nuevamente los portaobjetos tal como se ha indicado anteriormente. A continuación, se aplicaron el sustrato (vector SK-4100) y 100  $\mu$ l de DAB (3,3'-diaminobencidina) en los portaobjetos y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se preparó DAB del modo siguiente: a 5 ml de  $H_2O$  se añadieron 2 gotas de solución madre tampón, se mezclaron bien y después se añadieron 4 gotas de solución madre de DAB, se mezclaron bien y a continuación se añadieron 2 gotas de solución de  $H_2O_2$  y se mezcló bien. A continuación, se enjuagaron los portaobjetos en agua corriente durante 2 minutos. Seguidamente, se potenció la señal de DAB en todos los portaobjetos del modo siguiente: se enjuagaron las secciones en parafina en bicarbonato sódico 0,05 M, pH 9,6, durante 10 minutos; se secó con un filtro el exceso de tampón, se aplicó la solución potenciadora de DAB durante 15 segundos y a continuación se enjuagó rápidamente con agua durante 1 minuto para detener la reacción. A continuación los portaobjetos se tiñeron en hematoxilina de Mayer (una contratiñencia nuclear) durante 1 minuto. Los portaobjetos se enjuagaron en agua corriente durante 1 minuto y después se sumergieron en PBS durante 1 minutos de manera que la hematoxilina se tornó azul. Seguidamente se enjuagaron nuevamente los portaobjetos en agua corriente durante 1 minuto y se deshidrataron y clarificaron del modo siguiente: se sumergieron en (1) etanol al 95% durante 1 minutos, dos veces; (2) etanol al 100% durante 1 minuto, dos veces, y (3) xileno durante 2 minutos, dos veces. A continuación, se aplicaron cubreobjetos a los portaobjetos utilizando Permount.

Los resultados sugieren que los anticuerpos Fusión nº 6 1A1, 2C4, 3B2, 3B11, 5D6, 5G9, 5H3, 6D12, 7C7, 9B5, 9B7, 9D11, 9F5, 10E4, 10H11, 6H8, 7A5, 7G9, 9A3, 2A1, 2E5, 4E4, 4H4, 8B4, 2G2 y 4E6, la totalidad de los cuales podía unirse a la subunidad  $\beta_6$  purificada (Tabla 5); en efecto tiñeron fuertemente las células SW480 transfectadas con  $\beta_6$  incluidas en parafina, pero no tiñeron las células parentales, no transfectadas (Tabla 6).

Tabla 6. Unión de anticuerpos a células SW480 incluidas en parafina

nº de ID	Nombre del clon	Unión a SW480/ $\beta_6$ +	Unión a SW480
1	1A1	+++	-
2	1A8	+	+
3	1A11	++	-
4	1E1	+	-
5	1E6	++	+
7	2A1	+++	-
10	2B10	-	-

ES 2 389 037 T3

nº de ID	Nombre del clon	Unión a SW480/ $\beta_6+$	Unión a SW480
11	2C4	+++	-
12	2C7	-	-
13	2E5	+++	-
17	3B2	+++	-
18	3B11	++	-
25	3G9	-	-
30	4B4	+	+
33	4E4	+++	-
35	4G4	-	-
36	4H4	+++	-
39	5B6	+	-
40	5D6	+++	-
42	5G9	+++	-
43	5G10	-	-
44	5H3	+++	-
46	6B5	-	-
48	6D12	+++	-
52	7C7	++	-
54	7F8	-	-
55	8B4	+++	-
56	8G6	-	-
57	9B5	++	-
58	9B7	++	-
61	9D11	++	-
62	9E12	+	-
63	9F5	++	-
68	10A3	-	-
75	10E4	+++	-
80	10H11	+++	-
85	2B1	+	+
87	2G2	+++	-
91	4E6	+++	-
95	5B8	-	-
98	6C10	+	-
102	6H8	++	-

nº de ID	Nombre del clon	Unión a SW480/ $\beta_6$ +	Unión a SW480
104	7A5	+++	-
107	7G9	+++	-
110	9A3	+++	-

#### Ejemplo 11: diagnóstico del cáncer

- La  $\alpha_v\beta_6$  se expresa normalmente a niveles insignificantes a bajos en los tejidos adultos sanos. Sin embargo, la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  se encuentra regulada positivamente en las lesiones, las fibrosis y en el cáncer (ver, por ejemplo, Thomas *et al.*, J. Invest. Dermatology 117:67-73, 2001; Brunton *et al.*, Neoplasia 3:215-226, 2001; Agrez *et al.*, Int. J. Cancer 81:90-97, 1999; Breuss, J. Cell Science 108:2241-2251, 1995). De esta manera, los anticuerpos que pueden unirse específicamente a  $\alpha_v\beta_6$  expresado sobre tejidos incluidos en parafina pueden utilizarse en técnicas inmunohistoquímicas estándares para detectar la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  para el diagnóstico de la fibrosis, el cáncer y cualquier otra enfermedad en la que  $\alpha_v\beta_6$  se encuentra regulado positivamente.
- Tal como se ha indicado anteriormente, determinados anticuerpos de la presente invención se unen a integrina  $\beta_6$  purificada mediante HPLC y a células transfectadas con  $\beta_6$  fijadas e incluidas en parafina. También se ha demostrado en inmunotinciones que estos anticuerpos se unen a tejidos de cáncer escamoso y mamario representativos. Ver, por ejemplo, la figura 8, en la que se utiliza el anticuerpo monoclonal 6.2A1 para mostrar la tinción relativa de los carcinomas mamario y escamoso incluido en parafina. De esta manera, estos nuevos anticuerpos resultan útiles como herramientas diagnósticas.

#### Ejemplo 12: efectos de los mAb bloqueantes anti- $\alpha_v\beta_6$ en ratones Alport

- Los ratones con inactivación del colágeno 4A3 (COL4A3) (Alport) han sido establecidos como modelo *in vivo* para la fibrosis renal y se han utilizado para someter a ensayo los efectos terapéuticos de los agentes farmacológicos (*supra*). Se sometieron a ensayo los mAb 6.8G6 (dependiente de cationes) y 6.3G9 (independiente de cationes) en ratones Alport para determinar si inhibirían la fibrosis normalmente observada en los ratones Alport de siete semanas de edad. Tal como se ha mostrado anteriormente, se ha encontrado que dichos dos anticuerpos inhiben la unión de  $\alpha_v\beta_6$  a LAP y que inhiben la activación de TGF- $\beta$  en bioensayo. A modo de control negativo se utilizó el anticuerpo 1E6.

- Se administraron inyecciones intraperitoneales en ratones Alport de tres semanas de edad 3 veces por semana con uno de los anticuerpos siguientes: (1) 6.8G6, 4 mg/kg (7 ratones), (2) 6.3G9, 4 mg/kg (4 ratones), y (3) 1E6, 1 mg/kg (6 ratones). Se continuaron las inyecciones durante 4 semanas. A continuación, se sacrificaron los ratones y se extirparon los riñones.

- Se prepararon secciones incluidas en parafina de los riñones tal como se ha descrito anteriormente, y después se tiñeron para detectar la actina del músculo liso, un marcador de los mioblastos, y la deposición en la matriz en la fibrosis renal. Se descubrió una reducción significativa de la tinción de la actina del músculo liso en regiones tanto intersticiales como glomerulares del riñón de los ratones Alport tratados con mAb 6.8G6 o 6.3G9 en comparación con los ratones tratados con 1E6.

- Las figuras 11A y 11B muestran un gráfico de puntos de la tinción de la actina del músculo liso en las regiones glomerulares e intersticiales del riñón de los ratones Alport. Se observó una tinción significativamente reducida de la actina del músculo liso en los riñones de los ratones Alport tratados con 6.8G6 y 6.3G9 comparado con los ratones tratados con 1E6 de control negativo.

#### Ejemplo 13: efectividad de los mAb anti- $\alpha_v\beta_6$ en la prevención de la nefroesclerosis inducida por obstrucción uretral unilateral

- Se utilizó otro modelo de ratón para la progresión fibrótica renal para someter a ensayo la eficacia antifibrótica de 6.8G6 y 6.3G9. En este modelo de ratón, se liga un uréter del animal, resultando en una obstrucción uretral unilateral (UUO). La UUO provoca la nefroesclerosis progresiva sin insuficiencia renal a corto plazo en los ratones debido a que el riñón no obstruido puede mantener una función renal relativamente normal. Aunque el riñón obstruido experimenta una rápida fibrosis global, el riñón no obstruido experimenta hipertrofia adaptativa.

- El presente estudio cuantificó morfométricamente el impacto del tratamiento anti- $\alpha_v\beta_6$  sobre la fibrosis renal inducida por UUO. Se utilizaron ratones C57BL macho de 8 a 12 semanas de edad sin antígenos víricos de 25,5±0,2 gramos de peso (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Se permitió que los ratones se aclimasen durante siete días antes de iniciar el estudio. Los ratones dispusieron de acceso *ad libitum* a alimento estándar irradiado para ratones y agua estéril durante los periodos de aclimatación y experimental. Se midió el peso corporal a intervalos como parte del seguimiento del estado de salud de los animales. Los resultados mostraron que los ratones no operados de

edades correspondientes ganaron aproximadamente 10% de peso corporal durante el periodo de estudio, de dos semanas. Los ratones sometidos a UUU habían perdido aproximadamente 9% de peso corporal el día 2 aunque gradualmente recuperaron el peso corporal perdido alcanzado el día 14. Este patrón de cambio del peso se produjo con independencia del tratamiento terapéutico aplicado.

- 5 Para inducir la fibrosis renal, el uréter izquierdo se aisló asépticamente mediante una laparotomía en la parte izquierda de la línea media bajo anestesia con ketamina:xilacina (100:10 mg/kg s.c.). Se llevaron a cabo dos ligaduras oclusivas fuertes con seda 6-0 en el uréter al nivel del polo inferior del riñón y se cortó el uréter entre las ligaduras. Se cerró la pared abdominal con una sutura de vicrilo 4-0 y se cerró la piel con nilón 4-0. Se dejó que los animales se recuperasen sobre una almohadilla calefactora y se les administraron 0,05 mg/kg s.c. de buprenorfina dos veces al día los días 0 y 1. El procedimiento utilizado se había adaptado de Ma *et al.*, *Kidney Int.* 53(4):937-944, 1998.

A continuación los ratones se agruparon en los grupos de estudio siguientes:

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg, i.p.)	n*
1	6.8G6 (mAb anti- $\alpha_v\beta_6$ dependiente de cationes)	4	9
2	6.3G9 (mAb anti- $\alpha_v\beta_6$ independiente de cationes)	4	8
3	1E6 (mAb de control negativo)	4	10
4	Control de vehículo de PBS	(100 $\mu$ l)	8
5	Control no operado y no tratado	--	8

\* Número de animales.

- 15 Todos los animales excepto los del grupo 5 recibieron dosis dos veces a la semana desde el día anterior a la cirugía.

A continuación, se sometió a eutanasia a los animales con dióxido de carbono el día 10 después de la ligación y se diseccionaron. En los ratones sometidos a UUU, la pelvis renal y el uréter se encontraban marcadamente inflamados y llenos de líquido en la parte anterior a la ligadura obstructora. El grado de inflamación y la masa de tejido renal remanente variaban entre grupos de tratamiento. El grupo 2 mostraba aproximadamente la mitad de la inflamación de los grupos de control negativo. Los riñones ligados presentaban un color pálido. Los riñones contralaterales eran de color rojo oscuro y agrandados en aproximadamente un tercio.

- 20

A continuación, se extirparon ambos riñones (el izquierdo ligado y el derecho no ligado) de los animales y se cortaron en mitades transversalmente a través del centro de la pelvis renal. Una mitad de cada riñón se introdujo en formalina tamponada neutra al 10% para la tinción de tejidos fijados. La otra mitad de cada riñón se introdujo en sacarosa al 15%, seguido de sacarosa al 30%, para la tinción inmunohistoquímica.

- 25

Las secciones de riñón fijadas con formalina se inmunotñeron para miofibroblastos (actina de músculo liso), un marcador de fibrosis. Se capturaron imágenes utilizando condiciones de iluminación estandarizadas y parámetros de exposición de cámara digital, corregidos para el fondo y calibrados para los estándares de distancia. Se capturaron imágenes de campos contiguos que cubrían la sección entera del riñón izquierdo de cada animal, para la cuantificación.

- 30

La actina de músculo liso se expresa como porcentaje del área total de tejido dentro de los campos medidos. Estos incluían la totalidad del tejido cortical y medular de la sección excepto la papila renal.

En conclusión, los ratones tratados con 6.3G9 y 6.8G6 mostraron una reducción significativa de la fibrosis.

- 35 **Ejemplo 14: efectividad de los mAb bloqueantes anti- $\alpha_v\beta_6$  contra la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones**

La fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones se ha establecido como un modelo *in vivo* de la fibrosis pulmonar y se ha utilizado para someter a ensayo los efectos terapéuticos de los agentes farmacológicos. La inflamación es normalmente evidente 5 a 15 días después del tratamiento de bleomicina. En ratones de la cepa 129, el grado de fibrosis pulmonar se incrementó progresivamente durante hasta 60 días después del tratamiento de bleomicina. La acumulación en la matriz habitualmente resulta detectable aproximadamente el día 15. En el presente ejemplo, se inyectó mAb 6.3G9 por vía intraperitoneal a una concentración de 4 mg/kg/dosis en ratones con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina desde el día 0 o desde el día 15, tres veces a la semana. Se indujo fibrosis pulmonar el día 0 mediante la administración de una sola dosis intratraqueal de bleomicina a una concentración de 0,03 unidades/kg en 50  $\mu$ l de solución salina estéril. Los animales se sacrificaron el día 30 y se evaluó el grado de fibrosis pulmonar. Se utilizó el anticuerpo 1E6 a modo de control negativo.

- 45

Se extirparon los pulmones de cada animal y se midió el contenido de hidroxiprolina como índice de la deposición del colágeno pulmonar, tal como se describe en Munger *et al.*, *supra*. Tal como se muestra en la figura 15A, el tratamiento con 6.3G9 iniciado el día 0 inhibió significativamente el incremento inducido por bleomicina de contenido pulmonar de hidroxiprolina. Resulta importante que el tratamiento de 6.3G9 fue por lo menos igual de efectivo en caso de iniciarse 15 días después de la administración de la bleomicina, un momento en el que ya se había iniciado la deposición del colágeno.

Se examinaron asimismo los efectos de 6.3G9, 6.8G6 dependiente de cationes y el anticuerpo no bloqueante 6.4B4 en la inhibición de grados más sustanciales de fibrosis pulmonar en un protocolo extendido de fibrosis inducida por bleomicina (de 60 días de duración). Se iniciaron así los tratamientos de anticuerpos 15 días después de la administración de la bleomicina (día 15). A continuación, se extirparon los pulmones el día 60 para determinar el contenido de hidroxiprolina. Tal como se muestra en la figura 15C, el tratamiento con 6.8G6 inhibió significativamente la fibrosis inducida por bleomicina (una reducción superior al 70% de contenido de hidroxiprolina en comparación con los animales tratados con bleomicina y solución salina). El tratamiento con 6.3G9 también mostró una tendencia hacia la protección, aunque estos resultados no alcanzaron la significancia estadística (fig. 15C).

En conclusión, los mAbs bloqueantes anti- $\alpha_v\beta_6$  tanto dependientes como independientes de cationes redujeron la fibrosis pulmonar en ratones tratados con bleomicina. Además, esta intervención resultó efectiva incluso en el caso de no iniciarse el tratamiento de anticuerpos hasta después de la aparición inicial de fibrosis.

#### **Ejemplo 15: regulación positiva de $\alpha_v\beta_6$ en las lesiones psoriáticas humanas**

Para determinar si  $\alpha_v\beta_6$  participaba en la psoriasis, se examinó la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  en biopsias de piel lesionada y no lesionada de cinco pacientes de psoriasis y de cuatro individuos normales. Utilizando la inmunotinción de mAb 6.2A1, los presentes inventores observaron un incremento significativo de la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  en las lesiones psoriáticas, en comparación con piel no lesionada de pacientes psoriáticos y con los controles normales. De esta manera, la regulación positiva de  $\alpha_v\beta_6$  en las lesiones psoriáticas sugiere que los anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_6$  podrían utilizarse tanto diagnóstica como terapéuticamente.

#### **Ejemplo 16: regulación positiva de $\alpha_v\beta_6$ en hígado de ratón y humano con enfermedad del conducto biliar**

Tal como se ha expuesto anteriormente, se ha implicado la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  en las lesiones a los tejidos. En el presente estudio, se investigó la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  en el hígado de ratón y humano lesionado por la enfermedad del conducto biliar.

Se indujo una lesión hepática en ratones mediante ligación del conducto biliar. Ver, por ejemplo, George *et al.*, PNAS 96:12719-24, 1999; George *et al.*, Am. J. Pathol. 156:115-24, 2000. Utilizando mAb 6.2G2, los presentes inventores encontraron que la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  se encontraba significativamente elevada los días 9, 14 y 16 tras la ligación del conducto biliar.

De manera similar, las secciones de hígado humano de pacientes con enfermedad del conducto biliar mostraron una expresión reglada positivamente de  $\alpha_v\beta_6$ , determinada mediante inmunohistoquímica utilizando el mAb 6.2G2. Se observó la expresión elevada de  $\alpha_v\beta_6$  en, por ejemplo, muestras de hígado de un varón de 44 años con colestasis aguda, en un varón de 59 años postransplante con obstrucción aguda del conducto biliar, en un varón de 22 años con atresia biliar y un varón de 24 años con obstrucción crónica del conducto biliar.

En resumen, los nuevos anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_6$  son herramientas diagnósticas y terapéuticas útiles para las enfermedades hepáticas.

#### **Ejemplo 17: regulación positiva de $\alpha_v\beta_6$ en diversos cánceres humanos**

La integrina  $\alpha_v\beta_6$  normalmente se expresa a niveles negligibles a bajos en los tejidos adultos sanos. Se evaluó una diversidad de tejidos tumorales humanos para la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  utilizando el anticuerpo 6.2A1 y los métodos descritos de manera general en la presente memoria. Los resultados mostraron que la expresión de la integrina  $\alpha_v\beta_6$  presentaba una regulación significativamente positiva en varios cánceres epiteliales humanos. Cabe indicar que la inmunohistología mostró que  $\alpha_v\beta_6$  se expresaba especialmente en los márgenes de los islotes tumorales en muchos de los cánceres epiteliales. Con el fin de estudiar adicionalmente la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  en las células cancerosas epiteliales, se tiñeron células Detroit 562 (carcinoma de faringe), SCC-14 (carcinoma de células escamosas de la lengua) y SW480 $\beta_6$  (*supra*) con 6.3G9 y 6.4B4 y se analizaron mediante citometría de flujo.

La parte derecha de la figura 12 muestra la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  en las diferentes líneas celulares tumorales, tal como indica la unión de 6.3G9 en la separación celular activada por fluorescencia (FACS). El pico de la línea continua representa la unión de 6.3G9, mientras que el pico de la línea discontinua representa la unión de fondo del mAb secundario solo. El gráfico de línea en la parte izquierda de la figura 12 muestra la inhibición de la unión de las líneas celulares tumorales al ligando LAP por las concentraciones crecientes de 6.3G9 o 6.4B4. El anticuerpo 6.4B4 fue un inhibidor significativamente menos potente de la unión de  $\alpha_v\beta_6$  a LAP, en comparación con 6.3G9 (IC50 más de 10 veces superior para las Detroit 562, IC50 >30 veces superior para SW480 $\beta_6$  e IC50 >100 veces superior para

SCC-14). Lo anterior resulta consistente con los resultados *in vitro* anteriores que indicaban que 6.3G9 es un mAb bloqueante potente y 6.4B4 es un mAb bloqueante débil. Estos datos también concuerdan con la actividad inhibitoria insignificante de 6.4B4 en el modelo de xenoinjerto Detroit (fig. 14B). Adicionalmente, la figura 13 muestra la inhibición relativa de la unión de las líneas celulares tumorales a LAP por parte de diversos mAb anti- $\alpha_v\beta_6$ . Tanto 6.3G9 como 6.8G6 mostraron una actividad inhibitoria equivalente (consistente con todos los datos anteriores), mientras que 6.4B4 resultó ser un inhibidor significativamente menos potente de la unión de  $\alpha_v\beta_6$  a LAP.

#### Ejemplo 18: efectos de los mAb bloqueantes anti- $\alpha_v\beta_6$ en un modelo de xenoinjerto tumoral humano

Los animales inmunodeficientes (por ejemplo ratones desnudos y ratones SCID) trasplantados con xenoinjertos tumorales humanos se han establecido como un sistema modelo *in vivo* útil para someter a ensayo los efectos terapéuticos de los agentes anticáncer (ver, por ejemplo, van Weerden *et al.*, Prostate 43(4):263-71, 2000; Bankert *et al.*, Front Biosci. 7:c44-62, 2002). De esta manera, los anticuerpos monoclonales bloqueantes anti- $\alpha_v\beta_6$  de la presente invención pueden someterse a ensayo *in vivo* en un modelo de xenoinjerto para su capacidad de inhibir el crecimiento tumoral. En el presente experimento, los presentes inventores sometieron a ensayo la capacidad de algunos de los nuevos anticuerpos de  $\alpha_v\beta_6$  para inhibir el crecimiento tumoral en ratones hembra desnudos atímicos trasplantados con xenoinjerto de cáncer faríngeo humano (línea celular Detroit 562).

Para ello, se cultivaron células Detroit 562 (ATCC) *in vitro* en medio esencial mínimo (Eagle) con L-glutamina 2 mM y BSS de Earle ajustado para contener 1,5 g/l de bicarbonato sódico, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales y piruvato sódico 1,0 mM y suero de feto bovino al 10%, sin antibióticos. Se implantaron por vía subcutánea aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/0,2 ml de medio (sin suero) en ratones desnudos en el flanco derecho. Tres a cuatro días después, se iniciaron las mediciones del tamaño tumoral y continuaron hasta que los tumores eran de aproximadamente 5 mm (longitud) x 5 mm (anchura). Se aleatorizaron los ratones y se les inyectaron por vía intraperitoneal los anticuerpos de ensayo o las soluciones de control el día 1, seguido de tres inyecciones semanales durante un periodo de 33 días. Los anticuerpos de control y las soluciones de control eran: (1) 6.3G9, 1 mg/kg, 10 ratones; (2) 6.3G9, 4 mg/kg, 10 ratones; (3) 6.3G9, 10 mg/kg, 10 ratones; (4) 6.4B4, 1 mg/kg, 10 ratones; (5) 6.4B4, 4 mg/kg, 10 ratones; (6) 6.4B4, 10 mg/kg, 10 ratones, y (7) vehículo de control (PBS), 0,2 ml/por cada ratón, 30 ratones. Además, se inyectó cisplatino en 10 ratones por vía subcutánea a razón de 2 mg/kg a modo de control quimioterapéutico. Las inyecciones de cisplatino se llevaron a cabo el día 1 y después cada 2 días durante un total de seis tratamientos. Al final del periodo de 33 días, se midieron los pesos de los animales y los tamaños tumorales, se evaluó la expresión de  $\alpha_v\beta_6$  mediante inmunohistología y se midieron los niveles séricos de anti- $\alpha_v\beta_6$ .

La tinción inmunohistológica demostró que las células tumorales implantadas expresaban fuertemente  $\alpha_v\beta_6$  *in vivo*. Los datos de pesos tumorales demostraron además que el mAb bloqueante 6.3G9 inhibió eficazmente el crecimiento tumoral a las tres concentraciones sometidas a ensayo (fig. 14A). En contraste, el mAb bloqueante débil 6.4B4 no inhibió el crecimiento tumoral (fig. 14B).

En resumen, los anticuerpos bloqueantes inhibieron el crecimiento tumoral en un 40% a 50% en los ratones tratados. En contraste, un anticuerpo bloqueante débil anti- $\alpha_v\beta_6$  no inhibió el crecimiento tumoral.

#### Ejemplo 19: internalización de los anticuerpos de $\alpha_v\beta_6$

Los anticuerpos que son internalizados por las células ofrecen una ventaja para determinadas indicaciones clínicas, tales como el cáncer, debido a que los anticuerpos pueden entonces conjugarse con toxinas, compuestos radioactivos u otros agentes anticancerígenos para reconocer selectivamente e inhibir el crecimiento de las células cancerosas. La capacidad de los anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_6$  de ser internalizados se estudió en las células SW480 $\beta_6$  (*supra*) y en las células SCC-14.

Las células se dividieron 1:5 y se sembraron en portaobjetos de vidrio con 4 cámaras para la incubación durante la noche a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se diluyeron los mAb 6.8G6, 6.1A8, 6.3G9, 7.1C5, 6.4B4, 10D5 y 8B3 hasta una concentración final de 20  $\mu$ g/ml. Se añadieron los mAb o medio solo a los pocillos correspondientes. Se siguió un curso temporal de la internalización de 0 a 48 horas. Los puntos temporales incluyeron 0, 5, 10 y 30 minutos y 1, 4, 24 y 48 horas. Se añadió un anticuerpo secundario (anti-Alexa 594 murino) a modo de control negativo. Se detuvo la internalización en cada punto temporal mediante extracción del anticuerpo y lavado de la capa celular con tampón. Se añadió aglutinina Alexa-488 de germen de trigo durante 20 minutos a 18°C para teñir el margen externo de las células con fluorescencia verde. Tras lavar las células, se añadió solución Cytofix/Cytoperm durante 20 minutos a 18°C para fijar y permeabilizar las células. Las células se lavaron nuevamente y se añadió el anticuerpo secundario anti-Alexa 594 de ratón (fluorescencia roja) durante 20 minutos a 18°C para marcar el anticuerpo de  $\alpha_v\beta_6$  murino unido o internalizado. A continuación, se lavaron las células y se fijaron mediante adición de paraformaldehído al 2% y se examinaron mediante microscopía confocal. Seguidamente se obtuvieron imágenes con un objetivo Leitz Plan-apocromático de 63x (apertura numérica de 1,32, inmersión en aceite) (Leica) con un zoom digital 2x. Cada instantánea representa una única sección óptica de la sección media de las células observada para la internalización bajo todas las condiciones. No se observó tinción en el núcleo.

Se observó la internalización para las mAb dependientes de cationes (miméticos de ligandos que contienen RGD), tales como 6.8G6 y 6.1A8. No se observó internalización para los mAb independientes de cationes, tales como 6.3G9, 7.1C5 y 6.4B4.

## REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, que:
  - (a) se une específicamente a  $\alpha_v\beta_6$  y no a otras integrinas  $\alpha_v$ ,
  - (b) inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  al péptido asociado a latencia (LAP) con un valor de IC50 inferior al del anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  10D5 en un tampón que comprende los cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ; y
  - (c) compite con el anticuerpo producido por el hibridoma 6.8G6 que presenta el número de acceso de la ATCC PTA-3645 para la unión a  $\alpha_v\beta_6$  biotinilado en un tampón que comprende los cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .
2. Anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende:
  - a) las mismas secuencias polipeptídicas de cadenas pesadas y ligeras que un anticuerpo producido por el hibridoma 6.1A8 de número de acceso de la ATCC PTA-3647; o
  - b) las mismas secuencias polipeptídicas de cadenas pesadas y ligeras que un anticuerpo producido por el hibridoma 6.3G9 de número de acceso de la ATCC PTA-3649; o
  - c) las mismas secuencias polipeptídicas de cadenas pesadas y ligeras que un anticuerpo producido por el hibridoma 6.8G6 de número de acceso de la ATCC PTA-3645; o
  - d) las mismas secuencias polipeptídicas de cadenas pesadas y ligeras que un anticuerpo producido por el hibridoma 6.2B1 de número de acceso de la ATCC PTA-3646; o
  - e) las mismas secuencias polipeptídicas de cadenas pesadas y ligeras que un anticuerpo producido por el hibridoma 7.1G10 de número de acceso de la ATCC PTA-3898; o
  - f) las mismas secuencias polipeptídicas de cadenas pesadas y ligeras que un anticuerpo producido por el hibridoma 7.7G5 de número de acceso de la ATCC PTA-3899; o
  - g) las mismas secuencias polipeptídicas de cadenas pesadas y ligeras que un anticuerpo producido por el hibridoma 7.1C5 de número de acceso de la ATCC PTA-3900.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que la unión entre el anticuerpo y  $\alpha_v\beta_6$  es independiente de cationes divalentes.
4. Anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  según la reivindicación 1, comprendiendo dicho anticuerpo una secuencia de dominio variable de cadena pesada de cualquiera de entre SEC ID nº 19 a nº 24, SEC ID nº 34, SEC ID nº 35 o SEC ID nº 36, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a  $\alpha_v\beta_6$  y no a otras integrinas  $\alpha_v$  o a integrinas no específicas, e inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  al péptido asociado a latencia (LAP) con un valor de IC50 inferior al del anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  10D5.
5. Anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  según la reivindicación 1, comprendiendo dicho anticuerpo una secuencia de aminoácidos de cualquiera de entre SEC ID nº 19 a nº 24, nº 34 a nº 38, nº 40, nº 41, nº 43 a nº 45, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a  $\alpha_v\beta_6$  y no a otras integrinas  $\alpha_v$  o integrinas no específicas, e inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  al péptido asociado a latencia (LAP) con un valor de IC50 inferior al del anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  10D5.
6. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende las regiones determinantes de complementariedad 1, 2 y 3 de cadena pesada y las regiones determinantes de complementariedad 1, 2 y 3 de cadena ligera, en el que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 de cadena pesada comprenden las secuencias SEC ID nº 3, nº 6 y nº 9, respectivamente, y en el que las CDR de cadena ligera comprenden las secuencias SEC ID nº 12, nº 14 y nº 18, respectivamente, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a  $\alpha_v\beta_6$  y no a otras integrinas  $\alpha_v$  o integrinas no específicas, e inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  al péptido asociado a latencia (LAP) con un valor de IC50 inferior al del anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  10D5.
7. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo se une a  $\alpha_v\beta_6$  soluble pero no se une a la subunidad  $\beta_6$ .
8. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo evita la activación de TGF- $\beta$ .
9. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende las regiones determinantes de complementariedad 1, 2 y 3 de cadena pesada y las regiones determinantes de complementariedad 1, 2 y 3 de cadena ligera, en el que dicho anticuerpo compite con 6.8G6 de número de acceso de la ATCC PTA-3645 para la unión a  $\alpha_v\beta_6$  y contiene un motivo FXY en CDR3 de la cadena pesada, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a  $\alpha_v\beta_6$  y no a otras integrinas  $\alpha_v$  o integrinas no específicas, e inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  al péptido asociado a latencia (LAP) con un valor de IC50 inferior al del anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  10D5.



10. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo contiene una mutación en un residuo aminoácido que es un sitio de glucosilación, de manera que se elimina el sitio de glucosilación.
11. Anticuerpo según la reivindicación 1, producido mediante el hibridoma seleccionado de entre el grupo constituido por 6.1A8 de número de acceso de la ATCC PTA-3647; 6.3G9 de número de acceso de la ATCC PTA-3649; 6.8G6 de número de acceso de la ATCC PTA-3645; 6.2B1 de número de acceso de la ATCC PTA-3646; 7.1G10 de número de acceso de la ATCC PTA-3898; 7.7G5 de número de acceso de la ATCC PTA-3899; 7.1C5 de número de acceso de la ATCC PTA-3900; o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo producido por dicho hibridoma.
12. Anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  según la reivindicación 1, que se une específicamente a  $\alpha_v\beta_6$  y no a otras integrinas  $\alpha_v$  o integrinas no específicas e inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  al péptido asociado a latencia (LAP) con un valor de IC50 inferior al del anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  10D5 seleccionado de entre el grupo constituido por un anticuerpo:
- a) cuyas regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 de cadena pesada comprenden las secuencias SEC ID nº 1, nº 4 y nº 7, respectivamente, y cuyas CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera comprenden las secuencias SEC ID nº 10, nº 13 y nº 15, respectivamente;
  - b) cuyas regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 de cadena pesada comprenden las secuencias SEC ID nº 3, nº 5 y nº 8, respectivamente, y cuyas CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera comprenden las secuencias SEC ID nº 11, nº 14 y nº 17, respectivamente;
  - c) cuyas regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 de cadena pesada comprenden las secuencias SEC ID nº 3, nº 6 y nº 9, respectivamente, y cuyas CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera comprenden las secuencias SEC ID nº 12, nº 14 y nº 18, respectivamente;
  - d) cuyas regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 de cadena pesada comprenden las secuencias SEC ID nº 2, nº 46 y nº 47, respectivamente, y cuyas CDR 1, 2 y 3 de cadena ligera comprenden las secuencias SEC ID nº 48, nº 13 y nº 16, respectivamente.
13. Anticuerpo según la reivindicación 12, en el que dicho anticuerpo contiene una mutación en un residuo aminoácido que es un sitio de glucosilación, de manera que el sitio de glucosilación resulta eliminado.
14. Anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, seleccionado de entre el grupo constituido por un anticuerpo que comprende:
- a) una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID nº 19 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 37;
  - b) una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID nº 20 o nº 21 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 38;
  - c) una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID nº 22 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 43;
  - d) una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID nº 23 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 44;
  - e) una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID nº 24 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 45;
  - f) una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID nº 34 o nº 35 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 40;
  - g) una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID nº 36 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 41.
15. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 que (a) se une específicamente a  $\alpha_v\beta_6$ , y (b) inhibe la unión de  $\alpha_v\beta_6$  al péptido asociado a latencia (LAP) con un valor de IC50 inferior al del anticuerpo 10D5, en el que el anticuerpo es producido por el hibridoma 6.3G9, depositado con el número de acceso de la ATCC PTA-3649 o el hibridoma 6.8G6, depositado con el número de acceso de la ATCC PTA 3645.
16. Anticuerpo según la reivindicación 15, en el que la unión entre el anticuerpo y  $\alpha_v\beta_6$  es dependiente de cationes divalentes.
17. Anticuerpo según la reivindicación 16, en el que el catión divalentes es  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ .
18. Anticuerpo según la reivindicación 15, en el que la unión entre el anticuerpo y  $\alpha_v\beta_6$  es independiente de cationes divalentes.
19. Anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  según la reivindicación 1, comprendiendo dicho anticuerpo una secuencia de dominio

variable de cadena pesada de SEC ID nº 20 o nº 21 y una secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 38.

20. Anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_6$  según la reivindicación 1, que comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID nº 24 y una secuencia de dominio variable de cadena ligera de SEC ID nº 45.

5 21. Composición para prevenir o tratar una enfermedad mediada por  $\alpha_v\beta_6$  en un mamífero, en la que la enfermedad es fibrosis, psoriasis, esclerosis, cáncer, lesión aguda pulmonar, lesión renal, lesión hepática o síndrome de Alport, que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la reivindicación 6 y las reivindicaciones 8 a 20, y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 22. Composición según la reivindicación 21, en la que el anticuerpo se encuentra conjugado con un agente citotóxico.

23. Composición según la reivindicación 21, en la que el anticuerpo es dependiente de cationes divalentes.

15 24. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un sujeto que presenta, o en riesgo de presentar, una enfermedad mediada por  $\alpha_v\beta_6$ , en la que la enfermedad es fibrosis, psoriasis, esclerosis, cáncer, lesión aguda pulmonar, lesión renal, lesión hepática o síndrome de Alport.

25. Utilización según la reivindicación 24, en la que el sujeto es un ser humano.

26. Utilización según la reivindicación 24 o 25, en la que la fibrosis es esclerodermia, cicatrización, fibrosis hepática, fibrosis renal o fibrosis pulmonar.

20 27. Utilización según la reivindicación 24 o 25, en la que el cáncer es cáncer epitelial, oral, de piel, cervical, ovárico, faríngeo, esofágico, de cabeza y cuello, prostático, de colon, pancreático, laríngeo, pulmonar, mamario, renal o colorrectal.

28. Método *in vitro* de detección de  $\alpha_v\beta_6$  en una muestra de tejido de un mamífero, que comprende poner en contacto la muestra de tejido con el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

25 29. Células seleccionada de entre el grupo constituido por una célula del hibridoma 6.1A8, de número de acceso de la ATCC PTA-3647; una célula del hibridoma 6.3G9, de número de acceso de la ATCC PTA-3649; una célula del hibridoma 6.8G6, de número de acceso de la ATCC PTA-3645; una célula del hibridoma 6.2B1, de número de acceso de la ATCC PTA-3646; una célula del hibridoma 7.1G10, de número de acceso de la ATCC PTA-3898; una célula del hibridoma 7.7G5, de número de acceso de la ATCC PTA-3899; y una célula del hibridoma 7.1C5, de número de acceso de la ATCC PTA-3900.

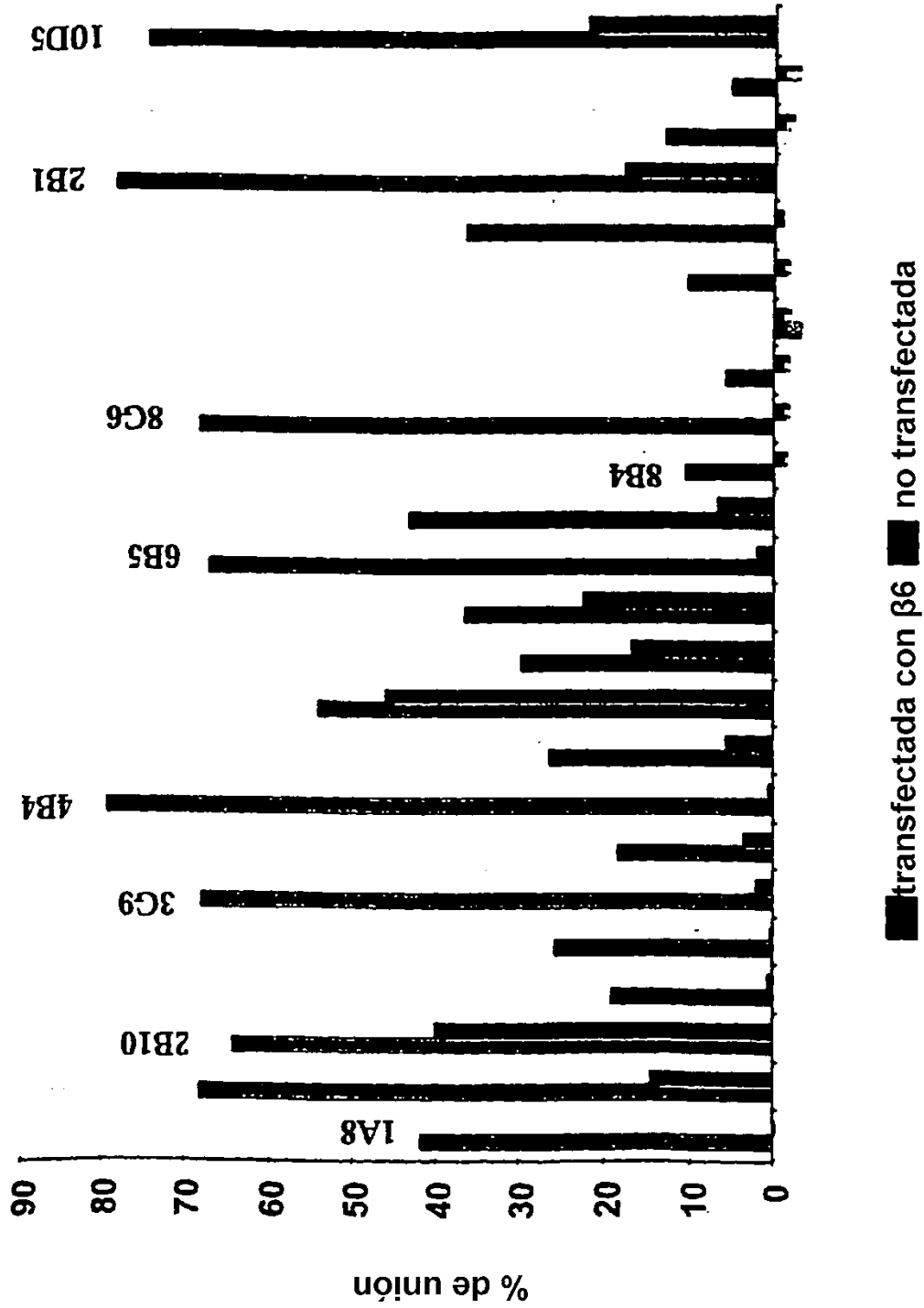


FIG. 1A

Unión de fusión de mAb  
a las células

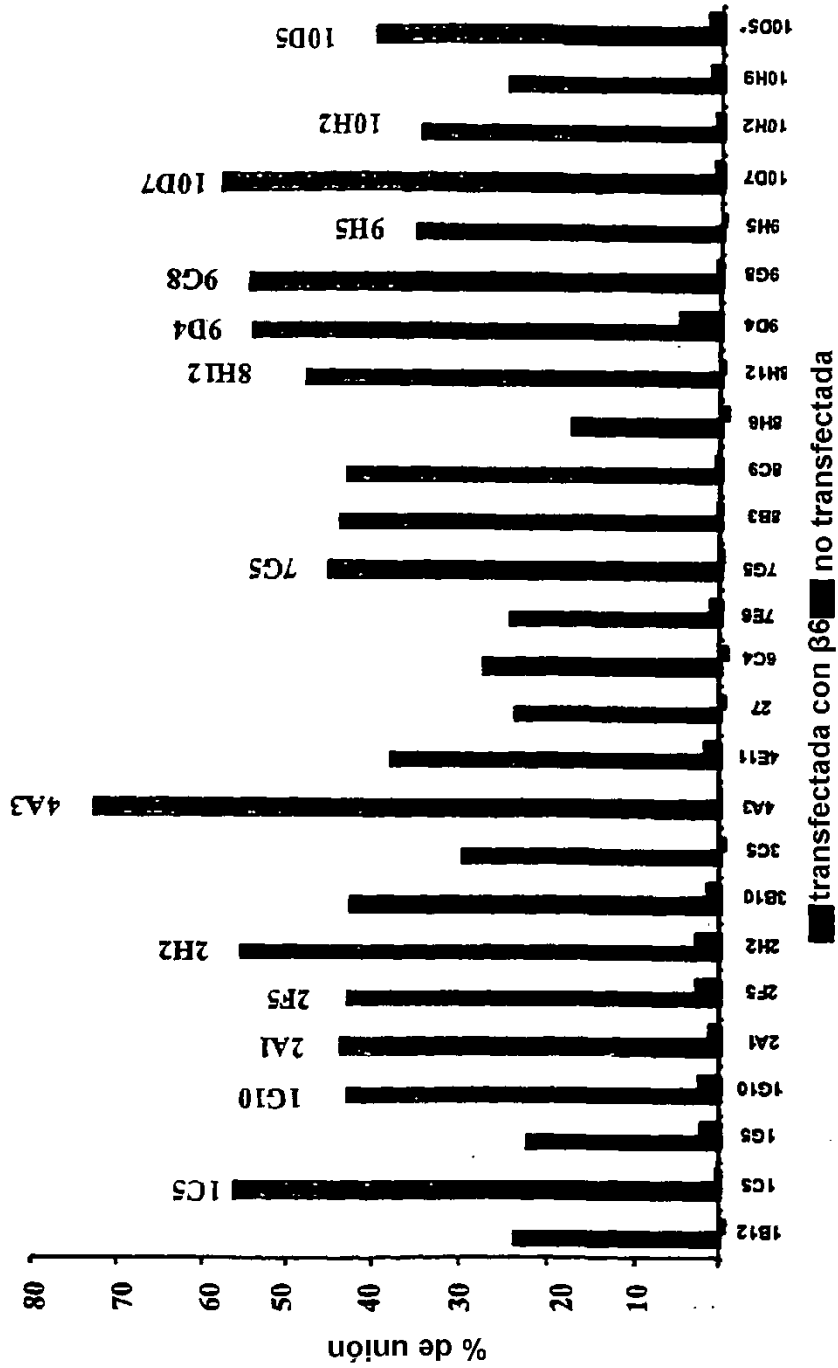


FIG. 1B

Afinidad de unión para  $\alpha\beta 6$  (ELISA) - mAbs Fusión n° 6

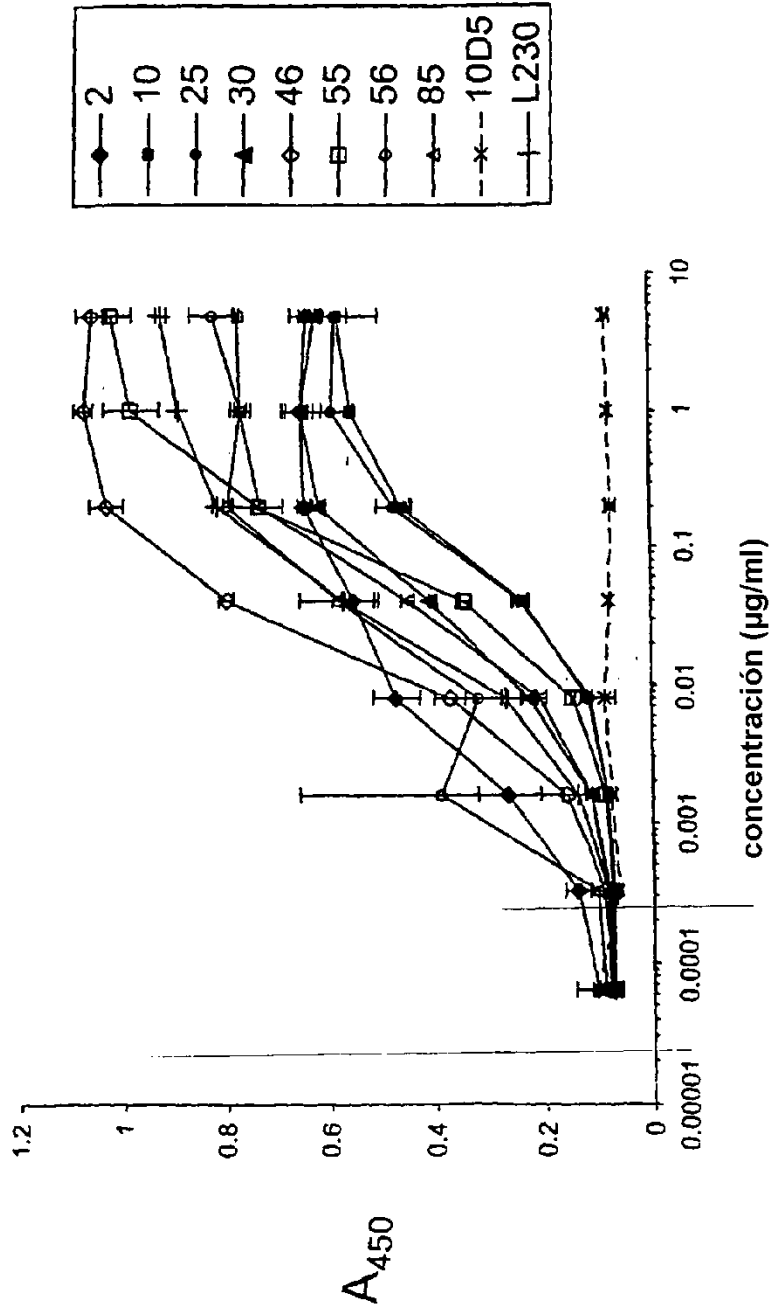


FIG. 2A

Afinidad de unión para  $\alpha\beta 6$  (ELISA) - mAbs Fusión n° 6

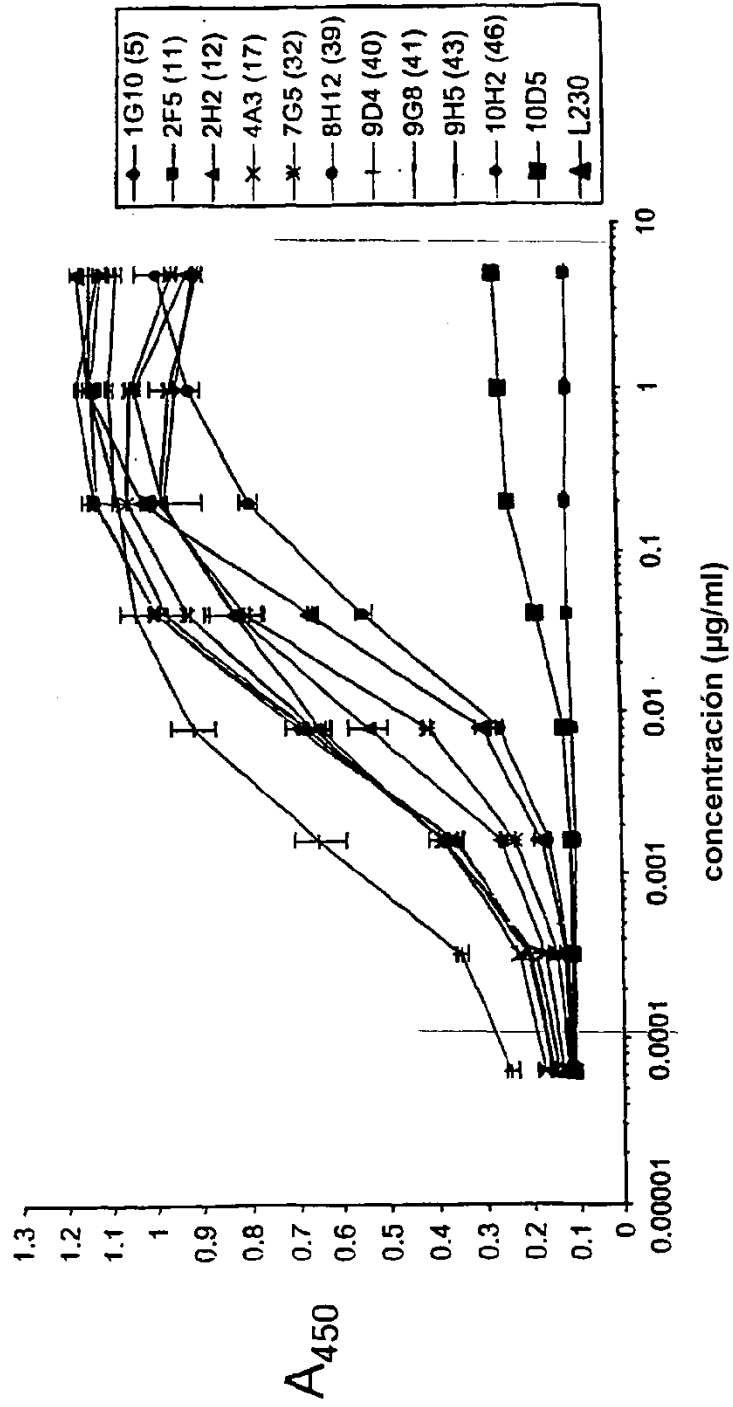


FIG. 2B

FIGS. 3 A-F

Dependencia de cationes de la unión a  $\alpha\beta 6$  soluble

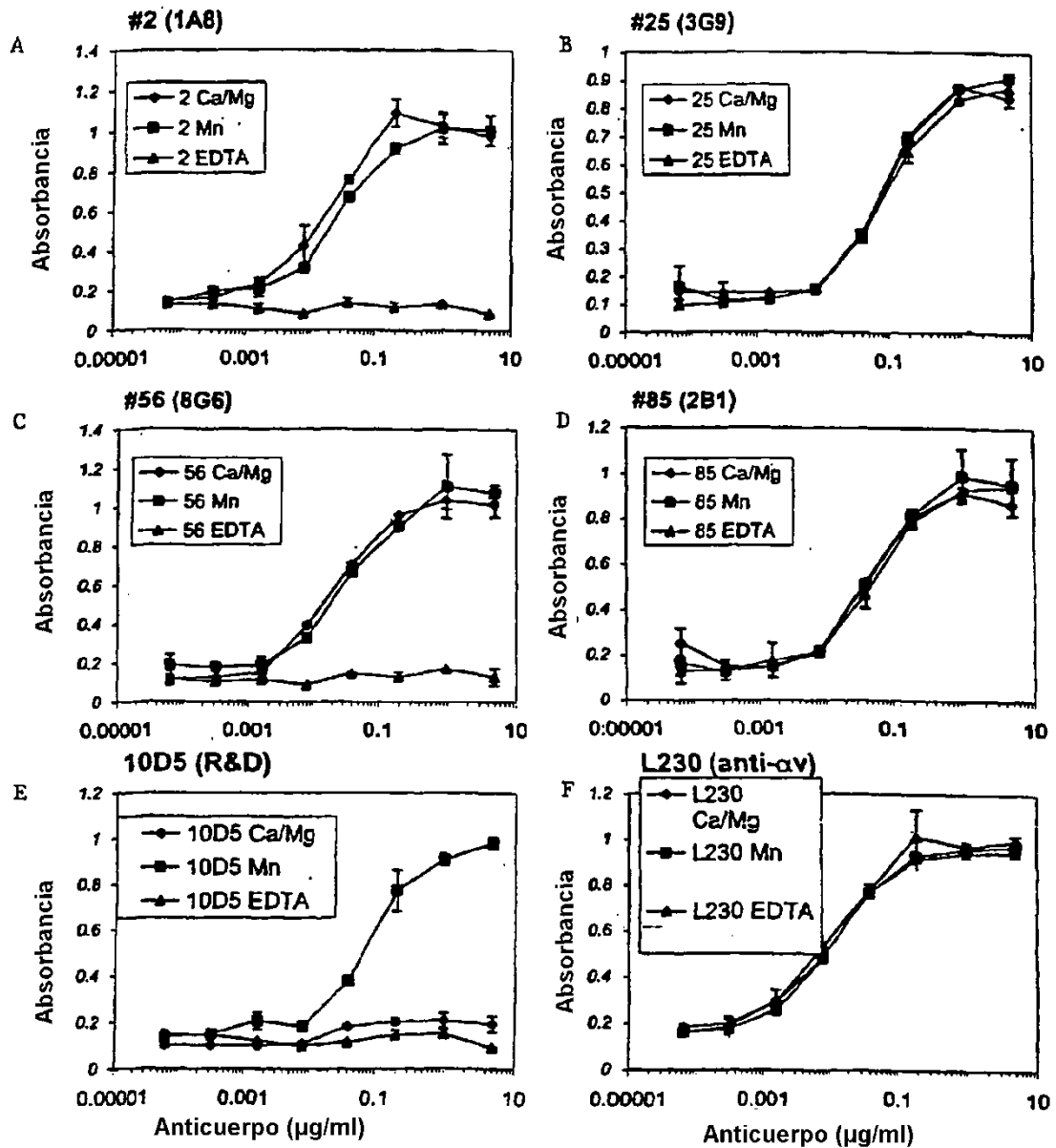
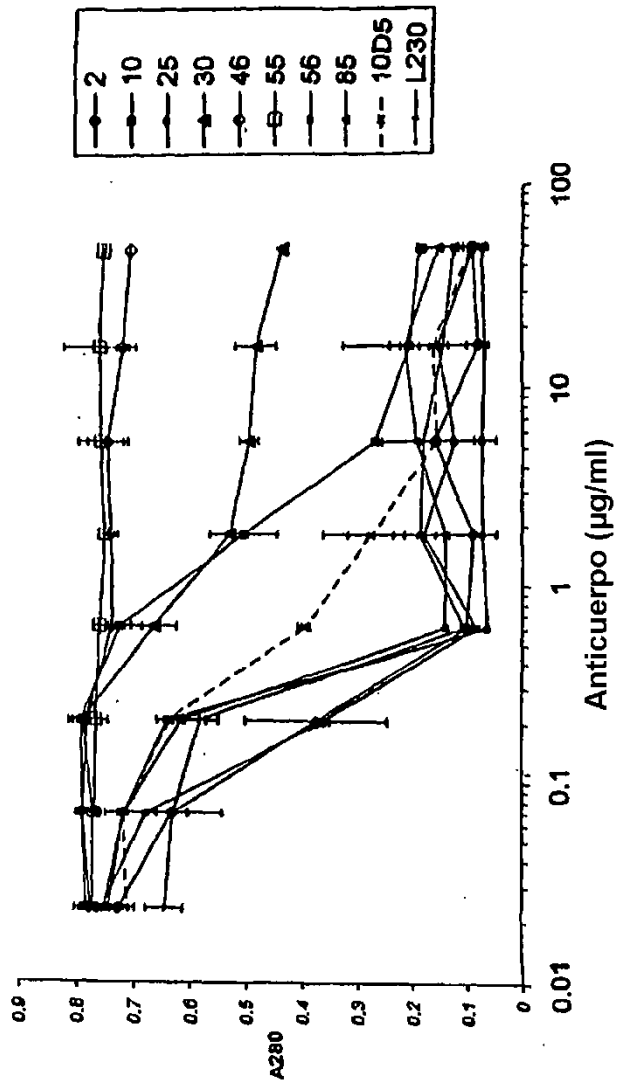


FIG. 4A





Inhibición de los mAb biotina- $\alpha\beta$ 6/LAP, Fusión n° 7

Caracterización del bloqueo de Fusión n° 7 (5  $\mu\text{g/ml}$ )

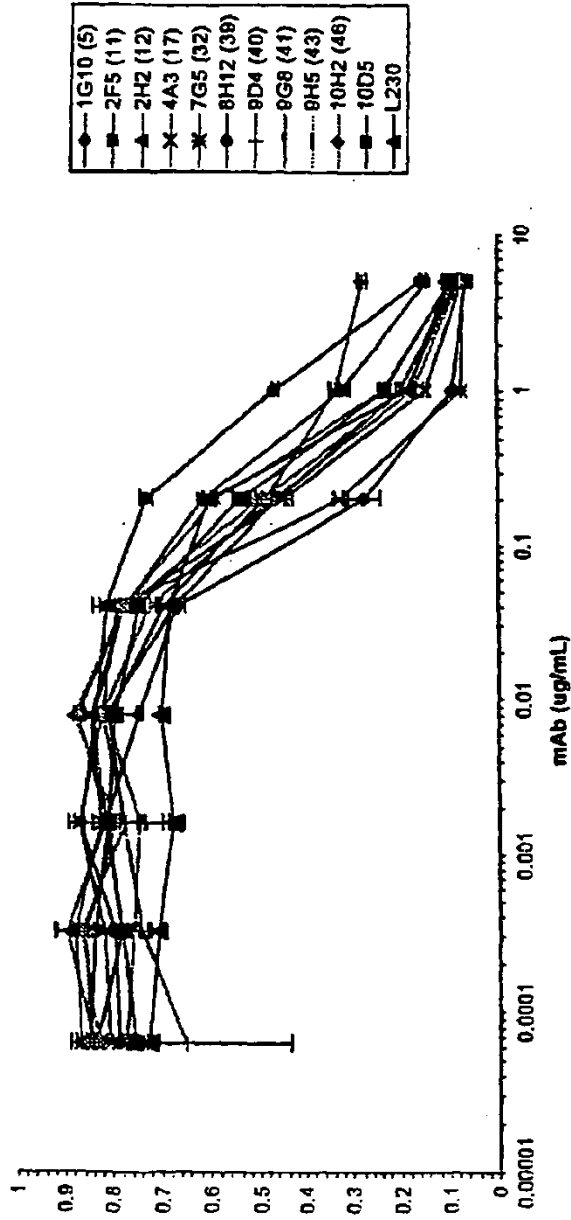


FIG. 4B

Adhesión de  $\beta 6$ (FDC-P1) a LAP - mAb Fusión nº 6

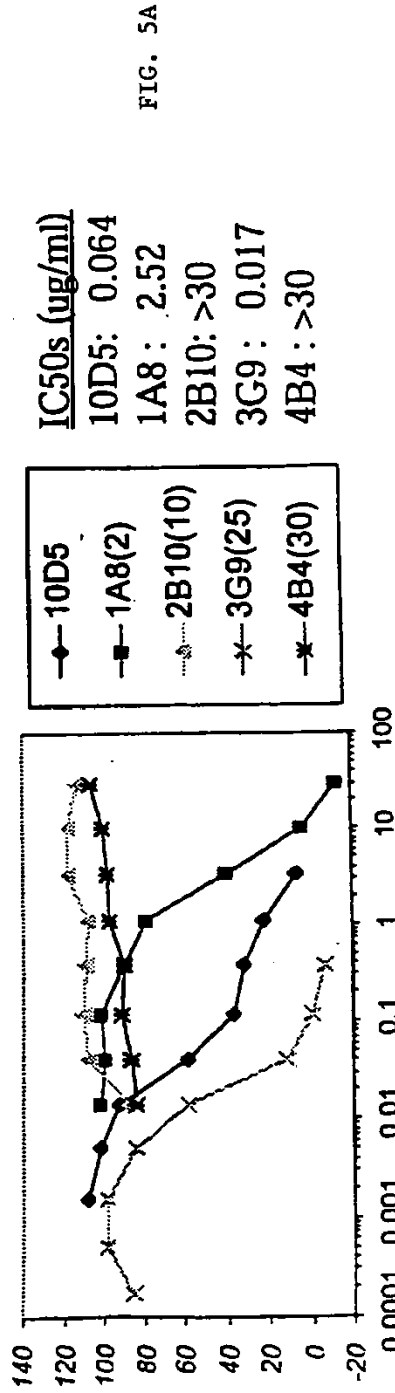


FIG. 5A

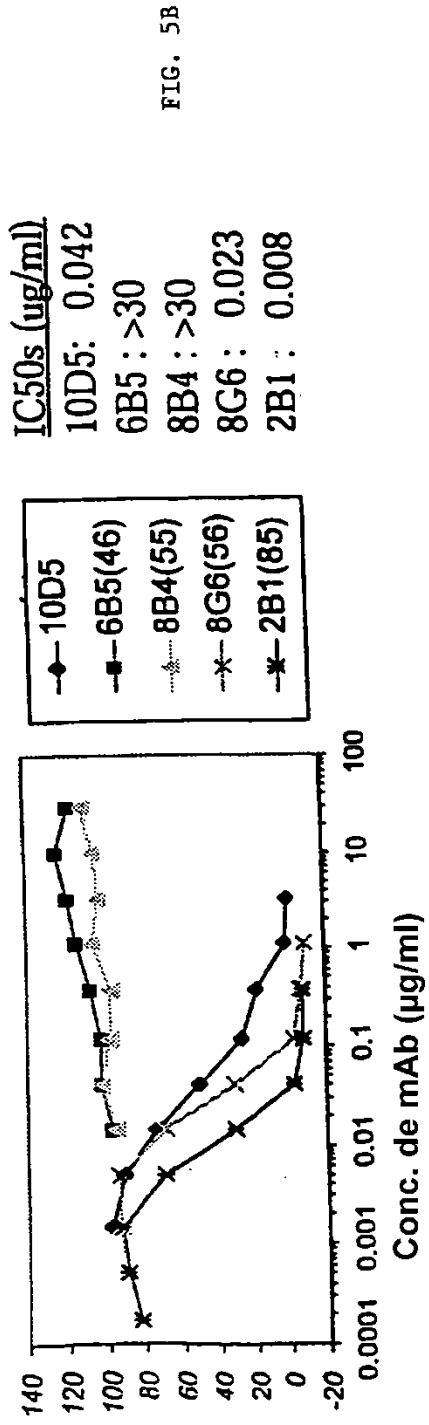
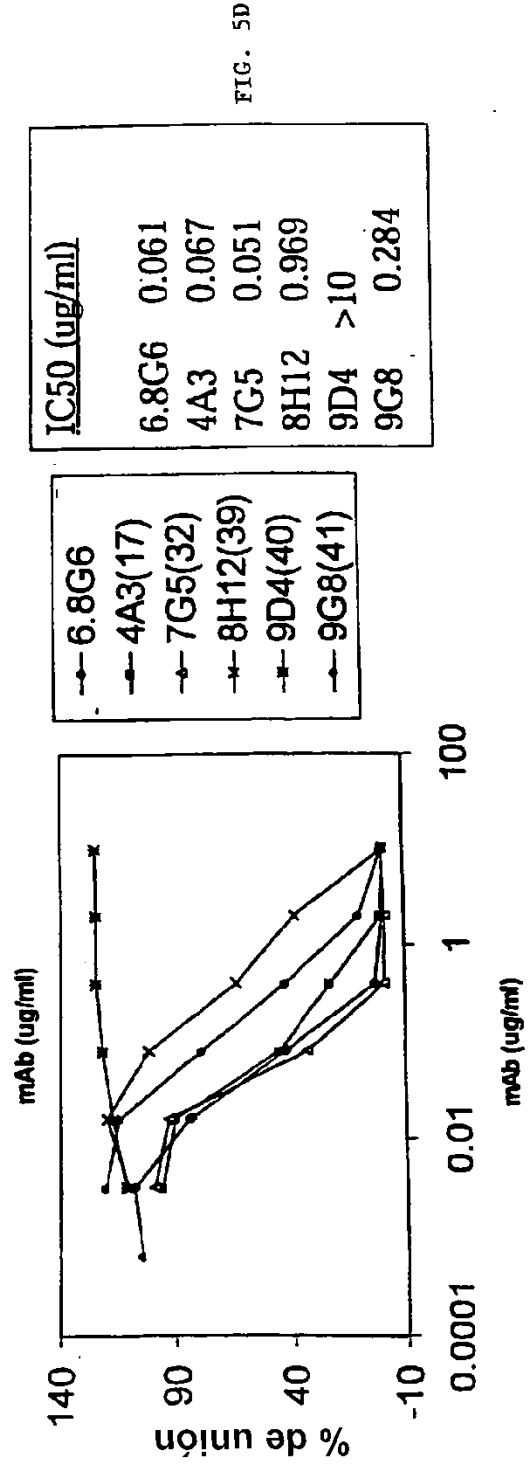
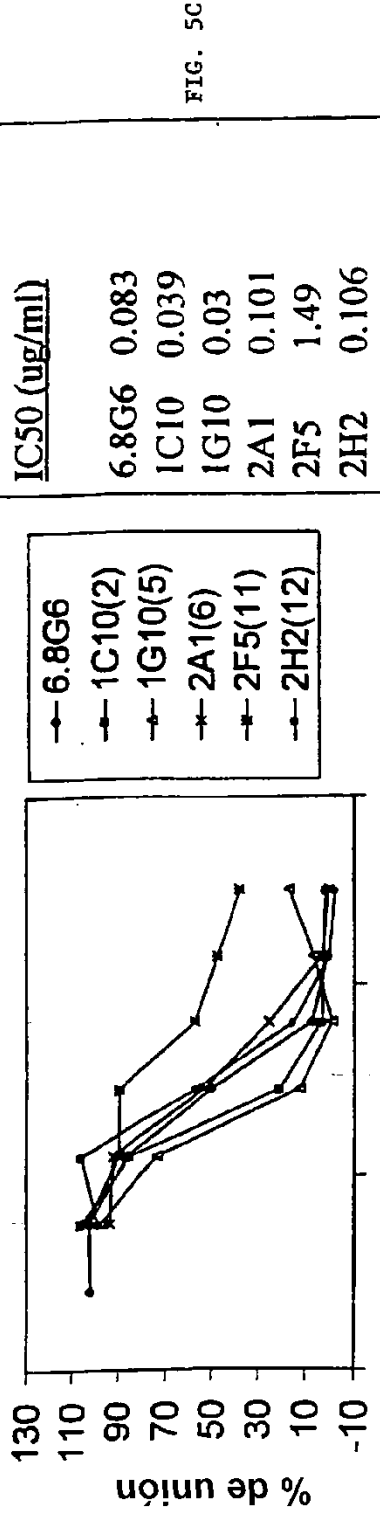
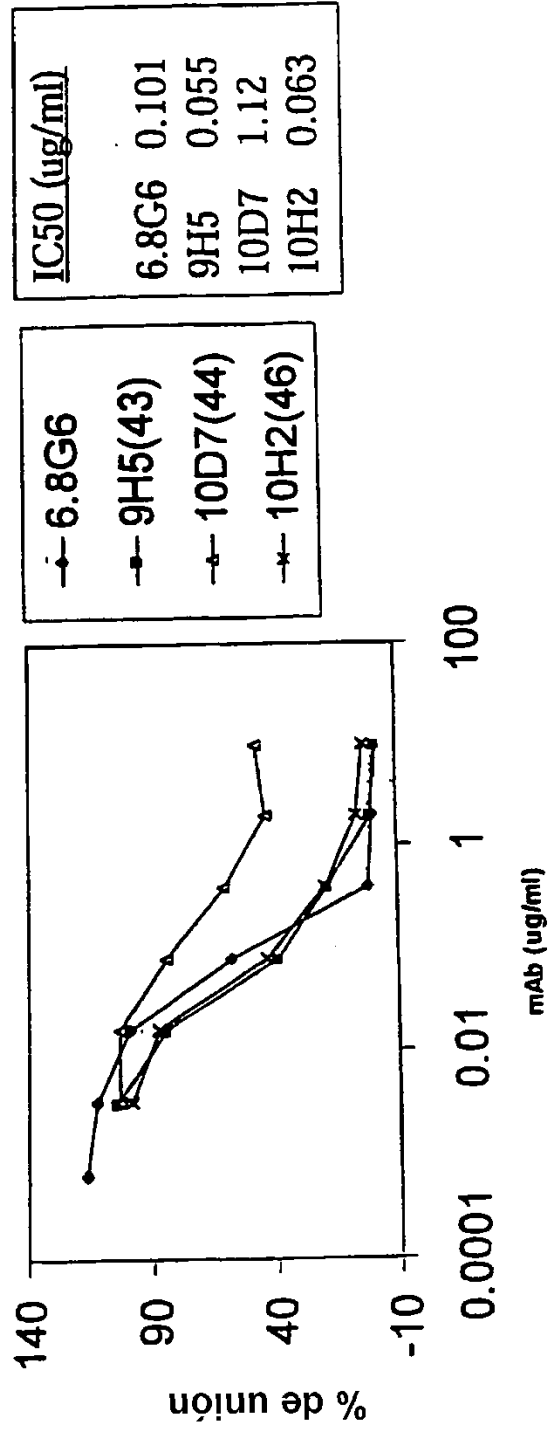


FIG. 5B

Adhesión de  $\beta 6$ (FDC-P1) a LAP - mAb Fusión n° 7



Adhesión de  $\beta 6$ (FDC-P1) a LAP - mAb Fusión n° 7

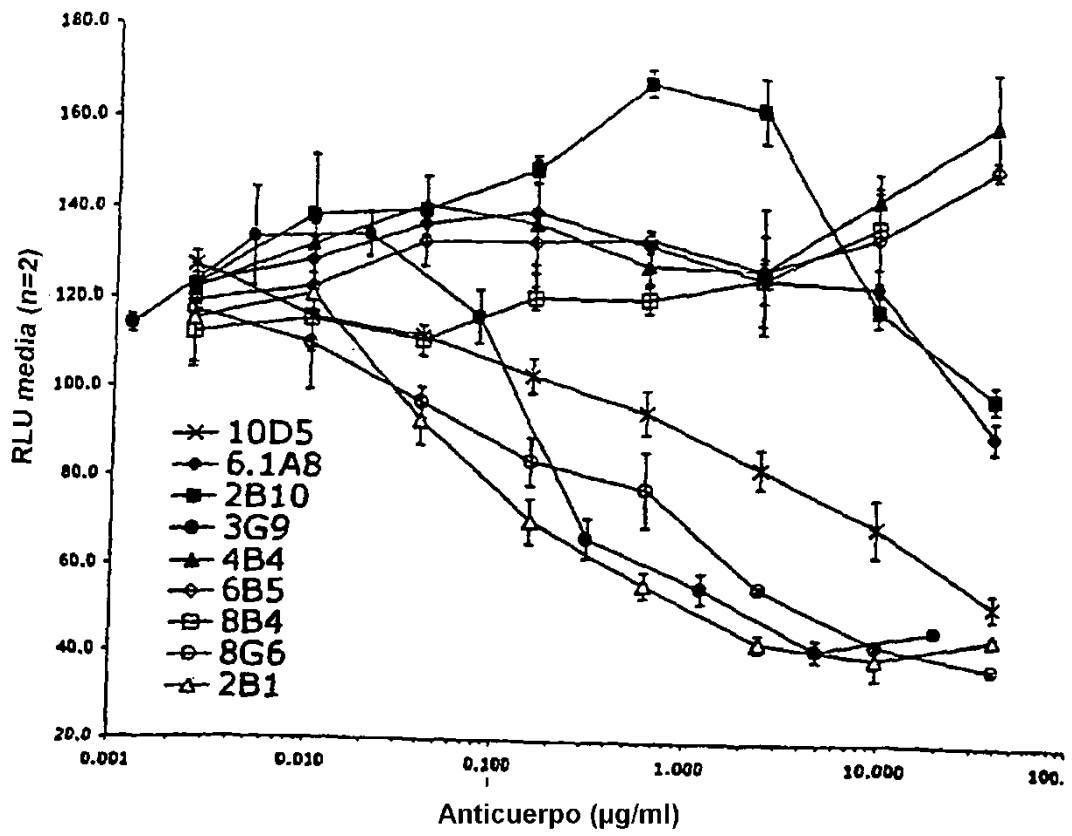


IC50 (ug/ml)	
6.8G6	0.101
9H5	0.055
10D7	1.12
10H2	0.063

6.8G6
9H5(43)
10D7(44)
10H2(46)

FIG. 5E

FIG. 6A



**Inhibición de la activación de TGFβ por los mAbs de αvβ6  
Fusión nº 7 (ensayo de cocultivo de PAL-1-luciferasa)**

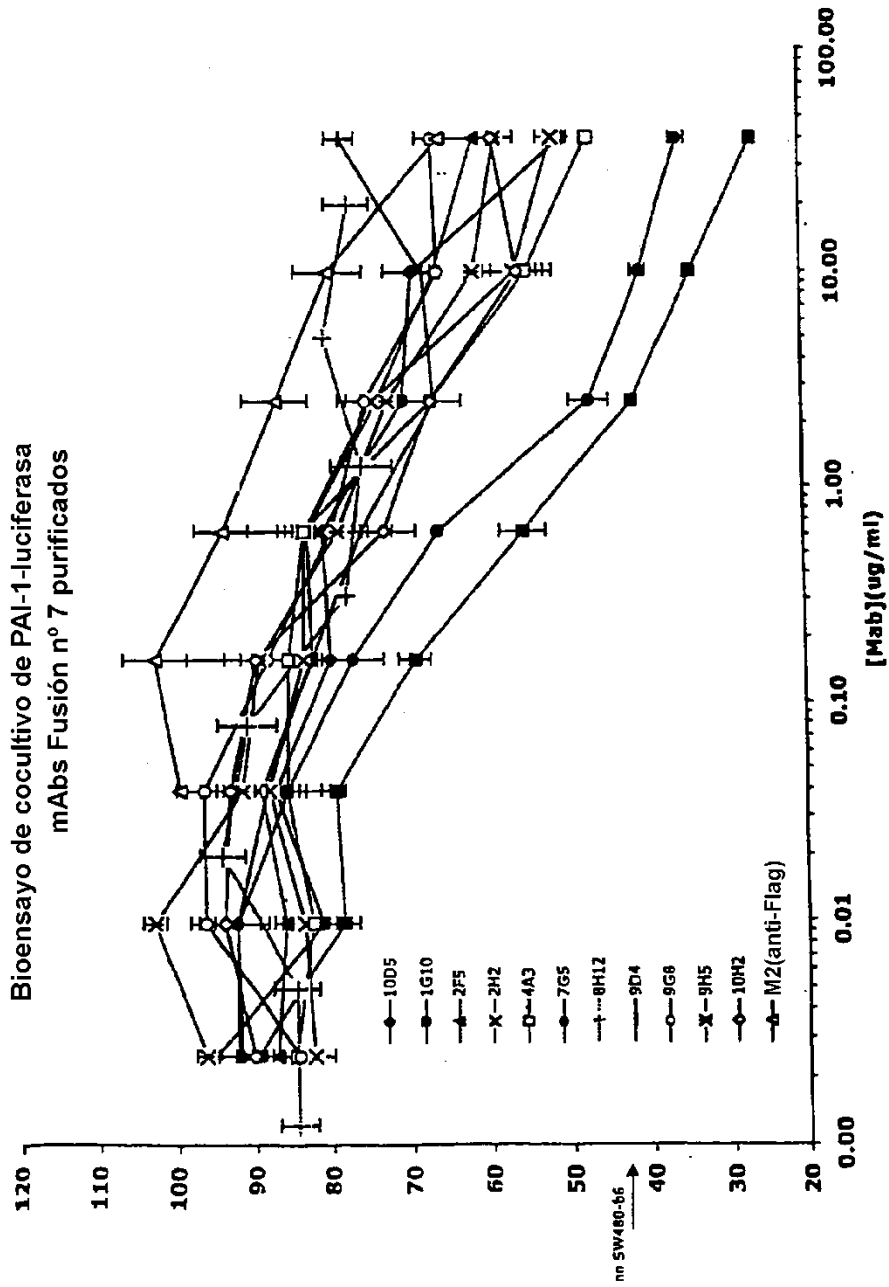


FIG. 6B



6.1A8	(1)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS	CRASQSVSIST - YSYI	HWFOQKPGQPPKGLIKYASN	ESGVPARFSGSGGTDFTLNHPVEEDTAIYYC
6.8G6	(1)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS	CRASQSVSTSS - YSYI	MYWYQKPGQSPKFLIKYASN	ESGVPARFSGSGGTDFTLNHPVEEDTAIYYC
6.4B4	(1)	DVMTQTPRSLPVSILGDOASMS	CRSSQLKHSNGDTY	LHWYLQKPGQSPNLIIYKVSNR	ESGVDRFSGSGGTEFTFKISRVEAEDLGVYFC
6.2A1	(1)	DIVMTQSHKFMSTVVGDRVSTIC	KASLDVR - - - -	TAWAYQKPGQSPKLIYASAY	YTGVPDRFTGSGGTDFTFNIRSVOAEDLAVYYC
6.2G2	(1)	DIVMTQSHKFMSTVVGDRVSTIC	KASQAVN - - - -	TAWAYQKPGQSPKLIYASAY	YTGVPDRFTGSGGTDFTLNHPVEEDTAIYYC
7.1C5	(1)	DIQMTQSPSSLSASLGERVNLTC	RASQEIISG - - - -	YLSWLQKPGDGTIKRLIYAAST	DSGVPKRFSGSRSGSDYSLTSSLESEDFGDIYYC
7.1G10	(1)	DIQMTQSPSSLSASLGERVNLTC	RASQEIISG - - - -	YLSWLQKPGDGTIKRLIYAAST	DSGVPKRFSGSRSGSDYSLTSSLESEDFGDIYYC
6.2B10	(1)	QIVLTQSPAIMSASPEKVTMTIC	SASSSVS - - - -	YMHWYQKSGTSPRRWIYDTSK	ASGVPARFSGSGGTSYSLTSSMEAVDAATYYC
7.7G5	(1)	QIVLTQSPAIMSASPEKVTMTIC	SASSSVS - - - -	YMHWYQKSGTSPRRWIYDTSK	ASGVPARFSGSGGTSYSLTSSMEAVDAATYYC
6.2B1	(1)	QIVLTQSPAIMSASPEKVTMTIC	SASSSVSS - - - -	YLYWYQKPGSSPKLIYIYSTSN	ASRVPARFSGSGGTSYSLTSSMEAEADAASYFC
6.3G9	(1)	QIVLTQSPAIMSASPEKVTMTIC	SANSVSS - - - -	YLYWYQKSGSSPKLIYIYSTSN	ASGVVPRFSGSGGTSYSLTSSMEAEADAASYFC
6.1A8	(93)	QHSWEIPTYT	FGGGTKVEIK		SEC ID n° : 37
6.8G6	(93)	QHNWEIPFT	FGGGTKLEIK		SEC ID n° : 38
6.4B4	(94)	SQSTHVPTYT	FGGTRLEIK		SEC ID n° : 39
6.2A1	(89)	QHHYGIPWT	FGGGTKLEIK		SEC ID n° : 63
6.2G2	(89)	QHHYGVPWT	FGGGTKLEIK		SEC ID n° : 64
7.1C5	(89)	LQYASYPTYT	FGGAKLEIK		SEC ID n° : 40
7.1G10	(89)	LQYATYPTYT	FGGGTKLEIK		SEC ID n° : 41
6.2B10	(88)	QQWTSNPF	FGSGTKLGIK		SEC ID n° : 42
7.7G5	(88)	QQWSSHPP	FGAGTKLELK		SEC ID n° : 43
6.2B1	(90)	HQWSSYPPT	FGGGTKLEIK		SEC ID n° : 44
6.3G9	(90)	HOWSTYPP	FGGGTKLEIK		SEC ID n° : 45

FIG. 7B



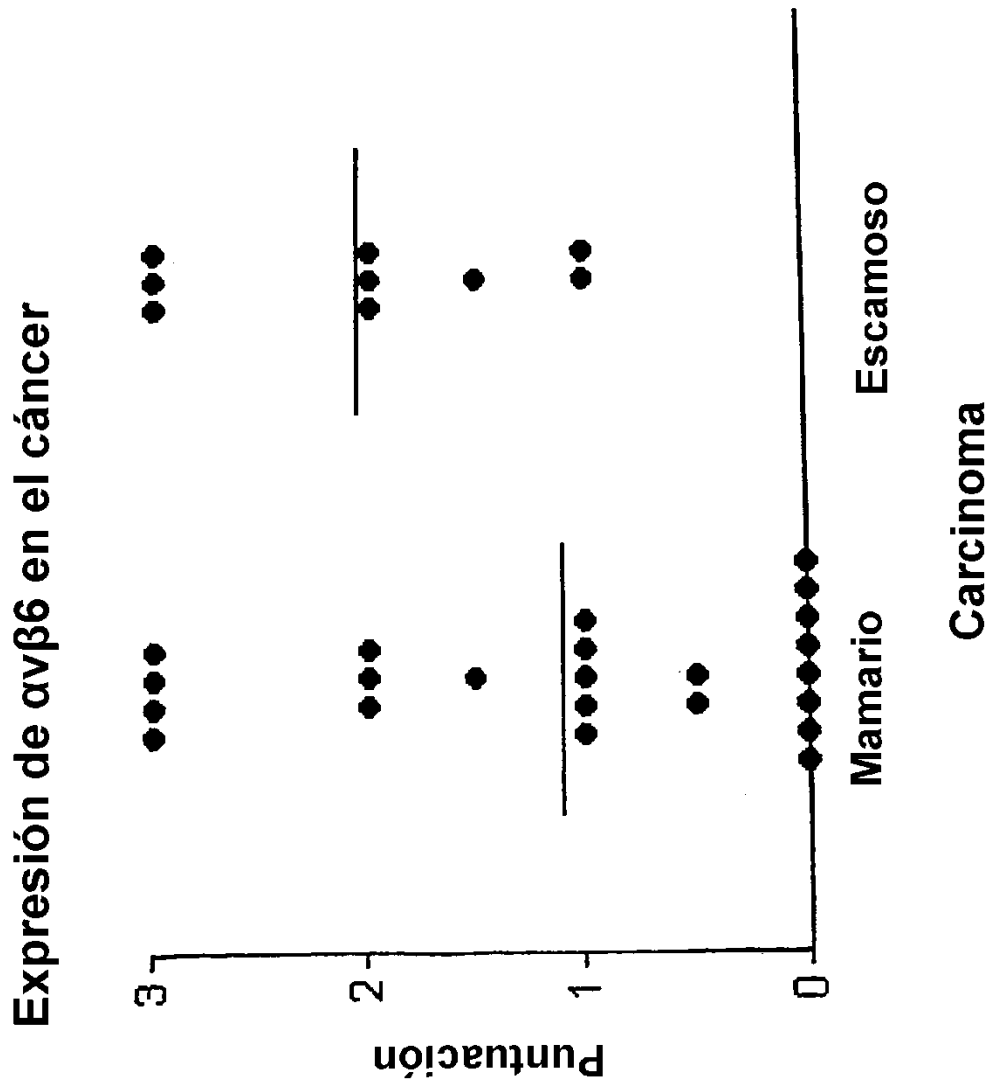
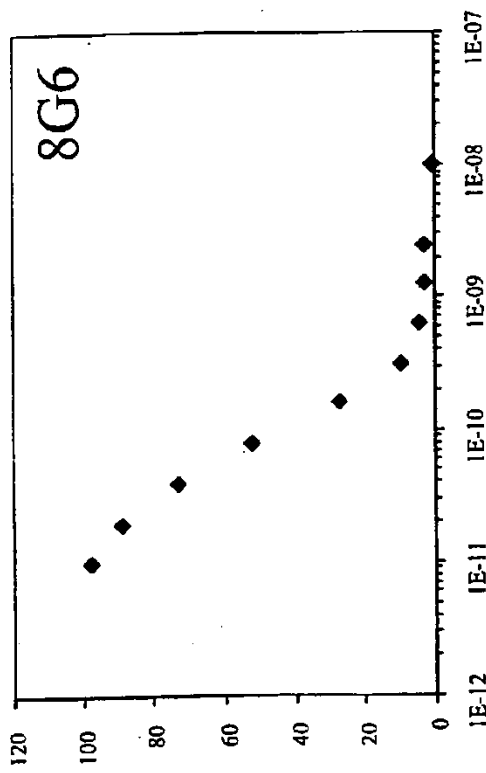


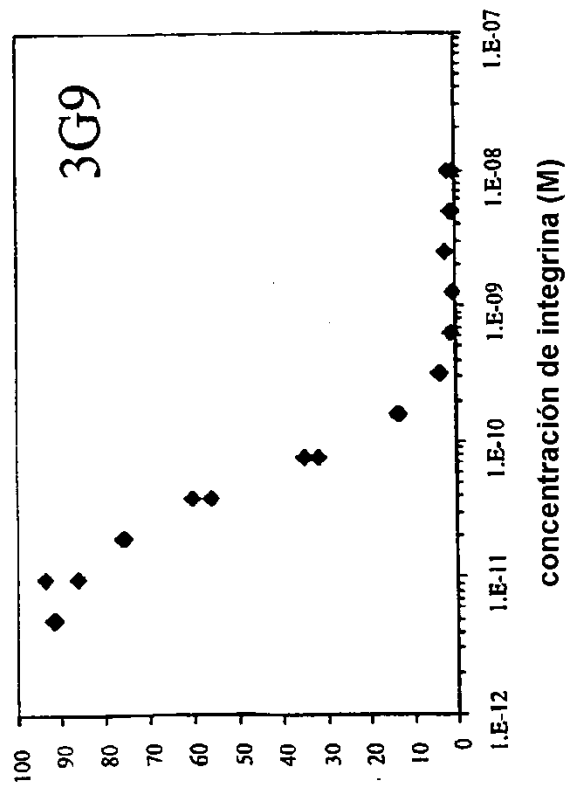
FIG. 8

FIG. 9A



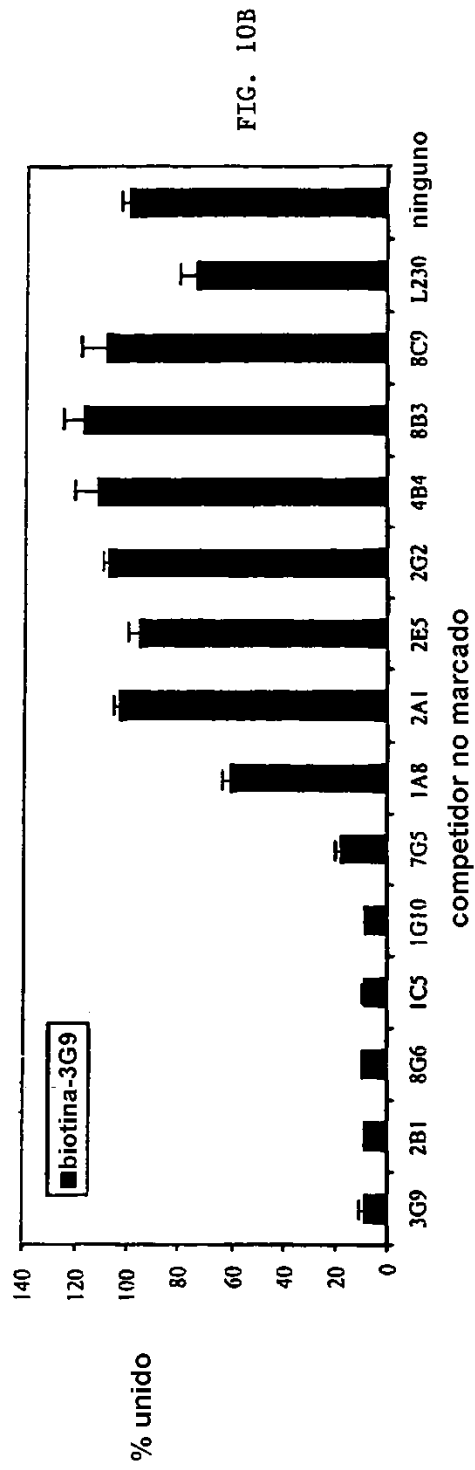
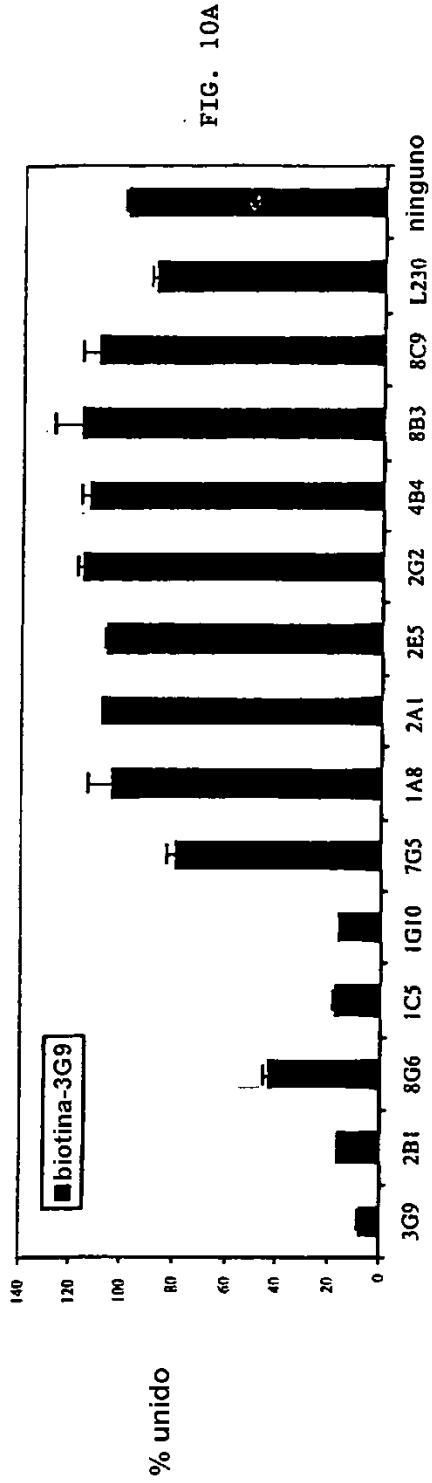
% anticuerpo libre

FIG. 9B



% anticuerpo libre

concentración de integrina (M)



**Efecto de los mAb de  $\alpha\beta6$  sobre la tinción de la actina de músculo liso (SMA) en animales sometidos a UUO**

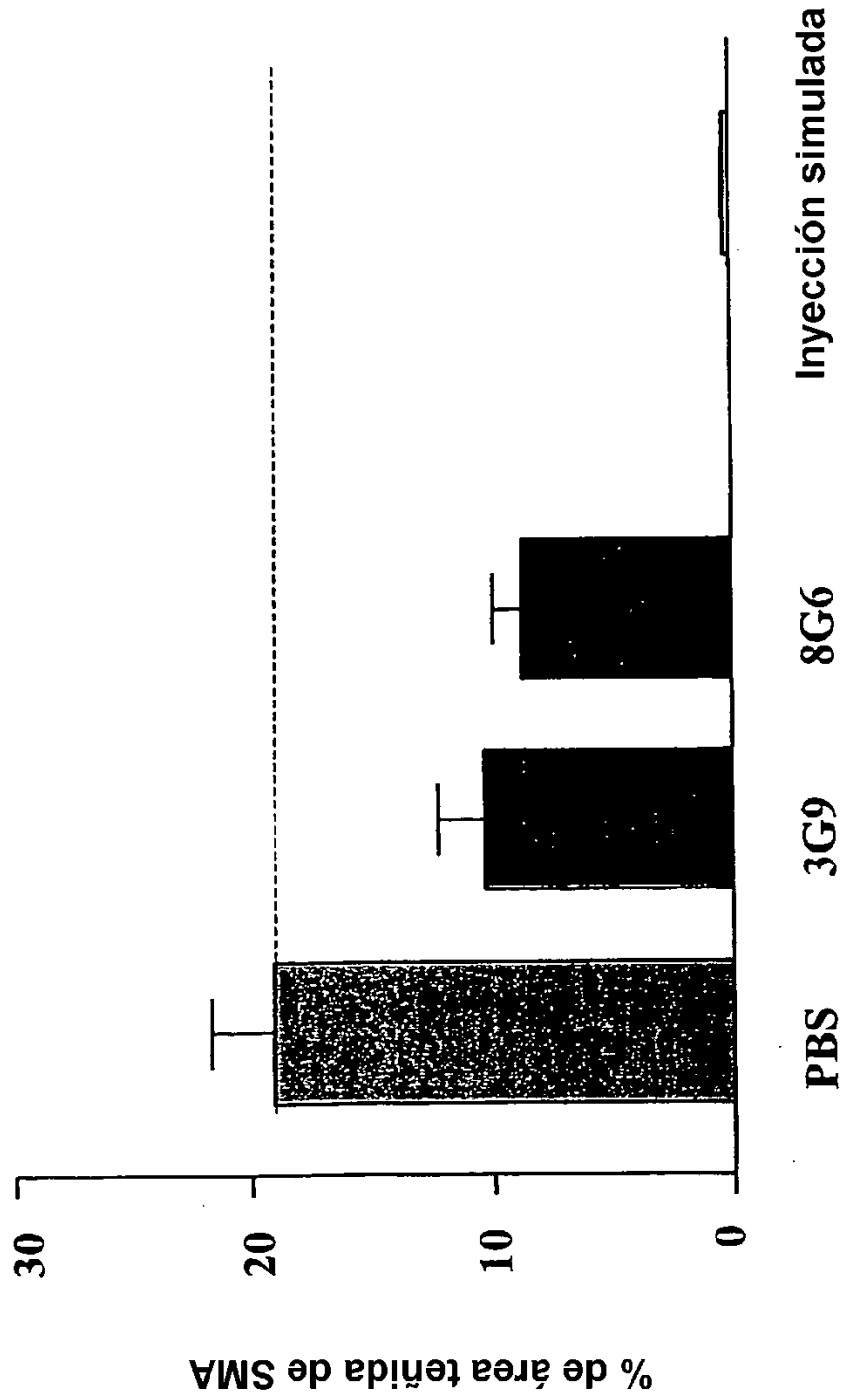


FIG. 11

FIG. 12

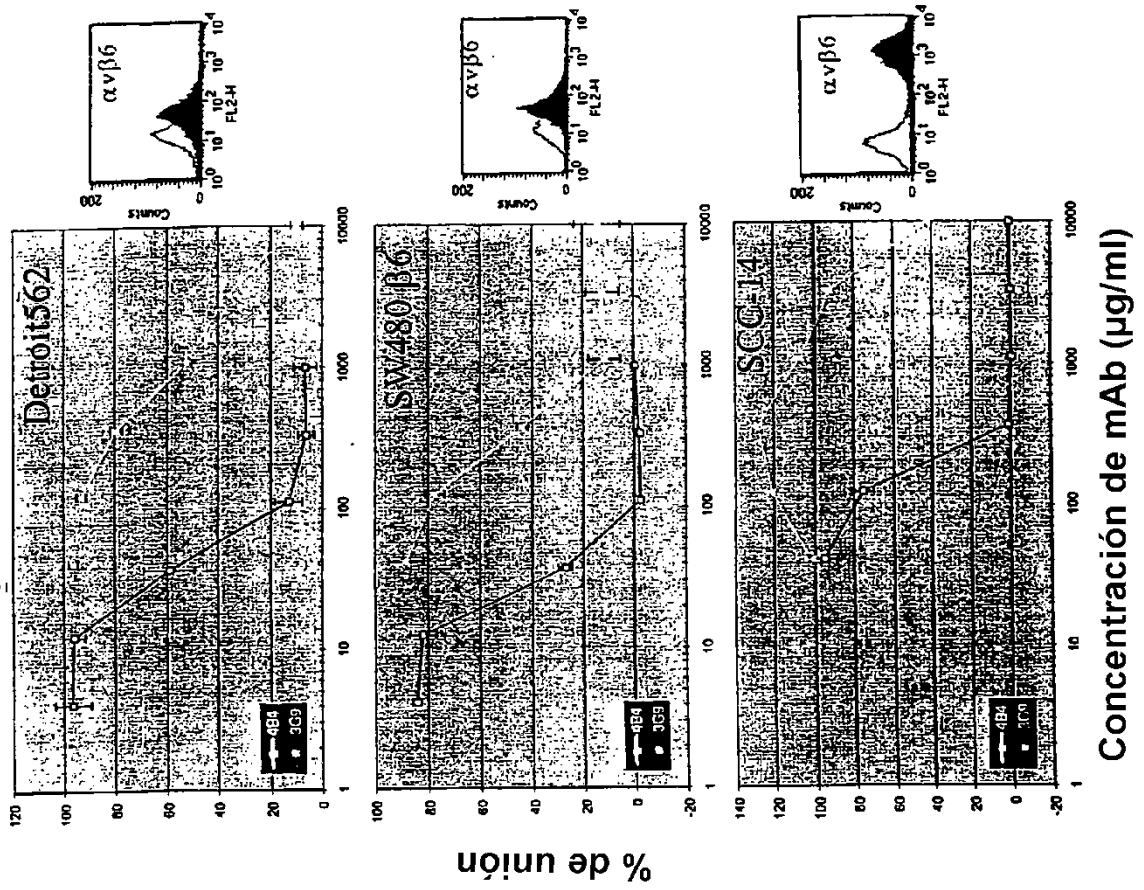
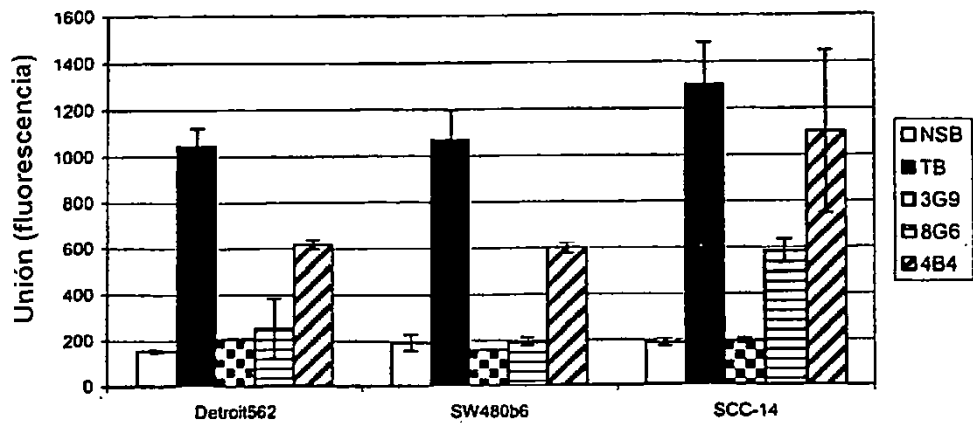
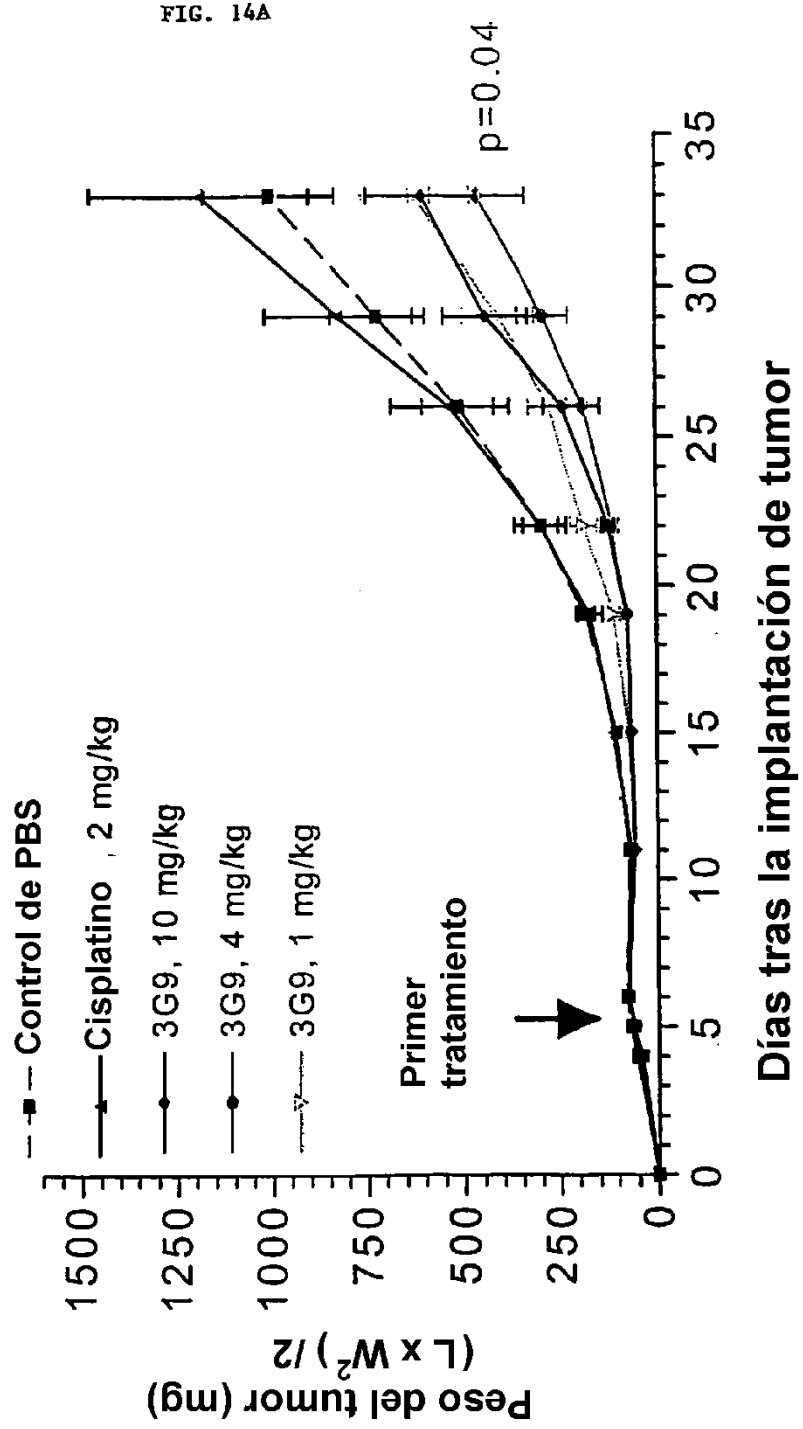


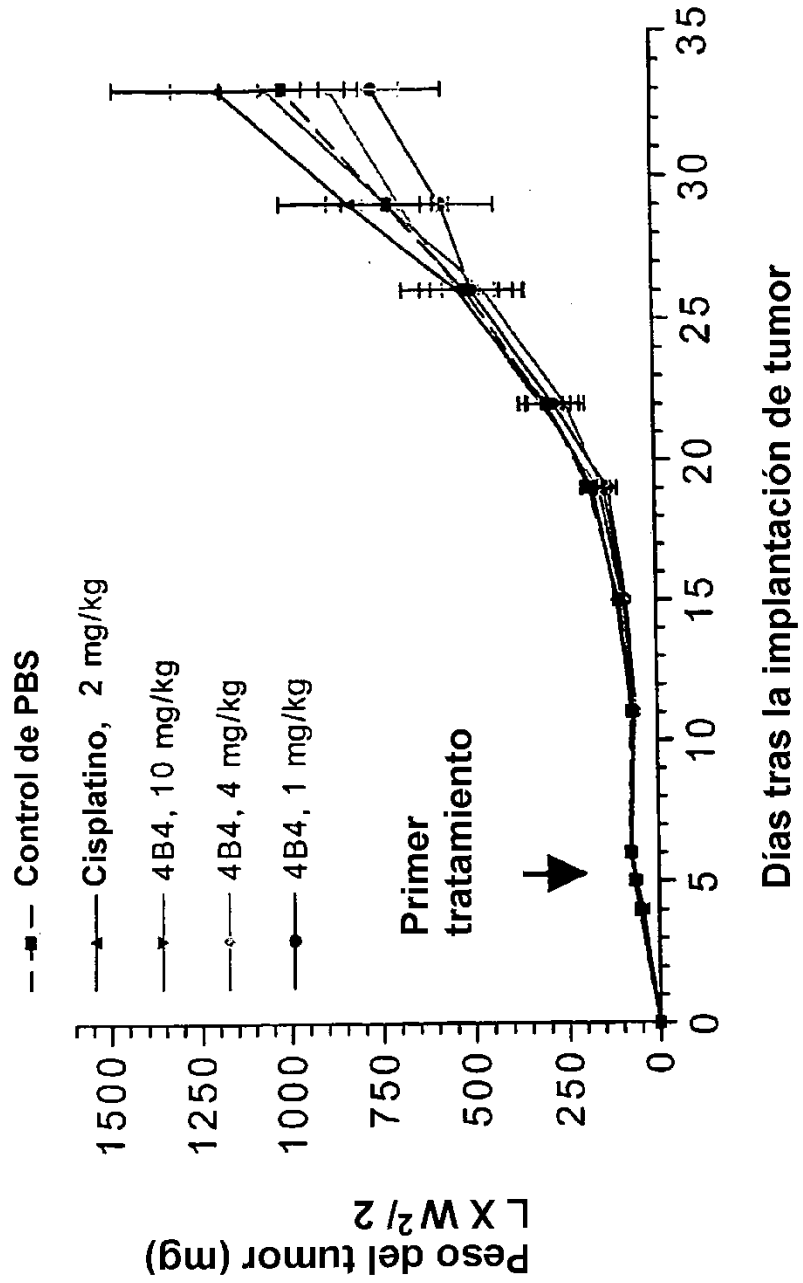
FIG. 13



Respuesta de la línea celular de carcinoma faríngeo humano Detroit 562 implantado subcutáneamente frente a la terapia con el mAb 3G9 de  $\alpha v\beta 6$ .



**Respuesta de la línea celular de carcinoma faríngeo humano Detroit 562 implantado subcutáneamente frente a la terapia con el mAb 4B4 de  $\alpha v\beta 6$ .**





**Experimentos de tratamiento de la fibrosis pulmonar con bleomicina**

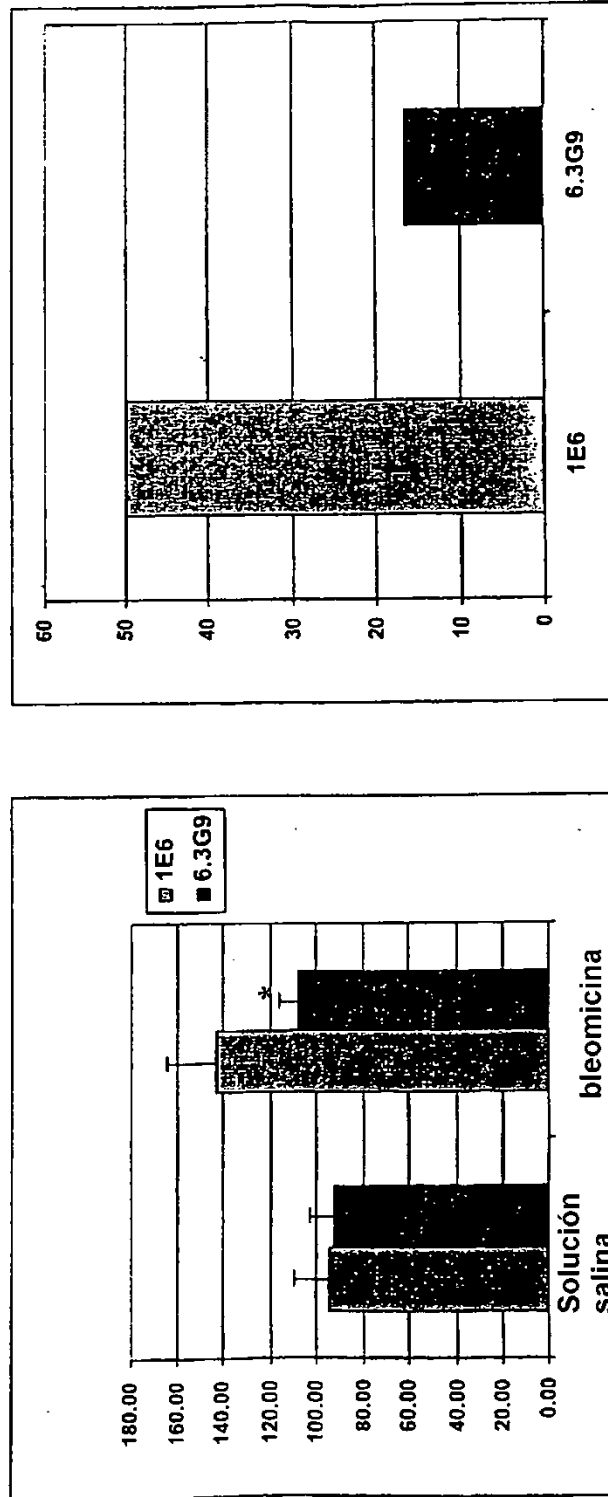
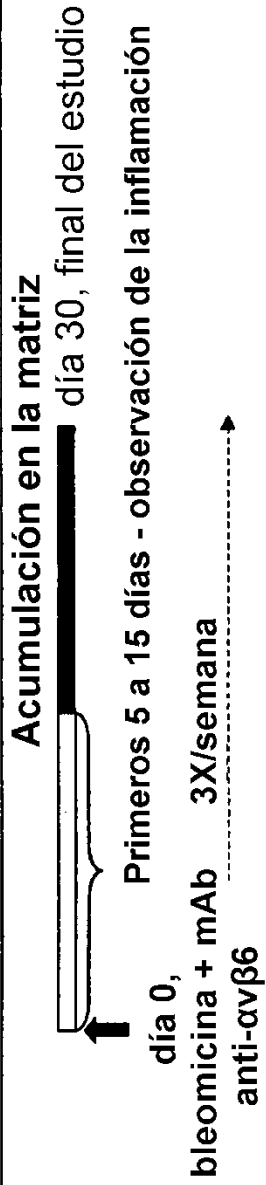


FIG. 15A



Efectos del Ab de  $\beta 6$  sobre el nivel de hidroxiprolina

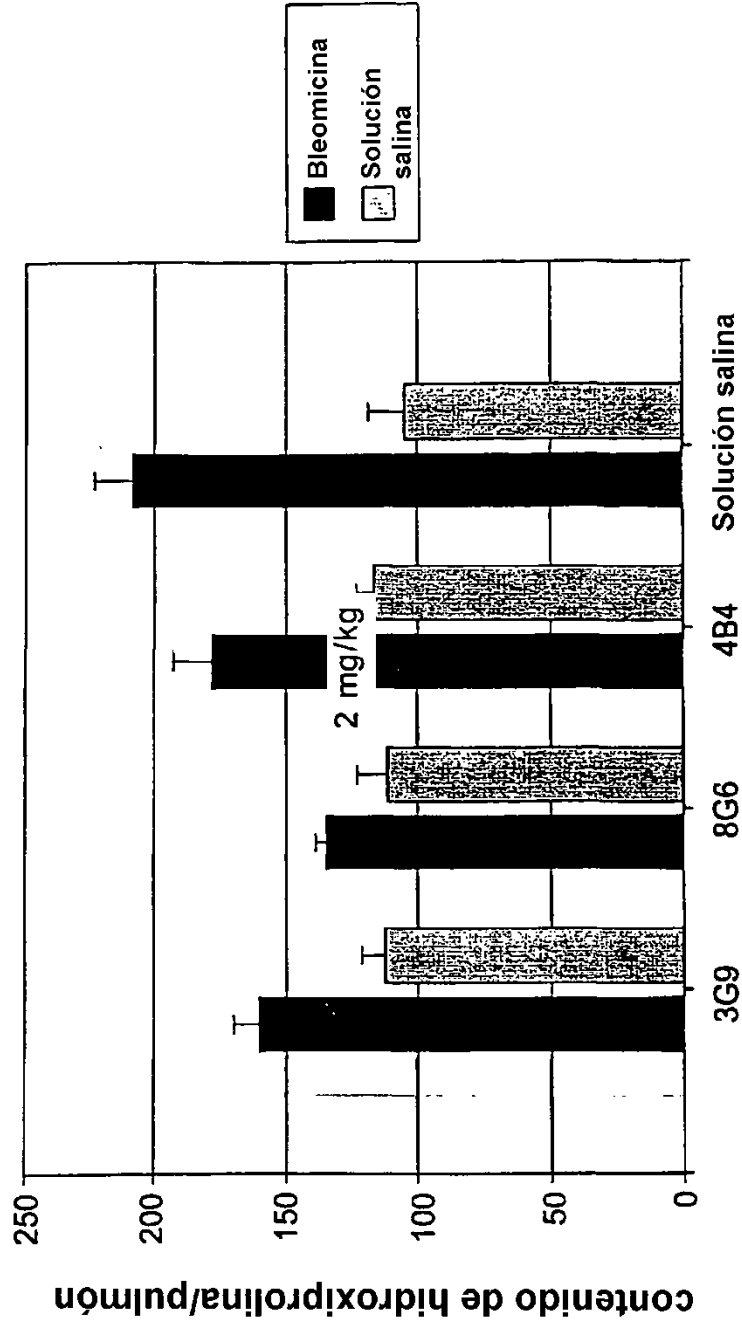


FIG. 15C