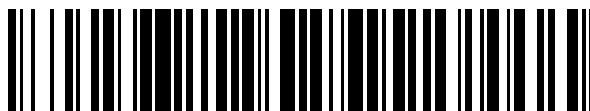


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 210**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/728** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07718606 .2**

96 Fecha de presentación: **23.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2001492**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.12.2008**

54 Título: **Procedimiento de tratamiento del cáncer y/o afecciones proliferativas celulares y agentes que se dirigen al anabolismo del hialuronano útiles para lo mencionado**

30 Prioridad:

**31.03.2006 AU 2006901708**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**19.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**19.12.2012**

73 Titular/es:

**ALCHEMIA ONCOLOGY LIMITED (100.0%)  
3 HI-TECH COURT BRISBANE TECHNOLOGY  
PARK  
EIGHT MILE PLAINS, QLD 4113, AU**

72 Inventor/es:

**BROWN, TRACEY y  
BROWNLEE, GARY**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 393 210 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

Procedimiento de tratamiento del cáncer y/o afecciones proliferativas celulares y agentes que se dirigen al anabolismo del hialuronano útiles para lo mencionado

### Antecedentes de la invención

#### 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al tratamiento y la profilaxis de la proliferación celular y, en particular, del cáncer. Más particularmente, la presente invención se dirige al anabolismo del hialuronano para facilitar el control de afecciones proliferativas celulares tales como el cáncer.

#### Descripción de la técnica anterior

10 También se recogen detalles bibliográficos de las publicaciones a las que se hace referencia en la presente memoria descriptiva al final de la descripción.

La referencia a cualquier técnica anterior en la presente memoria descriptiva no es, y no debería tomarse como, un reconocimiento o forma alguna de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general en ningún país.

15 El metabolismo del hialuronano (HA) es un equilibrio complejo entre la velocidad de síntesis y degradación de HA donde, dependiendo del papel fisiológico que esté desempeñando el HA, la síntesis y la degradación simultáneas están cuidadosamente controladas. El hialuronano se sintetiza por una familia de proteínas transmembrana diferentes aunque relacionadas denominadas isoformas de la hialuronano sintasa (HAS) HAS 1, 2 y 3, que pueden distinguirse entre sí con respecto a su expresión temporal y diferencial durante la embriogénesis del ratón y en tejidos maduros, respectivamente, y también en el peso molecular del HA producido. El polisacárido de matriz extracelular HA o su forma ácida, el ácido hialurónico, es un polímero lineal de alto peso molecular compuesto por unidades de disacáridos repetidas de ( $\beta$ 1-3) D-glucuronato-( $\beta$ 1-4)N-acetil-D-glucosamina (Weissman y Meyer, J. Am. Cham. Soc. 76: 1753, 1954).

25 La matriz extracelular (MEC) es uno de los elementos ambientales cruciales que afecta al comportamiento de las células tumorales. La MEC sirve como almacén al que se adhieren y hacia el que migran las células tumorales, además de actuar como depósito de factores de crecimiento y citocinas que son potencialmente beneficiosos para las células malignas (Ruoslahti y Yamaguchi, Cell 64: 867-869, 1991). El hialuronano (HA) es un polisacárido de alto peso molecular cargado negativamente que es un componente esencial de la matriz extracelular. Durante muchos años el HA se ha considerado el "relleno de espacio" de la MEC, pero con el descubrimiento de los receptores de superficie celular de HA se ha hecho evidente que desempeña un papel más complejo en el comportamiento celular (Laurent y Fraser, FASEB J 6: 2397-2404, 1992). Más recientemente, el HA se ha asociado con muchos procesos hiperproliferativos celulares diferentes, incluyendo la división y la migración celular como se producen durante el desarrollo (Toole, J. Internal Medicine 242: 35-40, 1981), la remodelación tisular (Knudson y Knudson, FASEB J. 7: 1233, 1993), la inflamación y el inicio, la progresión o la invasión de tumores (Knudson y col., The Biology of Hyaluronan 143: 150-169, 1989).

35 La HAS1, la menos activa de las tres proteínas HAS, dirige la síntesis del HA de alto peso molecular ( $2 \times 10^6$  D), aunque la HAS1 puede desempeñar un papel en el mantenimiento de un nivel reducido aunque necesario de síntesis de HA en muchos tipos celulares. La HAS2 está ampliamente expresada durante todo el desarrollo embrionario, donde es más activa que la HAS1, y también sintetiza HA de alto peso molecular ( $2 \times 10^6$  D) que se une a la membrana plasmática en forma de un gel pericelular (Fulop, Arch. Biochem. Biophys. 337: 261-266, 1997). La producción por HAS2 de grandes cantidades de HA de alto peso molecular puede tener un efecto significativo sobre la estructura y el volumen del tejido, desempeñando de este modo un papel importante en procesos evolutivos que impliquen el desarrollo de tumores. La HAS3 es la más activa de las 3 proteínas HAS, pero dirige la síntesis de cadenas de HA cortas ( $<2 \times 10^5$  a  $3 \times 10^5$  D). La expresión de HAS3 puede activarse para producir grandes cantidades de HA de bajo peso molecular, que puede interactuar con receptores de HA de superficie celular, desencadenando cascadas de señalización que conducen a cambios en el comportamiento de la célula.

45 La HAS2 es importante en una línea celular de cáncer de mama altamente invasiva (Udabage y col., Cancer Res 65: 6139-6150, 2005). La inhibición de HAS2 usando tecnología antisentido dio como resultado una inhibición del 97% de la invasividad celular. Además, cuando se implantaron células cancerosas con HAS2 antisentido en ratones atímicos no se iniciaron tumores, poniendo de relieve el valor terapéutico potencial de la inhibición de una hialuronano sintasa funcional en el estado maligno.

50 Estos estudios mencionados anteriormente ponen de relieve la importancia de isoformas de HAS en relación con el cáncer, donde la síntesis de HA puede promover el crecimiento independiente de anclaje y aumentar la invasividad tumoral, propiedades que son distintivas del fenotipo maligno.

55

El solicitante ha descubierto sorprendentemente compuestos, por ejemplo, anticuerpos, que interactúan con diferentes secciones de la secuencia de aminoácidos de HAS y que se dirigen específicamente a un epítipo de unión contenido dentro del epítipo de HAS que es más accesible a un entorno extracelular en células asociadas a enfermedad en comparación con células normales.

## 5 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos, agentes, agentes farmacéuticamente activos, medicamentos, agentes terapéuticos, principios activos, fármacos y similares que se dirigen específicamente a una porción de la molécula HAS que está accesible al entorno extracelular en una primera forma de una célula, pero que no es accesible al entorno extracelular en otra forma de o en una forma celular transformada de la misma célula o de una célula relacionada. En particular, la presente invención proporciona compuestos que se dirigen a una porción de HAS que está accesible al entorno extracelular en células malignas o proliferativas, pero cuya porción no está accesible al entorno externo en células "normales". Una célula "normal" en este caso es una célula no maligna o proliferativa.

Los compuestos son anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales o policlonales. También se proporcionan composiciones farmacéuticas y de otro tipo que comprenden los compuestos de la presente invención. También se contemplan procedimientos de exploración para moduladores de la actividad de HAS en células, tejidos o animales, incluyendo ensayos de diagnóstico para células malignas, inflamatorias y proliferativas y, por lo tanto, afecciones que implican a las mismas. También se exponen en el presente documento procedimientos de tratamiento de un animal, particularmente un ser humano, sospechoso de tener o de ser propenso a una enfermedad o afección asociada con los niveles de HA o la actividad de HAS. Dichos procedimientos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de uno o más de los compuestos o composiciones de la presente invención al sujeto en necesidad de tratamiento o sospechoso de necesitar tratamiento o profilaxis.

La presente invención proporciona por lo tanto, en una realización, compuestos que reducen selectivamente la actividad de HAS en tipos celulares seleccionados pero que sustancialmente no reducen la actividad de HAS en tipos celulares no seleccionados. En particular, la presente invención se refiere a compuestos que se dirigen selectivamente a una porción de la molécula HAS que está accesible al entorno extracelular en una célula maligna o proliferativa, pero cuya porción está sustancialmente inaccesible al entorno extracelular en células no asociadas a enfermedad.

En un aspecto, la invención proporciona un compuesto aislado para reducir o alterar el nivel de actividad de la hialuronano sintasa (HAS) o la liberación extracelular de HA, en el que dicho compuesto se dirige a un epítipo de la secuencia de aminoácidos de HAS en el que dicho epítipo es más accesible a un entorno extracelular en células enfermas en comparación con células normales.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto aislado capaz de reducir o alterar el nivel de actividad de la hialuronano sintasa (HAS) o la liberación extracelular de HA, en el que dicho compuesto se dirige a un epítipo de la secuencia de aminoácidos de HAS en el que dicho epítipo es más accesible a un entorno extracelular en células enfermas en comparación con células normales.

El epítipo se presenta en las células enfermas en el espacio extracelular y en las células no enfermas en el espacio intracelular o en la membrana plasmática.

El compuesto es un anticuerpo terapéutico.

Dicho compuesto se dirige específicamente a una secuencia de aminoácidos de INT-2 dentro de una HAS o a una secuencia que contiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas de INT-2.

Preferentemente, dicho compuesto se dirige específicamente a la secuencia de aminoácidos de INT-2.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo terapéutico para su uso en un procedimiento de tratamiento de células malignas o enfermas que comprende administrar un anticuerpo terapéutico, en el que dicho anticuerpo terapéutico reduce o altera el nivel de actividad de la hialuronano sintasa (HAS) o la liberación extracelular de HA, y dicho anticuerpo terapéutico se dirige a un epítipo de la secuencia de aminoácidos de HAS en el que dicha secuencia está más accesible a un entorno extracelular en células asociadas a enfermedad en comparación con células normales.

El epítipo está presente en las células enfermas en el espacio extracelular y en células no enfermas en el espacio intracelular o en la membrana plasmática.

El anticuerpo terapéutico reduce el nivel de actividad de la hialuronano sintasa (HAS), en el que dicho anticuerpo terapéutico se dirige a una secuencia de aminoácidos de INT-2 dentro de una HAS o a una secuencia que contiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas de INT-2.

Preferentemente, el anticuerpo terapéutico se dirige específicamente a una secuencia de aminoácidos de INT-2.

Preferentemente, las células malignas o enfermas son células de cáncer de mama.

Preferentemente, la hialuronano sintasa se selecciona del grupo que consiste en las isoformas HAS I, HAS II y HAS III.

5 Preferentemente, la isoforma es HAS II.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo terapéutico en la preparación de un medicamento para el tratamiento de células malignas o enfermas, en el que dicho compuesto reduce o altera el nivel de actividad de la hialuronano sintasa (HAS) o la liberación extracelular de HA, y se dirige a un epítipo contenido dentro de la secuencia de aminoácidos de HAS, en el que dicho epítipo está más accesible a un entorno extracelular en células asociadas a enfermedad en comparación con células normales.

10

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo terapéutico capaz de reducir el nivel de actividad de la hialuronano sintasa (HAS) o la liberación extracelular de HA, en el que dicho anticuerpo terapéutico se dirige a un epítipo de la secuencia de aminoácidos de HAS en el que dicho epítipo está más accesible a un entorno extracelular en células asociadas a enfermedad en comparación con células normales. Preferentemente, el anticuerpo terapéutico se dirige específicamente al epítipo de HAS INT-2.

15

**Tabla 1:**

<b>Identificadores de Secuencia</b>	
<b>Identificador de Secuencia</b>	<b>Secuencia</b>
1	Péptido de inmunización - HAS418 (INT-1)
2	Péptido de inmunización - HAS 419 (EX-1)
3	Péptido de inmunización - HAS421 (INT-2)
4	Enzima Humana Proteica
5	Enzima Humana Proteica
6	Enzima Humana Proteica

**Breve descripción de los dibujos**

La **Figura 1** es una representación gráfica de un alineamiento de aminoácidos múltiple entre la familia de la hialuronano sintasa (HAS) humana.

20

La **Figura 2** es una representación gráfica de la topología prevista en el estado no maligno.

La **Figura 3** es una representación fotográfica que muestra que en condiciones no reducidas se detectaba una sola banda fuera del intervalo de los patrones de peso molecular. Se estima que esta banda es superior a 210.000 Da y puede representar proteínas accesorias necesarias para dirigir el suministro de precursores de HA, en particular los requerimientos de UDP-glucuronato y UDP-N-acetilglucosamina para la síntesis de HA.

25

La **Figura 4** es una representación gráfica que muestra el índice de crecimiento de fibroblastos dérmicos no afectado en presencia de INT-1 o INT-2 o EX-1.

La **Figura 5** es una representación gráfica que muestra un resultado de representaciones de histograma típicas obtenidas cuando los fibroblastos dérmicos se hacen reaccionar con IgG de oveja.

30

Las **Figuras 6A a C** son representaciones gráficas que muestran el análisis citométrico de flujo de los anticuerpos de HAS en fibroblastos dérmicos. Los fibroblastos dérmicos se hicieron reaccionar con a) INT-1; b) INT-2; y c) EX-1. Las representaciones rellenas (en gris) representan el anticuerpo de HAS y la representación no rellena representa la fluorescencia de fondo generada por el anticuerpo de control correspondiente. Obsérvese el desplazamiento en la intensidad de fluorescencia en el panel c que indica un epítipo reactivo presente en la superficie celular.

35

La **Figura 7** es una representación gráfica que muestra el efecto de anticuerpos de HAS sobre la proliferación celular.

La **Figura 8** es una representación gráfica que muestra la inhibición de la producción de HA por aplicación de los anticuerpos de HAS en células de cáncer de mama malignas.

La **Figura 9** es una representación fotográfica del efecto de antisueros de HAS sobre la morfología celular. Línea celular mostrada; MDA-MB-231. La ampliación de cada micrográfica es de 400X.

Las **Figuras 10A y B** son representaciones fotográficas de tinción de DAPI. (A) MDA-MB-231 (B) MDA-MD-468. Nota: no se detectó fragmentación nuclear.

5 Las **Figuras 11A y B** son representaciones fotográficas de: (A) ADN extraído de sedimento celular después de la incubación de cáncer de mama con antisueros de HAS. No se detectaron fragmentos de ADN. (B) ADN extraído de lisado celular que representa la fracción citosólica. No se detectó ADN fragmentado en el citosol.

La **Figura 12** es una representación gráfica de MDA-MB-231 y MDA-MB-468.

10 La **Figura 13** es una representación gráfica de ZRL-75-1 y MDA-MB-435. **Nota:** Cuando los histogramas se presentan con representaciones rellenas en gris esto representa la reactividad contra el anticuerpo de HAS y la representación no rellena el control de anticuerpo correspondiente. Cuando las representaciones se presentan en líneas negras, éstas representan la fluorescencia de fondo, según se mide a partir del control de secundario-FITC solamente. Las representaciones verdes representan la reactividad de cada anticuerpo de HAS contra las líneas celulares de cáncer de mama citadas. Los datos de FACS obtenidos de las 4 líneas celulares de cáncer  
15 de mama ensayadas sugieren firmemente que en el estado maligno los epítomos para EX-1 e INT-2 se expresan extracelularmente.

### **Descripción detallada de la invención**

A lo largo de toda la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de  
20 un elemento indicado o número entero o grupo de elementos o números enteros, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

El examen de los bucles intracelulares de HAS propuestos puso de manifiesto la presencia de la homología más significativa y de motivos conservados (Figura 1; aminoácidos en negrita/subrayados). La familia de proteínas HAS se muestra en la Figura 1, en la que se han alineado las secuencias de proteínas. HAS1, 2 y 3 tienen 578, 552 y 553 aminoácidos de longitud, respectivamente, con pesos moleculares esperados que varían de 63,1 a 64,8  $M_r$  ( $\times 10^3$ ). A nivel de aminoácido todos los miembros presentan una identidad de aproximadamente el 52 al 85%. Basándose en estudios de sustitución de aminoácidos se ha demostrado que los motivos clave, mostrados en negrita, son esenciales para la actividad de HAS. El resto de leucina en el motivo SGPL (en negrita) cuando se sustituye con una valina, provoca que se pierda la actividad de HAS.

30 Por lo tanto, la presente invención identifica que en células cancerosas las porciones INT-2 de HAS están accesibles a un entorno extracelular. En células "normales", es decir, células no asociadas con cáncer, estos INT-2 no están accesibles al entorno extracelular. La topología de la molécula HAS cambia, por lo tanto, dependiendo del estado de la célula, permitiendo nuevas dianas para generar compuestos que se dirijan selectivamente a HAS en células asociadas a enfermedad.

35 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto que se dirige selectivamente a una porción INT-2 de la molécula HAS que está accesible al entorno extracelular en una célula maligna o proliferativa pero cuya porción INT-2 está sustancialmente inaccesible al entorno extracelular en células no asociadas a enfermedad.

40 Los términos "compuesto", "agente", "reactivo", "agente farmacológicamente activo", "medicamento", "agente terapéutico", "principio activo" y "fármaco" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo u otra molécula interactiva que es capaz de unirse a una porción INT-2 de HAS que está accesible al entorno extracelular en una célula maligna o proliferativa, pero que está sustancialmente inaccesible en una célula normal. Los términos también incluyen ingredientes farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente activos de aquellos agentes activos específicamente mencionados en el presente documento. Cuando se usan los términos  
45 "agente", "reactivo", "compuesto", "agente farmacológicamente activo", "medicamento", "agente terapéutico", "principio activo" y "fármaco", entonces debe entenderse que esto incluye la entidad activa de por sí, así como sales farmacéuticamente aceptables, farmacológicamente activas, quimeras y formas recombinantes de los anticuerpos.

La referencia a un "agente", "agente químico", "compuesto", "agente farmacológicamente activo", "medicamento", "agente terapéutico", "principio activo" y "fármaco" incluye combinaciones de dos o más agentes activos. Una  
50 "combinación" también incluye múltiples partes, tal como una composición de dos partes en la que los agentes se proporcionan por separado y se administran o dispensan por separado o se mezclan entre sí antes de la dispensación. Por ejemplo, un envase farmacéutico de múltiples partes puede tener dos o más agentes mantenidos de forma separada. Por lo tanto, este aspecto de la presente invención incluye una terapia de combinación. La terapia de combinación incluye la coadministración de dos anticuerpos, cada uno específico para una porción de  
55 HAS que solo está accesible al entorno externo en células asociadas a enfermedad.

Las expresiones “cantidad eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” de un agente, como se usan en el presente documento, significan una cantidad suficiente del agente para proporcionar el efecto o resultado terapéutico o fisiológico deseado. Dicho efecto o resultado incluye la reducción o mejoría de los síntomas de enfermedad celular. A veces se manifiestan efectos indeseables, por ejemplo, efectos secundarios, junto con el efecto terapéutico deseado; por lo tanto, un médico sopesa los beneficios potenciales frente a los riesgos potenciales para determinar qué es una “cantidad eficaz” apropiada. La cantidad exacta necesaria variará de un sujeto a otro dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, del modo de administración y similares. Por lo tanto, puede no ser posible especificar una “cantidad eficaz” exacta. Sin embargo, una “cantidad eficaz” apropiada en cualquier caso individual puede determinarse por un experto en la materia usando solamente una experimentación de rutina. En general, el agente o agentes se proporcionan en una cantidad y en condiciones suficientes para reducir la proliferación de células, incluyendo células malignas.

La presente invención emplea anticuerpo dirigidos contra la molécula HAS objeto para su uso en la modulación de la función de HAS y, en una realización particular, HAS1, HAS2 y/o HAS3. Como se usa en el presente documento, la referencia HAS incluye cualquier molécula con la misma función. En un aspecto preferido, la referencia a “HAS” incluye la referencia a las isoformas HAS1, HAS2 o HAS3. Los anticuerpos son específicos para porciones de la HAS expuestas o accesibles al entorno extracelular en células asociadas a enfermedad.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado capaz de afectar selectivamente a la función o actividad de HAS en células enfermas frente a no enfermas.

Las presente invención proporciona, por lo tanto, antagonistas de la función o actividad de HAS. Dichos antagonistas son útiles en la reducción de los efectos de HAS y, por lo tanto, en la reducción o elevación de los niveles de HAS.

Por consiguiente, en un aspecto preferido la presente invención proporciona anticuerpos que se unen a, interaccionan o se asocian de otro modo con HAS y que reducen la función o actividad de HAS en células asociadas a enfermedad pero no en células normales.

Como se ha indicado anteriormente, una célula “normal” es una célula no asociada con una proliferación o tumor maligno.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales, aunque se prefieren anticuerpos monoclonales. Generalmente los anticuerpos están en forma aislada, homogénea o total o parcialmente purificada.

Los anticuerpos también pueden ser humanizados o quiméricos, o son anticuerpos humanos adecuados para su administración a seres humanos. Estos incluyen anticuerpos humanizados preparados, por ejemplo, a partir de anticuerpos monoclonales murinos y anticuerpos monoclonales humanos que pueden prepararse, por ejemplo, usando ratones transgénicos como se describe a continuación, o por presentación en fago. Un anticuerpo “humanizado” incluye un anticuerpo desinmunizado.

Los anticuerpos se generan contra una HAS, tal como HAS 1, 2 ó 3, o partes inmunogénicas de la misma o moléculas inmunológicamente homólogas. Se generan anticuerpos contra epítomos de HAS (INT-2) que están expuestos de forma diferencial a un entorno en células enfermas frente a no enfermas.

La referencia a un “anticuerpo” o “anticuerpos” incluye la referencia a todas las diversas formas de anticuerpos incluyendo, pero sin limitación: anticuerpos completos (por ejemplo, que tienen una región Fc intacta), incluyendo, por ejemplo, anticuerpos monoclonales; fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno incluyendo, por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>; anticuerpos humanizados; anticuerpos humanos (por ejemplo, producidos en animales transgénicos o por presentación en fago); y polipéptidos derivados de inmunoglobulina producidos por técnicas de ingeniería genética. A menos que se especifique otra cosa, los términos “anticuerpo” o “anticuerpos” y, como se usan en el presente documento, incluyen tanto anticuerpos completos como fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

A menos que se indique otra cosa, la especificidad en relación con un anticuerpo de la presente invención pretende significar que el anticuerpo se une sustancialmente sólo a su antígeno diana, sin una unión apreciable a proteínas no relacionadas. Sin embargo, es posible que un anticuerpo se diseñe o seleccione para unirse a dos o más proteínas relacionadas. Una proteína relacionada incluye diferentes variantes de corte y empalme o fragmentos de la misma proteína o proteínas homólogas de diferentes especies. Dichos anticuerpos todavía se considera que tienen especificidad por esas proteínas y se incluyen en la presente invención. El término “sustancialmente” significa en este contexto que no existe una unión detectable a un antígeno no diana por encima de niveles basales, es decir, inespecíficos.

Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse por procedimientos bien conocidos. Véase, por ejemplo, Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet y col, (eds.), Plenum Press, Nueva York (1980); y Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

5 La presente invención contempla un procedimiento para producir una línea celular de hibridoma que comprende inmunizar a un animal no humano, tal como un ratón o un ratón transgénico, con una HAS o partes inmunogénicas de la misma; recoger esplenocitos del animal inmunizado; fusionar los esplenocitos recogidos con una línea celular de mieloma para generar células de hibridoma; e identificar una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a una HAS.

10 Dichas líneas celulares de hibridoma y los anticuerpos monoclonales de HAS producidos por las mismas se incluyen en la presente invención. Los anticuerpos monoclonales secretados por las líneas celulares de hibridoma se purifican por técnicas convencionales. Los hibridomas o los anticuerpos monoclonales producidos por los mismos pueden explorarse adicionalmente para identificar anticuerpos monoclonales con propiedades particularmente deseables.

La molécula HAS o parte inmunogénica de la misma que puede usarse para inmunizar animales en las fases iniciales de la producción de los anticuerpos de la presente invención puede ser de cualquier origen de mamífero.

15 Pueden producirse fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos de la presente invención por técnicas convencionales. Los ejemplos de dichos fragmentos incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, incluyendo fragmentos Fv de cadena sencilla (denominados sFv o scFv). También se contemplan para su uso de acuerdo con la presente invención fragmentos de anticuerpo y derivados producidos por técnicas de ingeniería genética, tales como fragmentos Fv estabilizados con disulfuro (dsFv), moléculas de dominio de región variable de cadena sencilla (Ac), minicuerpos y diacuerpos.

20 Dichos fragmentos y derivados de anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas HAS pueden prepararse y explorarse para las propiedades deseadas por técnicas conocidas incluyendo los ensayos descritos en el presente documento. Ciertas técnicas implican aislar ADN que codifica una cadena polipeptídica (o una porción de la misma) de un AcM de interés y manipular el ADN por tecnología de ADN recombinante. El ADN puede fusionarse a otro ADN de interés o alterarse (por ejemplo, por mutagénesis u otras técnicas convencionales) para añadir, delecionar o sustituir uno o más restos de aminoácidos, por ejemplo.

25 El ADN que codifica polipéptidos de anticuerpo (por ejemplo, cadena pesada o ligera, región variable solamente o longitud completa) puede aislarse a partir de linfocitos B de ratones que se han inmunizado con moléculas LIF modificadas. El ADN puede aislarse usando procedimientos convencionales. La presentación en fago es otro ejemplo de una técnica conocida por la que pueden prepararse derivados de anticuerpos. En una estrategia, se expresan polipéptidos que son componentes de un anticuerpo de interés en cualquier sistema de expresión recombinante adecuado y se deja que los polipéptidos expresados se ensamblen para formar moléculas de anticuerpo.

30 Pueden formarse anticuerpos de cadena sencilla por enlace de fragmentos de región variable de cadena pesada y ligera (región Fv) mediante un puente aminoacídico (engarce peptídico corto), dando como resultado una sola cadena polipeptídica. Dichos Fv de cadena sencilla (scFv) se han preparado por fusión de ADN que codifica un engarce peptídico entre ADN que codifican los dos polipéptidos de región variable (VL y VH). Se incluyen en la presente invención anticuerpos de cadena sencilla derivados de anticuerpos proporcionados en el presente documento.

En una realización, la presente invención proporciona fragmentos de anticuerpo o formas quiméricas, recombinantes o sintéticas de los anticuerpos de la presente invención que se unen a una HAS tal como HAS1, 2 y/o 3.

40 Se conocen técnicas para obtener un anticuerpo de una subclase o isotipo diferente a partir de un anticuerpo de interés, es decir, cambio de subclase. Por lo tanto, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales IgG1 o IgG4 a partir de un anticuerpo monoclonal IgM, por ejemplo, y viceversa. Dichas técnicas permiten la preparación de nuevos anticuerpos que poseen las propiedades de unión a antígeno de un anticuerpo dado (el anticuerpo precursor), pero que también presentan propiedades biológicas asociadas con un isotipo o subclase de anticuerpo diferente a la del anticuerpo precursor. Pueden emplearse técnicas de ADN recombinante. Puede emplearse ADN clonado que codifica polipéptidos de anticuerpo particulares en dichos procedimientos, por ejemplo, ADN que codifica la región constante de un anticuerpo del isotipo deseado.

50 El procedimiento de producción monoclonal descrito anteriormente puede usarse en animales, por ejemplo, ratones, para producir anticuerpos monoclonales. Se sabe que los anticuerpos convencionales obtenidos de dichos animales, por ejemplo, anticuerpos murinos, son en general inadecuados para su administración a seres humanos ya que pueden causar una respuesta inmune. Por lo tanto, dichos anticuerpos pueden tener que modificarse para proporcionar anticuerpos adecuados para su administración a seres humanos. Se conocen bien en la técnica y se describen con más detalle a continuación procedimientos para preparar anticuerpos quiméricos y/o humanizados.

55 Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que el dominio variable de la cadena pesada y/o ligera es idéntico a u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie no humana (por ejemplo, murina), mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico a u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de seres humanos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo destinatario) en las que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del destinatario se sustituyen por las CDR correspondientes de una especie no humana (anticuerpo donador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tienen las propiedades deseadas, por ejemplo, de especificidad y afinidad. En algunos casos, los restos de la región flanqueante de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo destinatario o en el anticuerpo donador.

Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones determinantes de complementariedad corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los restos de región flanqueante son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

Se han desarrollado y los expertos en la materia conocen bien procedimientos para generar anticuerpos humanos en animales no humanos. Por ejemplo, pueden usarse ratones transgénicos en los que se ha introducido material genético que codifica una o más cadenas de inmunoglobulina humana para producir los anticuerpos de la presente invención. Los anticuerpos producidos en los animales incorporan cadenas polipeptídicas de inmunoglobulina humana codificadas por el material genético humano introducido en el animal.

Otro procedimiento para generar anticuerpos humanos es la presentación en fago. Los expertos en la materia conocen bien técnicas de presentación en fago para generar anticuerpos humanos, e incluyen los procedimientos usados por compañías tales como Cambridge Antibody Technology y MorphoSys.

Los anticuerpos descritos en el presente documento también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y la validación de dianas. Esto incluye el uso de los anticuerpos y segmentos diana preferidos identificados en el presente documento en los intentos de descubrimiento de fármacos para elucidar las relaciones que existen entre HA, HAS o la interacción HA/HAS y una patología, fenotipo o afección. Estos procedimientos incluyen detectar o modular HAS, que comprenden poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente invención, medir el nivel de ácido nucleico o proteína de HAS y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento y, opcionalmente, comparar el valor medido con una muestra no tratada o una muestra tratada con un compuesto adicional de la invención. Estos procedimientos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el procedimiento de validación de diana, o para determinar la validez de un producto génico particular como una diana para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, afección o fenotipo particular.

La presente invención contempla el uso de los anticuerpos descritos en el presente documento como agentes terapéuticos para tratar a sujetos que padecen de cáncer asociado con HA. Los sujetos tratados usando las composiciones y anticuerpos de la presente invención incluyen cualquier animal que pueda beneficiarse de dicho tratamiento. Estos incluyen, sin limitación, seres humanos, tíis, orangutanes y gorilas, animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos, burros), animales de ensayo de laboratorio (por ejemplo, ratones, ratas, cobayas, hámsteres, conejos), animales de compañía (por ejemplo, gatos, perros) y animales salvajes capturados (por ejemplo, roedores, zorros, ciervos, canguros). Un huésped particularmente preferido es un ser humano, primate o animal de granja.

Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para agentes de diagnóstico, agentes terapéuticos, profilaxis y como reactivos y kits de investigación. Además, los anticuerpos contra HAS que son capaces de afectar a HAS y con una especificidad exquisita se usan con frecuencia por los expertos en la materia para elucidar la función de genes o productos génicos particulares o para distinguir entre funciones de diversos miembros de una ruta biológica.

Para el uso en kits y agentes de diagnóstico, los anticuerpos de la presente invención, en solitario o en combinación con otros compuestos o agentes terapéuticos, pueden usarse como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para elucidar los patrones de expresión de una porción o de la dotación completa de genes expresados dentro de células y tejidos.

Los anticuerpos de la invención son útiles para la investigación y el diagnóstico, porque estos anticuerpo se unen a la propia HAS. Por ejemplo, los anticuerpos pueden marcarse con moléculas indicadoras incluyendo enzimas y radiomarcadores para fines de formación de imágenes, fines de diagnóstico o fines cuantitativos. También pueden prepararse kits que usan dichos medios de detección para detectar el nivel de HAS en una muestra.

La especificidad y sensibilidad de los anticuerpos también se aprovechan por los expertos en la materia para usos terapéuticos. Dichos compuestos se han empleado como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales, incluyendo seres humanos.



Para agentes terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, sospechoso de tener una enfermedad o trastorno que puede tratarse por modulación de la expresión de la HAS puede tratarse con anticuerpos para inhibir la actividad de HAS. Por ejemplo, en una realización no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar al animal en necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que inhiba selectivamente la expresión de HAS en células enfermas. En una realización, la actividad de expresión de HAS en un animal se inhibe en aproximadamente el 10%. Preferentemente, la actividad o expresión de HAS en un animal se inhibe en aproximadamente el 30%. Más preferentemente, la actividad o expresión de HAS en un animal se inhibe en el 50% o más.

Por ejemplo, la reducción de la expresión del gen de HAS puede medirse en suero, tejido adiposo, células cutáneas, hígado o cualquier otro fluido corporal, tejido u órgano del animal. Preferentemente, las células contenidas dentro de dichos fluidos, tejidos u órganos que se están analizando contienen una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína HAS.

La presente invención contempla, por lo tanto, procedimientos de exploración para compuestos que comprenden, por ejemplo, poner en contacto un compuesto candidato con HAS. El procedimiento de exploración incluye ensayar (i) para determinar la presencia de un complejo entre el fármaco y HAS y (ii) explorar para determinar una alteración en los niveles de expresión de HAS en células enfermas y no enfermas. También pueden explorarse células completas para determinar la interacción entre la célula y el fármaco.

Una forma de ensayo implica ensayos de unión competitiva. En dichos ensayos de unión competitiva, el compuesto candidato o HAS está típicamente marcado. La HAS libre se separa de cualquier supuesto complejo y la cantidad de marcador libre (es decir, no formando complejos) es una medida de la unión del agente que se está ensayando a molécula diana. También se puede medir la cantidad de HAS unida en lugar de libre. También es posible marcar el compuesto en lugar de la HAS y medir la cantidad de compuesto que se une a HAS en presencia y en ausencia del compuesto que se está ensayando. Dichos compuestos pueden inhibir la HAS, lo cual es útil, por ejemplo, en el descubrimiento de inhibidores de HAS.

Otra técnica para la exploración de fármacos proporciona una exploración de alto rendimiento para compuestos que tienen una afinidad de unión adecuada a una diana. Indicado brevemente, se sintetizan grandes cantidades de compuestos de ensayo peptídicos diferentes en un sustrato sólido, tal como clavijas de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de ensayo peptídicos se hacen reaccionar con HAS y se lavan. Después se detectan las moléculas de HAS unidas por procedimientos bien conocidos en la técnica. Este procedimiento puede adaptarse para explorar para entidades químicas no peptídicas. Por lo tanto, este aspecto se extiende a estrategias combinatorias para explorar para antagonistas o agonistas de HAS.

La HAS purificada puede revestirse directamente sobre placas para su uso en las técnicas de exploración de fármacos mencionadas anteriormente. Sin embargo, también pueden usarse anticuerpos no neutralizantes contra la diana para inmovilizar la diana sobre la fase sólida.

Debe señalarse que, como se usa en la presente memoria descriptiva, las formas singulares “un”, “uno/a” y “el/la” incluyen aspectos del plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un compuesto” incluye un solo compuesto, así como dos o más compuestos; la referencia a “un anticuerpo” incluye un solo anticuerpo, así como dos o más anticuerpos; y así sucesivamente.

Los términos “compuesto”, “agente activo”, “agente farmacológicamente activo”, “medicamento”, “principio activo” y “fármaco” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un antagonista de la función o actividad de HAS o de la expresión de material genético que la codifica, lo que induce un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado tal como, pero sin limitación, controlar la inflamación y reducir el crecimiento del cáncer. Los términos también incluyen ingredientes farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente activos de aquellos agentes activos específicamente mencionados en el presente documento incluyendo, pero sin limitación, sales, ésteres, amidas, profármacos, metabolitos activos, análogos y similares. Cuando se usan los términos “compuesto”, “agente activo”, “agente farmacológicamente activo”, “medicamento”, “principio activo” y “fármaco”, entonces debe entenderse que estos incluyen el agente activo de por sí, así como sales, ésteres, amidas, profármacos, metabolitos, análogos, etc. farmacéuticamente aceptables, farmacológicamente activos.

Las expresiones “cantidad eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” del compuesto, como se usan en el presente documento, significan una cantidad suficiente del agente para proporcionar el efecto terapéutico o fisiológico deseado, tal como inhibir la inflamación o reducir el crecimiento o la propagación de células cancerosas. A veces se manifiestan efectos indeseables, por ejemplo, efectos secundarios, junto con el efecto terapéutico deseado; por lo tanto, un médico sopesa los beneficios potenciales frente a los riesgos potenciales para determinar qué es una “cantidad eficaz” apropiada. La cantidad exacta necesaria variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, del modo de administración y similares. Por lo tanto, puede no ser posible especificar una “cantidad eficaz” exacta. Sin embargo, una “cantidad eficaz” apropiada en cualquier caso individual puede determinarse por un experto en la materia usando solamente una experimentación de rutina. La presente invención se extiende a un procedimiento de tratamiento o profilaxis.

- 5 Por vehículo, excipiente o diluyente “farmacéuticamente aceptable” se entiende un vehículo farmacéutico compuesto por un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material puede administrarse a un sujeto junto con el agente activo seleccionado sin provocar ninguna reacción adversa o una reacción adversa importante. Los vehículos pueden incluir excipientes y otros aditivos tales como diluyentes, detergentes, agentes colorantes, agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes de pH, conservantes y similares.
- De forma similar, una sal, éster, amida, profármaco o derivado de un compuesto “farmacológicamente aceptable” como se proporciona en el presente documento es una sal, éster, amida, profármaco o derivado que no es biológicamente o de otro modo indeseable.
- 10 Los términos “tratar” y “tratamiento”, como se usan en el presente documento, se refieren a una reducción en la gravedad y/o frecuencia de los síntomas de enfermedades o trastornos o afecciones fisiológicas, a la eliminación de síntomas y/o de la causa subyacente, a la prevención de la aparición de síntomas de enfermedad y/o su causa subyacente y a una mejora o remedio de las afecciones asociadas con la actividad de citocinas.
- 15 El término “tratar” a un paciente puede implicar la prevención del trastorno o patología o acontecimiento fisiológico en un individuo susceptible, así como el tratamiento de un individuo clínicamente sintomático por inhibición de una enfermedad o trastorno.
- Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición terapéutica o profiláctica que comprende un anticuerpo capaz de reducir los niveles o la actividad de HAS, reduciendo por lo tanto los niveles de HA.
- 20 Las composiciones y anticuerpos de la presente invención pueden usarse en el tratamiento o la prevención de un cáncer asociado con HA.
- Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas por adición de una cantidad eficaz de un anticuerpo a un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. El uso de los anticuerpos y procedimientos de la invención también puede ser útil profilácticamente.
- 25 Los anticuerpos de la invención también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas o de otro tipo, para contribuir a la captación, distribución y/o absorción.
- El término “profármaco” indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte a una forma activa (es decir, fármaco) dentro del cuerpo o células del mismo por acción de enzimas endógenas u otros agentes químicos y/o condiciones.
- 30 La expresión “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo.
- 35 La presente invención también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los anticuerpos interactivos de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de varias formas dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y en membranas mucosas, incluyendo suministro vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. Los anticuerpos pueden modificarse para su administración oral. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, oleosas o en polvo, espesantes y similares.
- 45 También pueden ser útiles preservativos, guantes y similares revestidos.
- Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con los vehículos o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan poniendo uniformemente e íntimamente en asociación los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finalmente divididos, o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.
- 50 Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, pero sin limitación, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano.
- 55

La suspensión también puede contener estabilizantes.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, soluciones, emulsiones, espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender uno o más potenciadores de la penetración, vehículos, excipientes u otros principios activos o inactivos.

Las emulsiones son típicamente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotas que superan habitualmente 0,1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersadas y el fármaco activo, que puede estar presente como una solución en la fase acuosa, la fase oleosa o de por sí como una fase separada. Se incluyen microemulsiones como una realización de la presente invención.

Las formulaciones de la presente invención incluyen formulaciones liposomales. Como se usa en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada a partir de un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición a administrar.

Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", un término que, como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan en liposomas, dan como resultado tiempos de vida en circulación aumentados respecto a los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Son ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados aquellos en los que parte de la porción lipídica formadora de vesículas del liposoma comprende uno o más glicolípidos o está derivatizada con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG).

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden incluir tensioactivos. El uso de tensioactivos en productos farmacológicos, formulaciones y en emulsiones es bien conocido en la técnica.

Un experto en la materia reconocerá que las formulaciones se diseñan de forma rutinaria de acuerdo con su uso deseado, es decir, con la vía de administración.

Las formulaciones preferidas para administración tópica incluyen aquellas en las que los anticuerpos de la invención están en mezcla con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo, dioleilfosfatidil DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidil colina DMPC, diestearoilfosfatidil colina), negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidil glicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo dioleiltetrametilaminopropil DOTAP y dioleilfosfatidil etanolamina DOTMA).

Para la administración tópica o de otro tipo, los anticuerpos de la invención pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Como alternativa, los anticuerpos pueden formar complejos con lípidos, en particular con lípidos catiónicos.

Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobrecitos, comprimidos o minicompimidos. Pueden ser deseables espesantes, agentes saporíferos, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de la dispersión o aglutinantes. Las formulaciones orales preferidas son aquellas en las que se administran oligonucleótidos de la invención junto con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes. Los tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. También se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particularmente preferida es la sal sódica de ácido láurico, ácido capricho y UDCA. Los potenciadores de la penetración adicionales incluyen polioxietilen-9-lauril éter, polioxietilen-20-cetil éter. Los anticuerpos de la invención pueden administrarse por vía oral en forma granular, incluyendo partículas secas pulverizadas, o formando complejos para formar micro o nanopartículas.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero sin limitación, potenciadores de la penetración, compuestos de vehículo y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Ciertas realizaciones de la presente invención proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más anticuerpos y uno o más agentes quimioterápicos distintos. Los ejemplos de dichos agentes quimioterápicos incluyen, pero sin limitación, fármacos quimioterápicos del cáncer tales como daunarubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, arabinósido de citosina, bis-clorotilnitrosurea, busulfán, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxíciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina,

taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los anticuerpos de la invención, dichos agentes quimioterápicos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), de forma secuencial (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o más de otros agentes quimioterápicos de este tipo (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). También pueden combinarse en composiciones de la invención fármacos antiinflamatorios incluyendo, pero sin limitación, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, incluyendo pero sin limitación ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir. Dos o más compuestos combinados pueden usarse juntos o de forma secuencial.

En otra realización relacionada, las composiciones de la invención pueden contener uno o más anticuerpos dirigidos contra una primera proteína y uno o más compuestos adicionales dirigidos contra una segunda proteína. Como alternativa, las composiciones de la presente invención pueden contener dos o más anticuerpos dirigidos contra regiones diferentes de la misma proteína.

La formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) está dentro de la especialidad en la técnica. La dosificación depende de la gravedad y del grado de respuesta de la patología a tratar, durando el transcurso del tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se logre una cura o se consiga una disminución de la patología. Los programas de dosificación óptimos pueden calcularse a partir de mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, las metodologías de dosificación y los índices de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los compuestos individuales y pueden estimarse en general basándose en las  $CE_{50}$  que se encuentre que son eficaces *in vitro* y en modelos animales *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01  $\mu$ g a 100 g por kg de peso corporal y puede administrarse una vez o más al día, a la semana, al mes o al año, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la materia pueden estimar fácilmente índices de repetición para una dosificación basándose en los tiempos de permanencia medidos y las concentraciones del fármaco en fluidos o tejidos corporales. Después de un tratamiento con éxito puede ser deseable someter al paciente a una terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición de la patología, en la que el anticuerpo se administra en dosis de mantenimiento que varían de 0,01  $\mu$ g a 100 g por kg de peso corporal una vez o más al día, hasta una vez cada 20 años. Los ejemplos de cantidades eficaces incluyen 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100 g/kg de peso corporal.

Son comunes a todas las proteínas HAS las secuencias hidrófobas en sus estructuras que predirían una asociación a membrana plasmática. Los grupos previstos de los dominios transmembrana se observan en cualquier extremo de la proteína, que varía de 1-2 en número en el amino terminal y de 4-6 en el extremo carboxilo terminal. La longitud del bucle citosólico para los miembros eucariotas varía de 307 a 328 restos y contiene probablemente los dominios catalíticos para dirigir la síntesis de HA.

Basándose en la secuencia de aminoácidos prevista para HAS1, determinada por Itano y Kimata, *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 222: 816-821, 1996, se diseñaron y sintetizaron tres péptidos antigénicos cortos mediante síntesis de aminoácidos en fase sólida, y se purificaron por cromatografía de alta presión de fase inversa. Se determinó que los péptidos tenían una pureza del 99,9% como se demostró por espectrometría de masas. La producción, purificación, conjugación con toxoide de difteria (DT) y el ensayo de pureza de los péptidos se realizaron por Chiron Mimitopes (Melbourne, Victoria, Australia). La secuencia de cada uno de los tres péptidos de inmunización se denominó HAS418 (INT-1), HAS419 (EX-1) y HAS421 (INT-2). Estos péptidos de inmunización fueron el objeto de una solicitud de patente anterior por los inventores (PCT/AU04/01383; WO05/035548).

Usando un programa de predicción transmembrana (TM predict) cada sintasa contiene 6-7 supuestos dominios transmembrana. De acuerdo con datos preliminares basados en la reactividad de los antisueros de HAS contra células no malignas tales como fibroblastos dérmicos, puede proponerse un supuesto modelo de cómo la sintasa se orienta en la membrana plasmática (véase la Figura 2). El epítipo EX-1 está localizado entre los TMD 5 y 6. Como el TMD es la última secuencia hidrófoba en la sintasa, éste sitúa al extremo carboxilo terminal dentro del citoplasma. Se muestra la topología prevista de la hialuronano sintasa con localizaciones de los epítipos para los antisueros de HAS.

En el trabajo que conduce a la presente invención, se observó que los anticuerpos contra EX-1, INT-1 e INT-2 eran capaces de afectar a la actividad de las diferentes isoformas de HAS en células normales y/o malignas; a pesar del hecho de que, basándose en la secuencia de aminoácidos prevista (Figura 1), se esperaba que estos anticuerpos afectasen únicamente a la actividad de HAS 1. Además, se descubrió que la topología de la HA sintasa de células no malignas parecía concordar con la topología prevista, sin embargo, sorprendentemente, en células de cáncer de mama era evidente una topología alterada. Estos datos garantizaban una evaluación adicional de anticuerpos inhibidores específicos contra nuevos epítipos de HAS que podrían actuar potencialmente como inhibidores terapéuticos selectivos de la síntesis de hialuronano, conduciendo por lo tanto a nuevas terapias para el cáncer. Por lo tanto, la HAS, y en particular la HAS 1, 2 y/o 3, representan dianas farmacológicas útiles.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos no limitantes.

### Ejemplo 1

#### **Producción de antisuero de HAS**

Basándose en la secuencia de aminoácidos prevista para HAS1, (Itano y Kimata, 1996) se diseñaron tres péptidos antigénicos cortos, y se sintetizaron mediante síntesis de aminoácidos en fase sólida y se purificaron mediante cromatografía de alta presión de fase inversa. Se determinó que los péptidos tenían una pureza del 99,9% como se demostró por espectrometría de masas. La producción, purificación, conjugación con toxoide de difteria (DT) y el ensayo de pureza de los péptidos se realizaron por Chiron Mimitopes (Melbourne, Australia). La secuencia de cada péptido de inmunización se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2:

<b>Secuencias y localización de péptidos de inmunización</b>			
<b>Péptido de inmunización</b>	<b>Secuencia de aminoácidos</b>	<b>Localización supuesta en la topología de HAS</b>	
		<b>Intracelular</b>	<b>Extracelular</b>
<b>HAS418 (INT-1)</b>	<u>AARGPLDAATCRALLYPRARV</u> (SEC ID N°: 1) <b>49→58 'Cys' 94→103</b>	[	
<b>HAS419 (EX-1)</b>	<u>GGLVRSVAHEA</u> (SEC ID N°: 2) <b>480→490</b>		[
<b>HAS421 (INT-2)</b>	<u>GAYREVEAEDPGRLAVE</u> (SEC ID N°: 3) <b>146→162</b>	[	

**Nota: por favor, remítase al alineamiento de aminoácidos para las localizaciones de las secuencias de péptidos de inmunización en HAS1 y a su relación entre HAS2 y 3. Estas secuencias no se alinean con ningún motivo que se haya identificado como esencial para la actividad de la hialuronano sintasa.**

Ovejas de cruce de Border Leicester Merino se inyectaron por vía intramuscular en dos sitios con dos péptidos (0,2-0,5 mg) disueltos en adyuvante completo de Freund, y de nuevo dos semanas después en adyuvante incompleto de Freund. El día 35 se extrajo sangre de las ovejas y el suero se separó por centrifugación y se almacenó a -20°C. Todos los sueros recogidos se ensayaron con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para anticuerpos específicos para el péptido y la proteína transportadora. El péptido de inmunización se acopló a gel de tripropil-Sepharose 6B (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) por activación con bromuro de cianógeno y los anticuerpos específicos se extrajeron del antisuero de HAS de oveja policlonal por cromatografía de afinidad. En resumen, se mezclaron 5 ml de suero con 3 ml de PBS y se mezclaron con resina de afinidad/ligando durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de tres lavados de 5 ml de PBS. Los anticuerpos se eluyeron en glicina 0,1 M pH 2,8 y se neutralizaron inmediatamente a pH 7,2 por adición de NaOH 0,1 M.

Después, los anticuerpos policlonales de HAS se concentraron en un concentrador celular Amicon equipado con un filtro YM30 Diaflo. La concentración de proteína de cada anticuerpo purificado por afinidad se determinó mediante el ensayo BCA (Pierce, Estados Unidos). La esterilidad de los anticuerpos usados en inmunohistoquímica o inmunotransferencia se aseguró por adición de azida sódica al 0,1% p/v antes del almacenamiento a -20°C en alícuotas. Los anticuerpos destinados a la adición a cultivos celulares se almacenaron a -20°C sin azida.

### Ejemplo 2

#### **Caracterización funcional del antisuero de HAS**

Preparaciones de membrana plasmática bruta iniciales aisladas de glóbulos blancos se resolvieron en un gel de acrilamida al 10% en condiciones tanto reductoras como no reductoras. El análisis de transferencia de Western confirmó que en condiciones reductoras los tres anticuerpos detectaban una sola banda de una masa molecular aproximada de 60.000 Da que concuerda con el peso molecular esperado de una hialuronano sintasa.

En condiciones no reducidas se detectaba una sola banda fuera del rango de los patrones de peso molecular. Esta banda se estima que es superior a 210.000 Da y puede representar proteínas accesorias necesarias para dirigir el suministro de precursores de HA, en particular los requerimientos de UDP-glucuronato y UDP-N-acetilglucosamina para la síntesis de HA, remítase a la Figura 3.

**Ejemplo 3****Efecto de anticuerpos de HAS sobre el índice de crecimiento y la síntesis de hialuronano en cultivos de fibroblastos dérmicos**

Se examinó el efecto de cada anticuerpo de hialuronano sintasa sobre fibroblastos dérmicos en cultivo. Se establecieron cultivos en monocapa de tres líneas celulares de fibroblastos dérmicos en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos (17.000 células/ml de medio/pocillo). Las células se cultivaron en BME complementado con FCS al 10% v/v, glutamina 1,9 mM, HEPES 20 mM, bicarbonato al 0,09% p/v y una solución de antibiótico/antimicótico que consistía en 100 unidades de penicilina, 0,1 mg de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%. Después de un periodo de asentamiento de 24 horas se determinó la eficacia de siembra en placa media y el número de células por tratamiento con tripsina de 4 pocillos en tripsina al 0,25% (p/v)/EDTA en PBS y cuantificación en un contador coulter modelo ZM. Los anticuerpos de HAS 418, 419, 421 e IgG de oveja se diluyeron en el medio de cultivo a una concentración final de 300 µg/ml y se aplicaron a los pocillos restantes, el volumen final por pocillo era de 1 ml. Después de eso, se recogió el medio y se estimaron los recuentos de células a los días 1, 2, 4 y 8. El medio de cultivo se almacenó a 4°C con azida sódica al 0,02% como conservante hasta que el HA se cuantificó con el ensayo radiométrico de HA.

El índice de crecimiento de fibroblastos dérmicos no se veía afectado en presencia de HAS418 (INT-1) o 421 (INT-2) cuando se comparaba con la IgG de oveja o los controles sin anticuerpos. Estos resultados concordarían con la suposición de que los epítomos de HAS418 y 421 están localizados intracelularmente. La cantidad de HA sintetizado en todas las condiciones experimentales era inferior en una de las tres líneas celulares ensayadas (Figura 4), lo que probablemente refleja el estado de confluencia de esta línea celular particular cuando se examinaba el índice de crecimiento. La velocidad de síntesis de hialuronano es superior en cultivos celulares activamente en proliferación que en cultivos de alta densidad con menores divisiones celulares. El resultado más sorprendente era el efecto inhibitorio de HAS419 (EX-1) sobre la síntesis de hialuronano (Figuras 4 y 5). La síntesis de hialuronano en cultivos de fibroblastos dérmicos se inhibía completamente después de 24 horas de incubación con 300 µg/ml de HAS419. Los números de células disminuían progresivamente a lo largo de 1 ó 2 a 8 días en todos los grupos. Esto estaba correlacionado con una caída progresiva en el número de células. Esto indicaría que el epítomo para HAS419 (EX-1) en fibroblastos dérmicos está localizado en la superficie celular. Los otros anticuerpos de hialuronano sintasa, HAS418 (INT-1) y 421 (INT-2) no ejercían ningún efecto inhibitorio de la síntesis de HA ni afectaban al índice de crecimiento. El sistema experimental usado para estos experimentos era sin complemento para evitar cualquier lisis celular aguda resultante de la interacción de antígeno-anticuerpo con el complemento.

Para confirmar la orientación de los epítomos de anticuerpo de HAS se realizaron trabajos adicionales utilizando el análisis de separador de células activadas por fluorescencia (FACS) sobre fibroblastos dérmicos no permeabilizados. Las Figuras 6a, 6b y 6c muestran un resultado representativo de representaciones de histograma típicas obtenidas cuando los fibroblastos dérmicos se hacen reaccionar con INT-1,2 y EX-1, respectivamente.

Los resultados de FACS indican que ambos epítomos, INT-1 e INT-2, no son reactivos en fibroblastos dérmicos no permeabilizados, sugiriendo que estos epítomos están localizados intracelularmente. Esto se correlaciona bien con los estudios funcionales realizados en los que los anticuerpos de INT-1 y 2 no alteraban el índice de crecimiento ni la síntesis de hialuronano. Por el contrario, se demostró que el epítomo para EX-1 alteraba la síntesis de HA y causaba una reducción en el número de células y reaccionaba positivamente cuando se analizaba por FACS. Esto indica que el epítomo para EX-1 está localizado en la superficie celular.

Cuando se consideran los dominios transmembrana (TMD) de la hialuronano sintasa, el epítomo para EX-1 se encuentra entre TMD 5 y 6. Esto sitúa el bucle entre estos dos TMD en el exterior de la célula. Además, como el TMD 6 es el último segmento hidrófobo, sitúa el extremo carboxilo terminal intracelularmente.

**Ejemplo 4****Efecto de anticuerpos de HAS sobre el índice de crecimiento y la síntesis de hialuronano en cultivos de líneas celulares de cáncer de mama**

Se seleccionaron las líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano aneuploide MDA-MB-468 y MDA-MB-231 basándose en la expresión diferencial de receptores de HA, la capacidad invasiva/metastásica y el grado de producción de HA.

Las líneas celulares se sembraron en placas de 24 pocillos. Se dejó que las células se adhiriesen durante 24 h antes de la adición de medios específicos de células que contenían FCS sin tratar al 10% o FCS de complemento inactivado al 10% con adición de 300 µg/ml de antisuero de INT-1, INT-2, EX-1 e IgG de oveja (control de isotipo de especie). Las células se recogieron a cada punto temporal de 1, 2, 4, 6 y 8 días después del establecimiento de los cultivos, y se determinó el número de células usando el procedimiento de contador Coulter automático. Los medios de cada cultivo de ensayo y de control se retuvieron y se ensayaron cuantitativamente para determinar la presencia de HA. La concentración del HA en los medios de control (sin contacto celular) se usó para determinar los niveles endógenos de HA en el medio de cultivo y se restó de cada determinación de HA posterior.

Se realizó la titulación inicial de anticuerpos de HAS sobre MDA-MB-468 y 231, donde las células se incubaron en presencia de cada anticuerpo durante 24 horas, después de lo cual se estimó el número de células. El intervalo de titulación de cada anticuerpo era de 10-10.000 ng/ml. Se observó una tendencia similar para cada línea celular, por lo tanto se muestran los resultados para MDA-MB-231.

5 A partir de la Figura 7 obsérvese que, además del anticuerpo contra el epítipo EX-1, INT-2 inhibía la proliferación celular y causaba una disminución marcada en el número de células. Esto era un indicio de que la topología de membrana de la hialuronano sintasa en el estado maligno es diferente de la observada en células no malignas, tales como fibroblastos dérmicos. Estas observaciones se tradujeron en una relevancia funcional cuando se realizaron experimentos adicionales en los que ambas líneas celulares de cáncer de mama se incubaron con 300 µg/ml de cada anticuerpo. Las células se recogieron a cada punto temporal y se estimó el número de células usando un contador coulter automático. Los medios de cada cultivo de ensayo y de control se retuvieron y después se ensayaron para determinar la presencia de HA. La Figura 8 demuestra claramente que, además de EX-1, la producción de HA en ambas líneas celulares de cáncer de mama ensayadas también se inhibía por INT-2, pero no por INT-1.

15 La inhibición de la síntesis de HA daba como resultado el desprendimiento de fibroblastos viables de cáncer de mama y no malignos. El examen microscópico de las células cultivadas mostró diferencias morfológicas distintas entre células, 24 horas después de la adición de los anticuerpos. Los anticuerpos contra los diferentes epítipos de sintasa daban como resultado cambios celulares variados. Por ejemplo, el anticuerpo contra INT-1 no ejercía ningún cambio radical en la morfología celular. Los anticuerpos contra INT-2 y EX-1 daban como resultado características como encogimiento de las células, formación de vesículas unidas a membrana y amplia formación de bullas de la membrana plasmática y nuclear. Se muestran imágenes capturadas a partir de MDA-MB-231 cultivadas en presencia de cada anticuerpo en la Figura 9.

25 Obsérvese el aspecto de las células cultivadas en presencia de INT-2 y EX-1 donde son claramente visibles células hinchadas, así como hinchamiento de la membrana nuclear. Era una dirección lógica determinar el estado de la viabilidad de estas células. Se realizó ensayo de tinción con DAPI (para detectar la apoptosis nuclear) y fragmentación de ADN. Estos resultados se muestran a continuación en la Figura 10.

30 Cuando se realizaban tinciones con DAPI tanto en células desprendidas como unidas cultivadas en presencia de los antisueros de HAS, los núcleos no presentaban fragmentación de ADN (Figura 10; paneles A y B). Esta observación también se confirmó cuando se extrajo ADN de estas células y se resolvió en técnicas electroforéticas convencionales. No se observó fragmentación de ADN (Figura 11; paneles A y B).

Para confirmar la reactividad celular de los antisueros de HAS contra líneas celulares de cáncer de mama se empleó FACS de una forma idéntica a cuando se caracterizaron inicialmente fibroblastos dérmicos. También se evaluaron dos líneas celulares de cáncer de mama adicionales, MDA-MB-435 y ZRL-75-1, para determinar su reactividad a los antisueros de HAS.

35 Nota: Cuando los histogramas se presentan con representaciones rellenas en gris esto representa la reactividad con el anticuerpo de HAS, y la representación no rellena el control de anticuerpo correspondiente. Cuando las representaciones se presentan en líneas negras, éstas representan la fluorescencia de fondo según se midió a partir del control de secundario-FITC solamente. Las representaciones verdes representan la reactividad de cada anticuerpo de HAS contra las líneas celulares de cáncer de mama citadas. Los datos de FACS obtenidos de las 4 líneas celulares de cáncer de mama ensayadas sugieren firmemente que en el estado maligno los epítipos para EX-1 e INT-2 se expresan extracelularmente.

**Ejemplo 5**

**Reactividad cruzada de los antisueros de HAS con diferentes isoformas de HAS**

45 Se ha usado RT-PCR a tiempo real para caracterizar el nivel de ARNm para cada una de las líneas celulares de cáncer de mama mencionadas anteriormente. También se ha realizado una RT-PCR comparativa junto con el análisis de transferencia de Northern para caracterizar la expresión de isoforma de HAS en fibroblastos dérmicos. Estos resultados se resumen en la Tabla 3.

50 **Tabla 3: Cuantificación de la expresión de isoforma de HAS y reactividad con antisueros de HAS en células malignas y no malignas. La expresión de HAS para líneas celulares de cáncer de mama se expresa como la diferencia en veces respecto a la línea celular menos invasiva (MDA-MB-453). Los datos de transferencia de Northern de fibroblastos dérmicos demuestran altos niveles de transcritos para HAS2 y niveles muy reducidos para HAS3. ND: no detectado**

Línea celular	Expresión de gen de sintasa			Reactividad con antisueros de HAS (datos de FACS)		
	HAS1	HAS2	HAS3	EX-1	INT-1	INT-2
MDA-MB-231	<b>ND</b>	<b>15</b>	<b>1</b>	<b>SÍ</b>	<b>NO</b>	<b>SÍ</b>

(continuación)

Línea celular	Expresión de gen de sintasa			Reactividad con antisueros de HAS (datos de FACS)		
	HAS1	HAS2	HAS3	EX-1	INT-1	INT-2
MDA-MB 468	<b>ND</b>	<b>0,1</b>	<b>3</b>	<b>SÍ</b>	<b>NO</b>	<b>SÍ</b>
MDA-MB 435	<b>ND</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>SÍ</b>	<b>NO</b>	<b>SÍ</b>
ZRL-75-1	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>0,5</b>	<b>SÍ</b>	<b>NO</b>	<b>SÍ</b>
Fib. Dérmicos	<b>ND</b>	<b>++++</b>	<b>+</b>	<b>SÍ</b>	<b>NO</b>	<b>NO</b>

### Referencias

- Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988
- 5 Delpech y col, J. Int. Med. 242: 41-48, 1997
- Fulop, Arch. lochem. lophys. 337: 261-266, 1997
- Itano y Kimata, Biochem. Biophys. Res. Comm. 222: 816-821, 1996
- Kennet y col, (eds.), Plenum Press, Nueva York, 1980
- Knudson y col, The Biology of Hyaluronan 143: 150-169, 1989
- 10 Knudson y Knudson, FASEB J. 7: 1233, 1993
- Knudson, Am. J. Pathol 148: 1721-1726, 1996
- Laurent y Fraser, FASEB J 6: 2397-2404, 1992
- Rooney y col, Int. J. Cancer 60: 632-636, 1995
- Ruoslahti y Yamaguchi, Cell 64: 867-869, 1991
- 15 Toole, J. Internal Medicine 242: 35-40, 1981
- Udabage y col, Cancer Res 65: 6139-6150, 2005
- Weissman y Meyer, J. Am. Chem. Soc. 76: 1753, 1954



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo terapéutico para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer, en el que dicho anticuerpo terapéutico se dirige a un epítipo de hialuronano sintasa (HAS), en el que dicho epítipo comprende una secuencia de aminoácidos representada por GAYREVEAEDPGRLAVE (INT-2), o una secuencia que contiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas de INT-2.
2. El anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo terapéutico se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno.
- 10 3. El anticuerpo terapéutico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la HAS se selecciona del grupo que consiste en las isoformas HAS I, HAS II y HAS III.
4. El anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la isoforma es HAS II.
5. El anticuerpo terapéutico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el cáncer es cáncer de mama.
- 15 6. Uso del anticuerpo terapéutico como se especifica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
7. Uso del anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el cáncer es cáncer de mama.
8. Composición o formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo terapéutico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 20 9. Composición o formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento del cáncer asociado con HA, en el que el cáncer es cáncer de mama.

ES 2 393 210 T3

HAS1 MRQQDAPKPTPAARRCSGLARRVLTIAFALLILGLMTWAYAAGVPLASDRYGLLAFGLYG  
HAS2 -----MHCERFLCILRIIGTTLFGVSLLLGITAAYIVGYQFIQTDNYYFSFGLYG  
HAS3 -----MPVQLTTALRVVGTSLFALAVLGGILAAYVTGYQFIHTEKHYSFGLYG  
: \* : \* \* . : \* : \*\* . \* : : \*\*\*\*\*

HAS1 AFLSAHLVAQSLFAYLEHRRVAAAAR=GPLDAATARSVALTISAYQEDPAYLRQCLASAF  
HAS2 AFLASHLIIQSLFAFLEHRKMKKS---LETFIKLNKTVALCIAAYQEDPDYLRKCLQSVK  
HAS3 AILGLHLLIQSLFAFLEHRRMRAGQALKLPSPRRGSVALCIAAYQEDPDYLRKCLRSAQ  
\* : \* . \*\* : \*\*\*\*\* : \*\*\*\*\* : : : \*\*\* \* : \*\*\*\*\* \*\*\* : \* \* . :

HAS1 ALLYPRARLRVLMVVDGNRAEDLYMVDMFREVFADDP-ATYVWDGNYHQWEPAAAGAV  
HAS2 RLTYP--GIKVVVIDGNSEDDLYMMDIFSEVMG-RDKSATYIWKNFHE-----  
HAS3 RISFP--DLKVVVVVDGNRQEDAYMLDIFHEVLGGTEQAGFFVWRSNFHE-----  
: \* : \* : \* : \* \* : \* \* : \* \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \*

HAS1 GAGAYREVEAEDPGRLAVEALVRTRRCVVAQRWGGKREVMYTAFAKALGDSVDYVQVCDS  
HAS2 -KGPGETDESHKESQHVTLVLSNKSICIMQKWGGKREVMYTAFRALGRSDYVQVCDS  
HAS3 -AGEGETEASLQEGMDRVRDVRRASTFSCIMQKWGGKREVMYTAFAKALGDSVDYVQVCDS  
\* . : . . \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \*

HAS1 DTRLDPMALLELVRVLEDDPRVGAVGGDVRIILNPLDSWVSFLSSLRYWVAFNVERACQSY  
HAS2 DTMLDPASSVEMVKVLEEDPMVGGVGGDVQILNKYDSWISFLSSVRYWMAFNIERACQSY  
HAS3 DTVLDPACTIEMLRVLEEDPQVGGVGGDVQILNKYDSWISFLSSVRYWMAFNVERACQSY  
\* \* \* \* . : \* : \* : \* : \* \* . \* : \* : \* : \* \* \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \*

HAS1 FHCVSCISGPLGLYRNNLLOQFLEAWYNQKFLGTHCTFGDDRHLTNRMLSMGYATKYTSR  
HAS2 FGCVQCISGPLGMYRNSLLHEFVEDWYNQEFMGNQCSFGDDRHLTNRVLSLGYATKYTSR  
HAS3 FGCVQCISGPLGMYRNSLLOQFLEDWYHQKFLGSKCSFGDDRHLTNRVLSLGYRTKYTSR  
\* \* . \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \*

HAS1 SRCYSETPSSFLRWLSQOTRWSKSYFREWLYNALWHRHAWMTYEAVVSGLFPFFVAAT  
HAS2 SKCLTETPIEYLRWLNQOTRWSKSYFREWLYNAMWFHKHHLWMTYEAITGFFPFFLIAT  
HAS3 SKCLTETPTKYLRWLNQOTRWSKSYFREWLYNSLWFHKHHLWMTYESVVTGFFPFFLIAT  
\* : \* : \* \* . : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \*

Figura 1A

ES 2 393 210 T3

```

HAS1      VLRLFYAGRPWALLWVLLCVQGVAlAKAAFAAWLRGCLRMVLLSLYAPLYMCGLLPakFL
HAS2      VIQLFYRGKIWNILLFLLTVQLVGLIKSSFASCLRGNIvMVFMSLYSVLYMSLLPAKMF
HAS3      VIQLFYRGRIWNILLFLLTVQLVGIKATYACFLRGNAEMIFMSLYSLLYMSLLPAKIF
          *::*** *: * :* .** ** *.: *:::*. *** *:::***: ***..*****::

HAS1      ALVTMNQSGWGTSGRRKLAANYVPLlPLALWALLLLGGLVRSVAHEARADWSGpSRAEA
HAS2      AIATINKAGWGTSGRKTIVvNFIgLIpVSVWFTILLGGVIFTIYKESKRPFs----ESKQ
HAS3      AIATINKSGWGTSGRKTIVvNFIgLIpVSIWVAVLLEGLAYTAYCQD--LFS----ETEL
          *:.*:::*****:.....*: *:::* :** *: : : : * : :

HAS1      YHLAAGAGAYVGYWVAMLTLYWVGVRRLCRRRTGGYRVQV--- (SEC ID N°: 4)
HAS2      TVLIVGTLlyAcYWMLLTlyVVLINkCGRRKKGQYDMVLDV (SEC ID N°: 5)
HAS3      AFLVSGAILyGcYWVALLMLyLAIARRCGKKPEQYSLAFaEV (SEC ID N°: 6)
          * *: * *** :* ** . : : : : .
    
```

**SÍMBOLOS DE CONSENSO:** "\*" significa que todos los restos en esa columna son idénticos en todas las secuencias en el alineamiento.

":" significa que se han observado sustituciones conservadas.

"." significa que se han observado sustituciones semiconservadas.

Las secuencias son de la base de datos Genebank (HAS1 N° de Referencia Q92839; HAS2 N° de Referencia Q92819, HAS3 N° de Referencia O00219)

Figura 1B

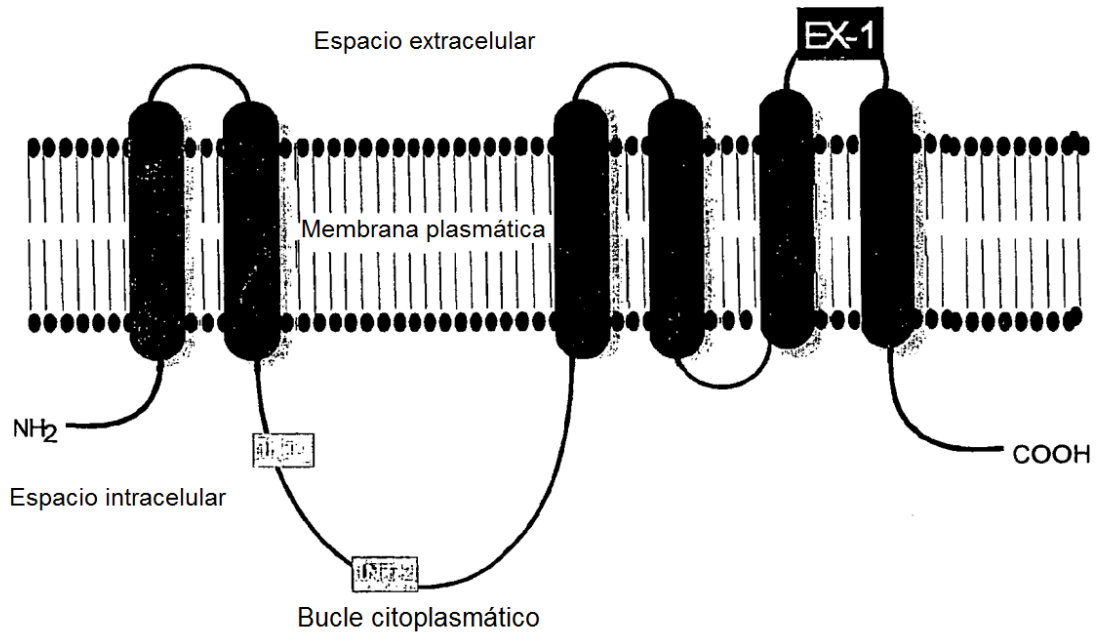
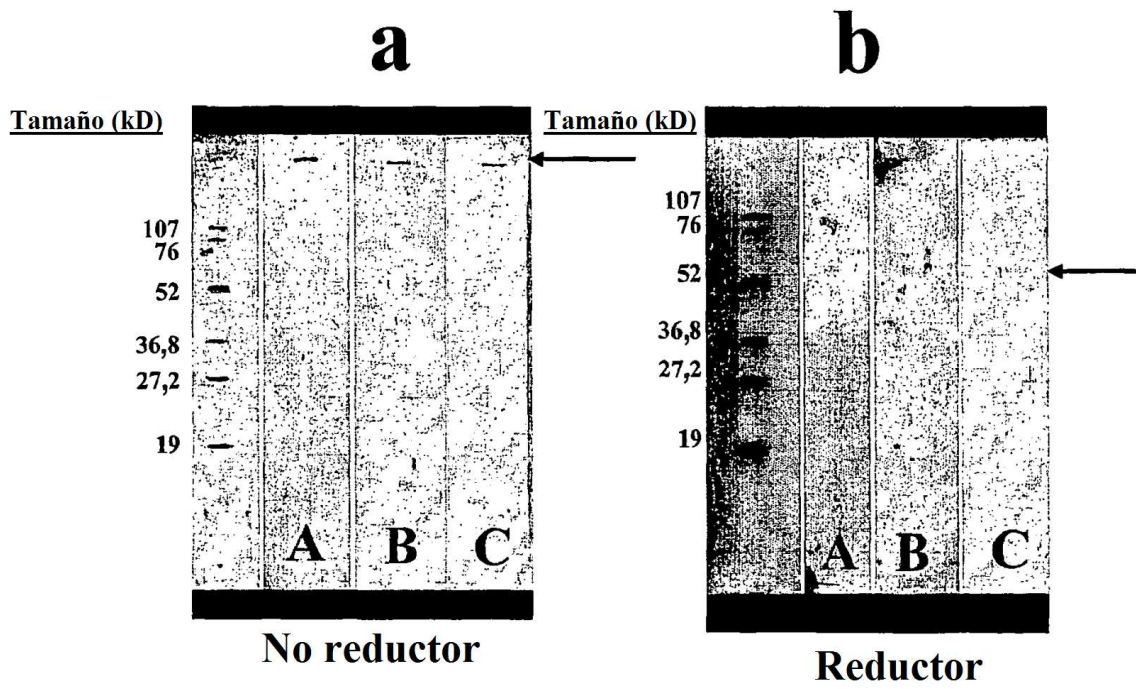


Figura 2



Las membranas se sondaron para reactividad de HAS (véanse a y b) para HAS418, HAS419 y HAS421 etiquetados como "A", "B" y "C" respectivamente.

Figura 3

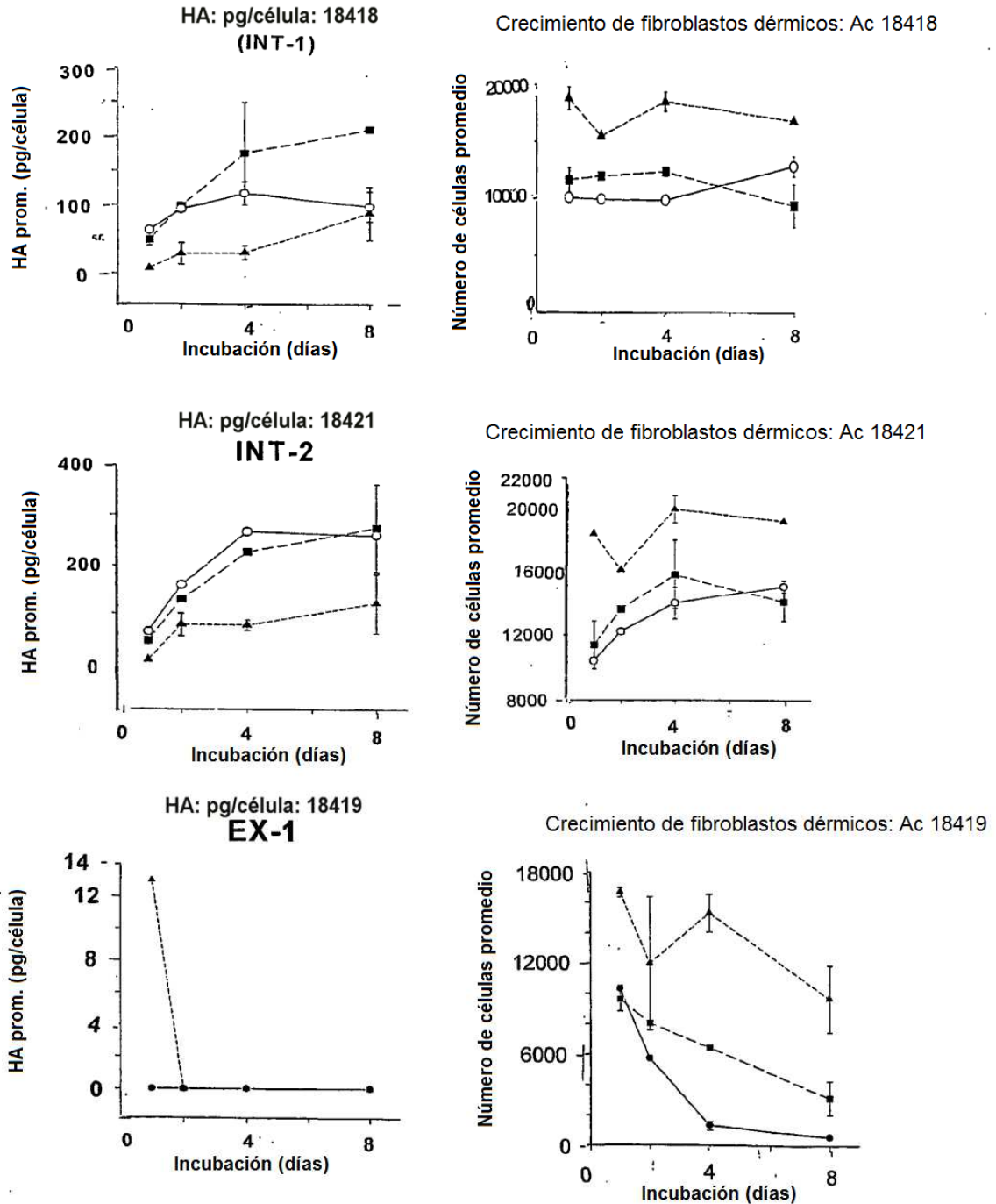
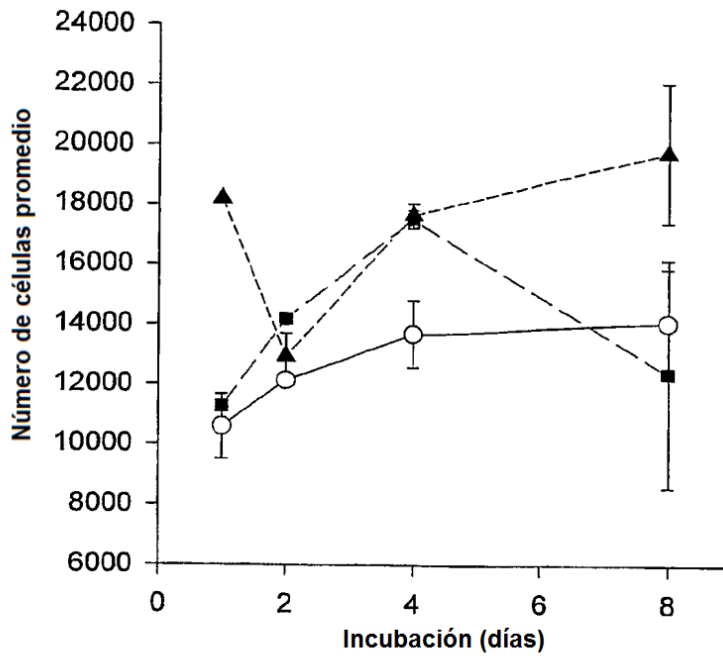


Figura 4

Crecimiento de fibroblastos dérmicos: IgG



HA: pg/célula:IgG  
CONTROL

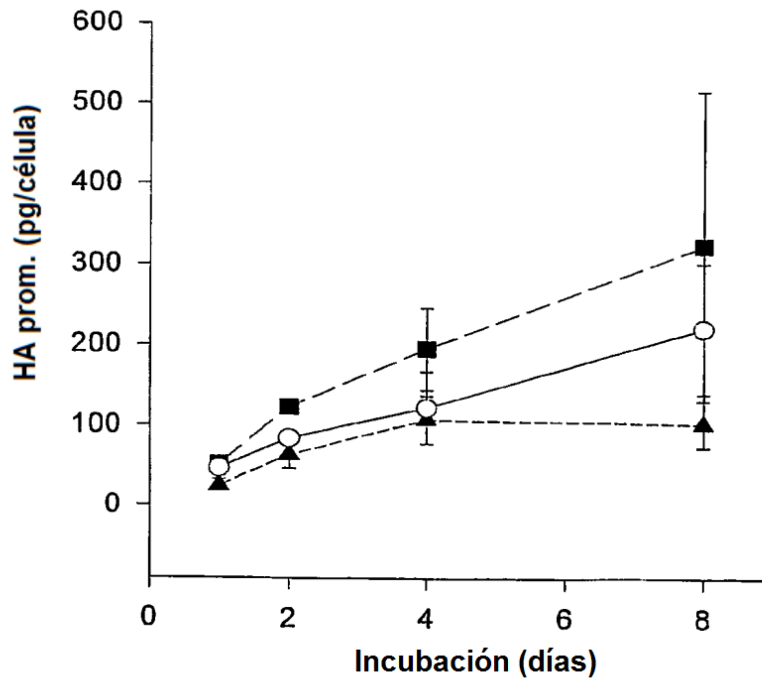


Figura 5

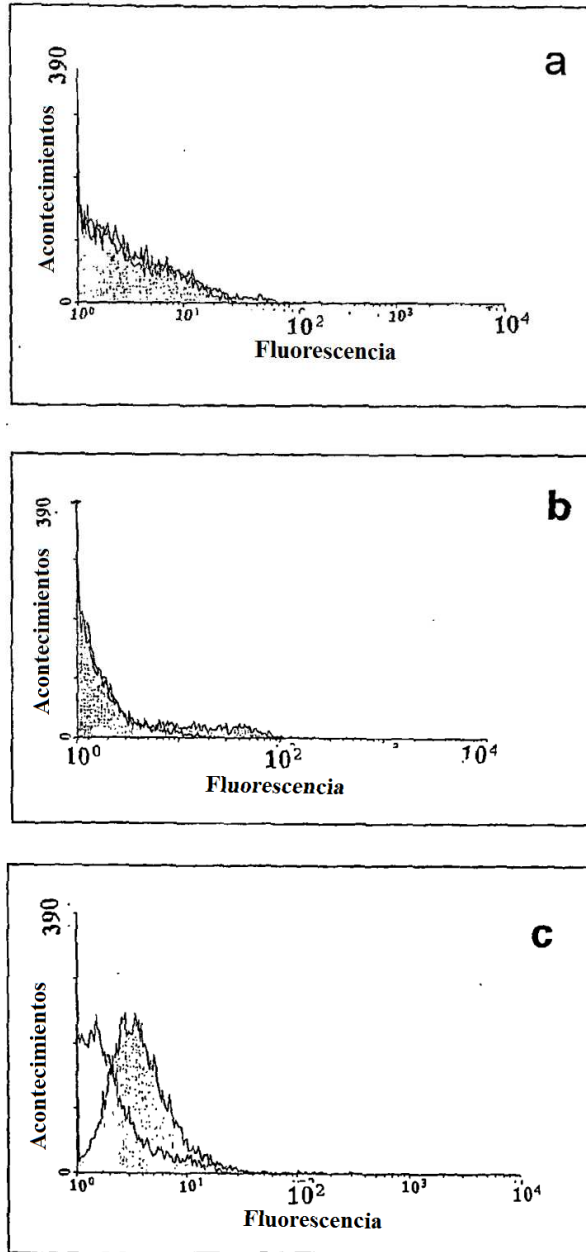


Figura 6



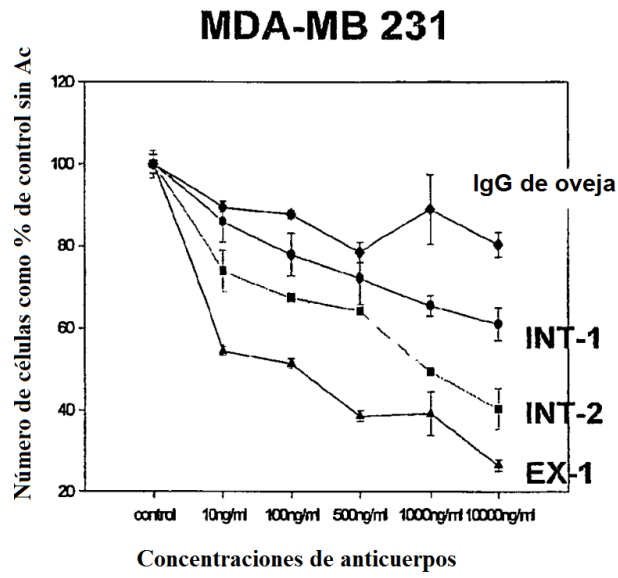


Figura 7

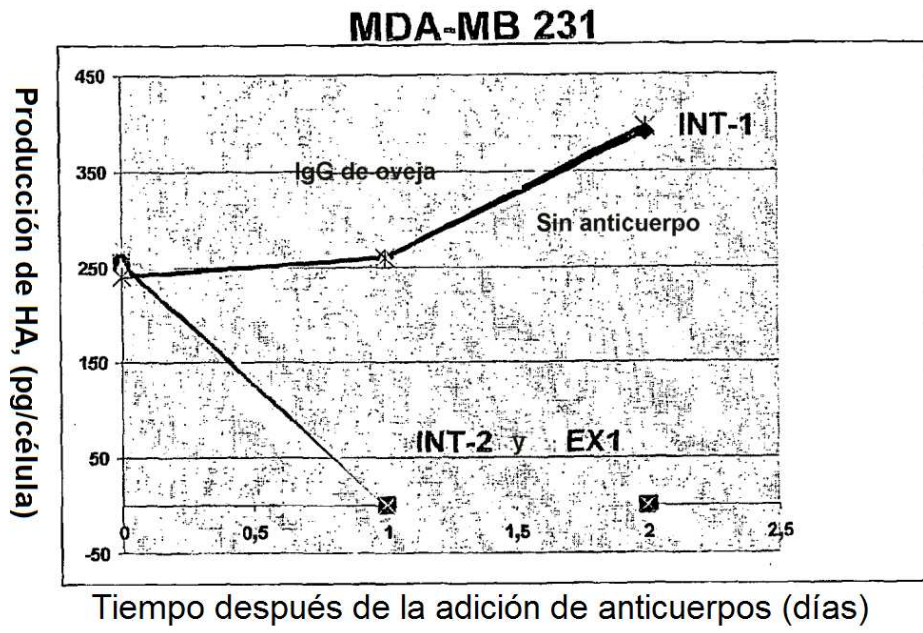


Figura 8

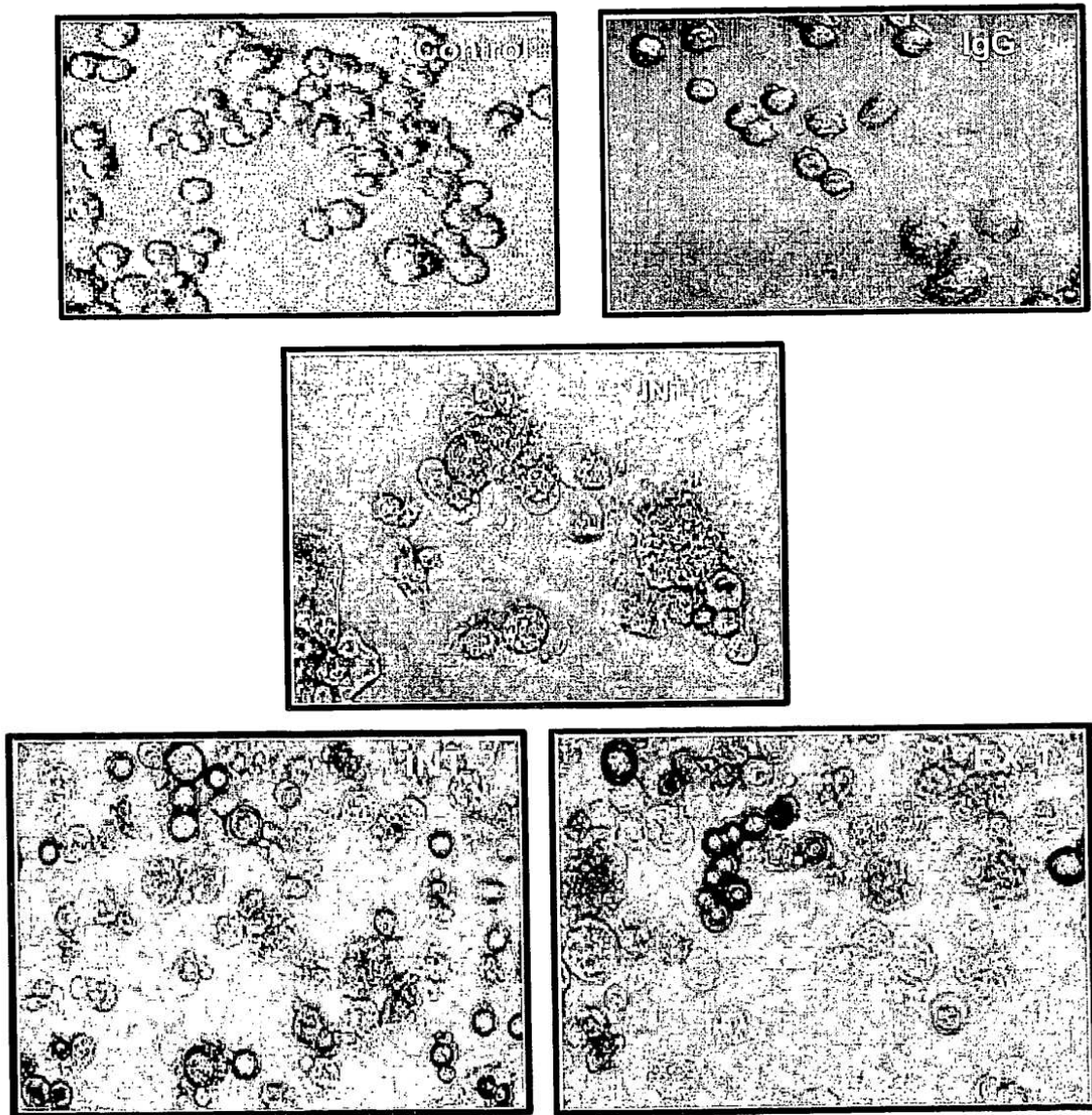
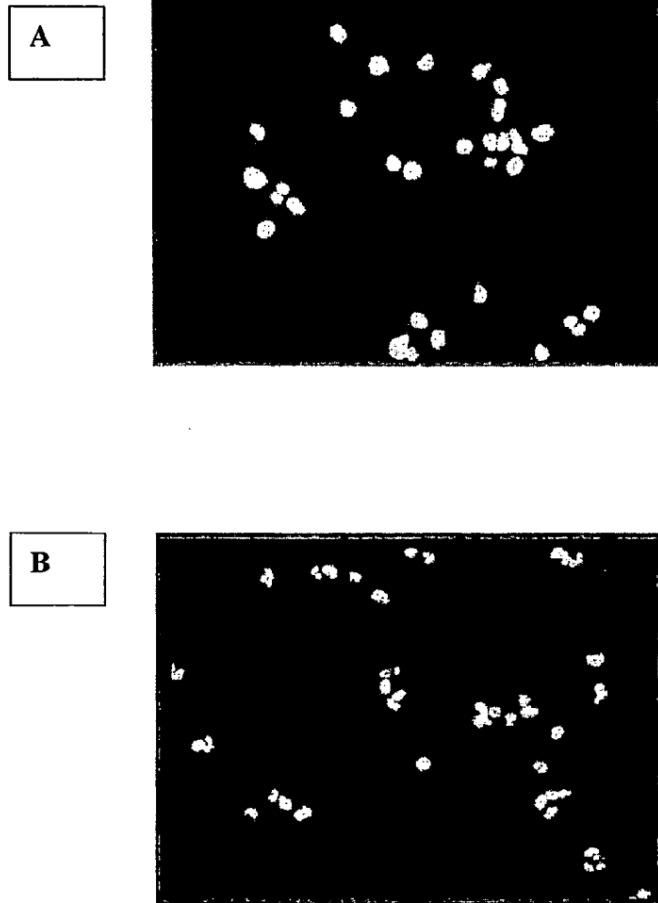


Figura 9



**Figura 10**

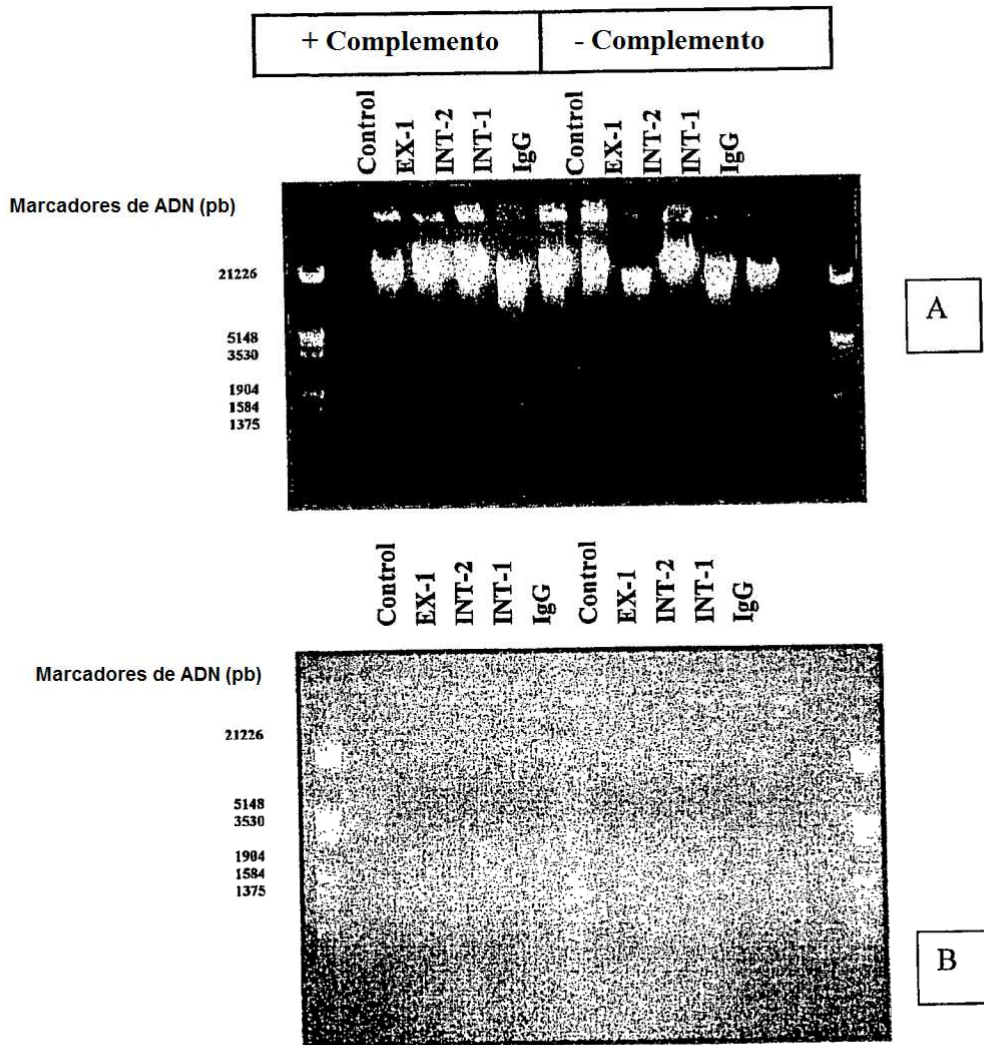


Figura 11

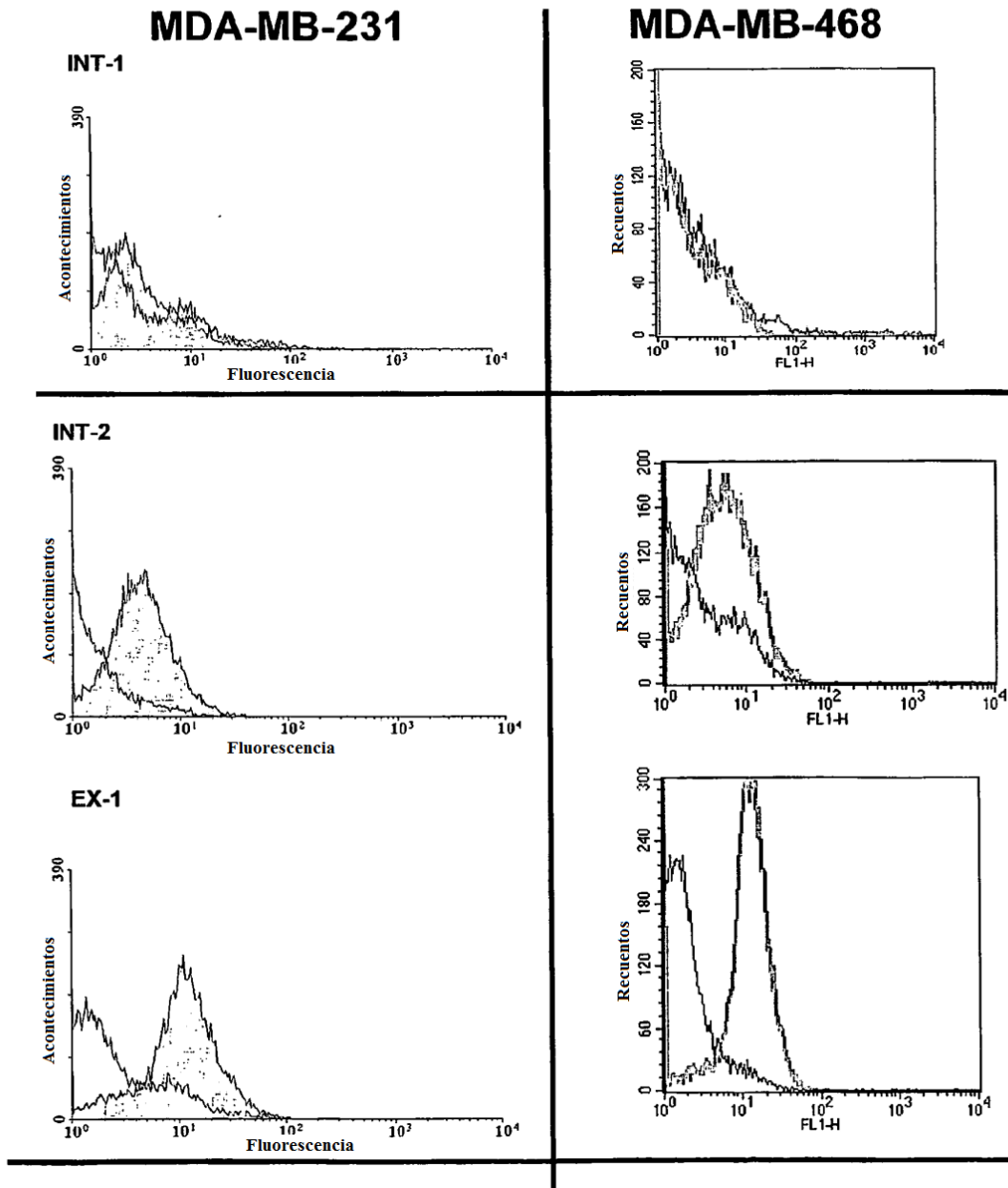
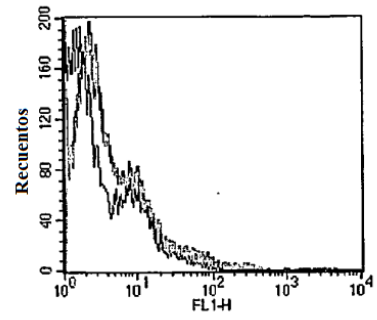
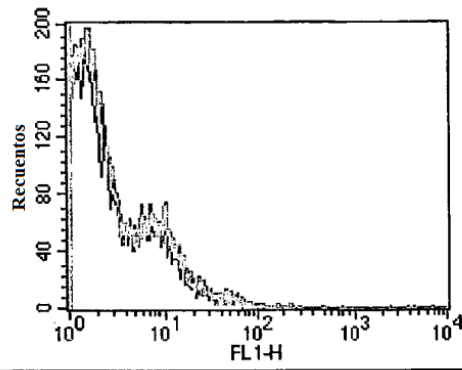


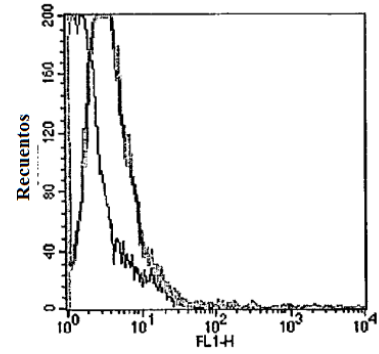
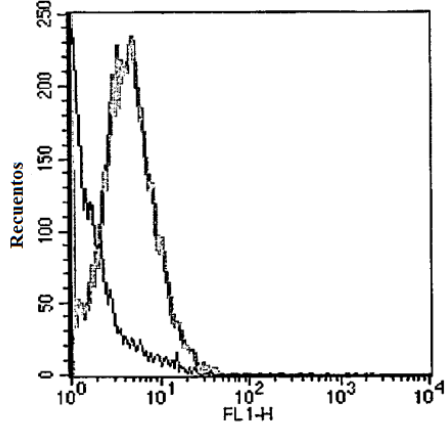
Figura 12



INT-1



INT-2



EX-1

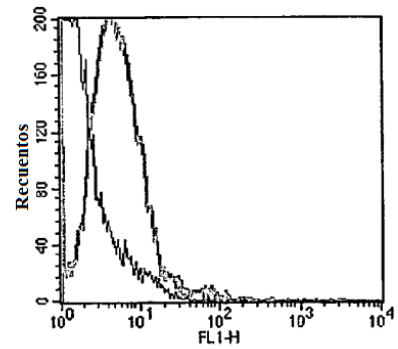
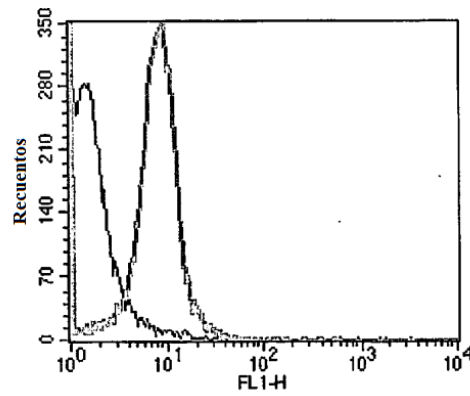


Figura 13