

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 643**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**A61K 49/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2004 E 04737787 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **22.03.2006 EP 1635869**

54 Título: **Anticuerpos que modifican la enfermedad cancerosa**

30 Prioridad:

**23.06.2003 US 603000**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**04.02.2013**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
GRENZACHERSTRASSE, 124  
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**YOUNG, DAVID, S. F.;  
FINDLAY, HELEN, P.;  
HAHN, SUSAN, E. y  
TAKAHASHI, MIYOKO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 394 643 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 que modifican la enfermedad cancerosa

5 Campo de la invención

Esta invención está relacionada con el uso de anticuerpos que modifican la enfermedad cancerosa (CDMAB) en procesos de diagnóstico.

10 La invención está relacionada además con ensayos de unión que utilizan los CDMAB de la presente invención.

Antecedentes

15 Cada individuo que presenta cáncer es único y posee un cáncer que es tan diferente de otros cánceres como la identidad de la persona. A pesar de esto, la terapia actual trata a todos los pacientes con el mismo tipo de cáncer, en el mismo estadio, de la misma manera. Al menos el 30 por ciento de estos pacientes fracasarán en su terapia de primera línea, conduciendo de esta manera a rondas de tratamiento adicionales y a un aumento de la probabilidad de fallo del tratamiento, metástasis, y finalmente, la muerte. Una aproximación superior de tratamiento podría ser la personalización de la terapia para un individuo particular. Solamente la terapia actual que se presta a la personalización es la cirugía. La quimioterapia y el tratamiento por radiación no pueden adaptarse al paciente, y la cirugía, en sí, en la mayoría de casos no es adecuada para producir la cura.

20 Con la llegada de los anticuerpos monoclonales, la posibilidad de desarrollar métodos para la terapia personalizada se convirtió en más realista ya que cada anticuerpo puede ser dirigido a un único epítipo. Además, es posible producir una combinación de anticuerpos que se dirigen a la constelación de epítipos que definen como único el tumor de un individuo particular.

25 Habiendo reconocido que una diferencia significativa entre las células cancerosas y las células normales es que las células cancerosas contienen antígenos que son específicos de las células transformadas, la comunidad científica ha mantenido durante mucho tiempo que los anticuerpos monoclonales pueden diseñarse para dirigirse específicamente a las células transformadas uniéndose específicamente a estos antígenos del cáncer; dando lugar así a la creencia de que los anticuerpos monoclonales pueden servir como "balas mágicas" para eliminar las células cancerosas.

30 Los anticuerpos monoclonales aislados de acuerdo con las enseñanzas de la invención han demostrado que modifican el proceso de la enfermedad cancerosa de una manera que es beneficiosa para el paciente, por ejemplo mediante la reducción de la carga tumoral, y diversamente se hará referencia en este documento como anticuerpos que modifican la enfermedad cancerosa (CDMAB) o anticuerpos "anticancerígenos".

35 En la actualidad, el paciente de cáncer habitualmente tiene pocas opciones de tratamiento. El planteamiento reglamentado con la terapia del cáncer ha producido mejoras en las tasas de supervivencia global y de morbilidad. Sin embargo, para el individuo en particular, la mejora de estas estadísticas no se correlacionan necesariamente con una mejora de su situación personal.

40 Por lo tanto, si una metodología propuesta permite al médico practicante tratar cada tumor independientemente de otros pacientes de la misma cohorte, esto permitiría el enfoque único de adaptar la terapia a una sola persona. Tal curso de terapia, idealmente, aumentará la tasa de cuidados, y producirá mejores resultados, satisfaciendo de esta manera una necesidad solicitada desde hace mucho tiempo.

45 Históricamente, el uso de anticuerpos policlonales ha sido utilizado con éxito limitado en el tratamiento de cánceres humanos. Los linfomas y las leucemias han sido tratados con plasma humano, pero había pocas remisiones prolongadas o respuestas. Además, existía una falta de reproducibilidad y ningún beneficio adicional en comparación con la quimioterapia. Los tumores sólidos tales como cánceres de mama, melanomas y carcinomas de células renales también han sido tratados con sangre humana, suero de chimpancé, plasma humano y suero de caballo con resultados correspondientemente impredecibles e ineficaces.

50 Ha habido muchos ensayos clínicos de anticuerpos monoclonales para tumores sólidos. En la década de 1980 había por lo menos 4 ensayos clínicos para el cáncer de mama humano que produjeron un único respondedor al tratamiento de al menos 47 pacientes que utilizaron anticuerpos contra antígenos específicos o basados en la selectividad del tejido. No fue sino hasta 1998 que hubo un ensayo clínico exitoso que utilizó un anticuerpo humanizado anti-her 2 en combinación con cisplatino. En este ensayo se consultaron 37 pacientes para cuyas respuestas alrededor de un cuarto tenía una tasa de respuesta parcial y la otra mitad tuvo progresión de la enfermedad leve o estable.

55 Los ensayos clínicos que investigan el cáncer colorrectal involucran anticuerpos contra ambas dianas de glucolípidos y glucoproteínas. Los anticuerpos tales como 17-1A, que tiene cierta especificidad para los

5 adenocarcinomas, ha sido objeto de ensayos clínicos de fase 2 en más de 60 pacientes con sólo 1 paciente con una respuesta parcial. En otros ensayos, el uso de 17-1A produjo solamente una respuesta completa y 2 respuestas menores entre 52 pacientes en los protocolos que utilizan ciclofosfamida adicional. Otros ensayos que implican 17-1A proporcionaron resultados que fueron similares. El uso de un anticuerpo monoclonal murino humanizado aprobado inicialmente para diagnóstico por imagen tampoco produjo regresión del tumor. Hasta la fecha no ha habido un anticuerpo que haya sido eficaz para el cáncer colorrectal. Del mismo modo se han obtenido resultados igualmente pobres para los cánceres de pulmón, cerebro, ovarios, páncreas, próstata y de estómago. Ha habido un éxito limitado en el uso de anticuerpo monoclonal anti-GD3 para melanoma. Por lo tanto, se puede observar que a pesar del éxito en estudios con animales pequeños que son un requisito previo para los ensayos clínicos humanos, los anticuerpos que se han probado hasta la fecha, han sido en su mayor parte, ineficaces.

Patentes anteriores

15 La Patente EE.UU. N° 5.750.102 describe un procedimiento en el que las células de un tumor de un paciente se transfectan con genes MHC que pueden ser clonados a partir de células o de tejido del paciente. Estas células transfectadas se utilizan para vacunar al paciente.

20 La Patente EE.UU. N° 4.861.581 describe un procedimiento que comprende las etapas de obtener anticuerpos monoclonales que son específicos de un componente celular interno de células neoplásicas y normales del mamífero pero no a los componentes externos, marcar el anticuerpo monoclonal, poner en contacto el tejido con anticuerpo marcado de un mamífero que ha recibido terapia para eliminar las células neoplásicas, y determinar la eficacia de terapia midiendo la unión del anticuerpo marcado al componente celular interno de las células neoplásicas en degeneración. En la preparación de anticuerpos dirigidos contra antígenos intracelulares humanos, el titular de la patente reconoce que la células malignas representan una fuente adecuada de dichos antígenos.

25 La Patente EE.UU. N° 5.171.665 proporciona un nuevo método y anticuerpo para su producción. Específicamente, la patente enseña la formación de un anticuerpo monoclonal que tiene la propiedad de unirse fuertemente a un antígeno proteico asociado a tumores humanos, por ejemplo, los de pulmón y de colon, mientras que la unión a las células normales se hace en un grado mucho menor.

30 La Patente EE.UU. N° 5.484.596 proporciona un método de terapia del cáncer que comprende la extirpación quirúrgica de tejido tumoral de un paciente humano con cáncer, tratar el tejido tumoral para obtener células tumorales, irradiar las células tumorales para ser viables pero no tumorogénicas, y utilizar estas células para preparar una vacuna para el paciente capaz de inhibir la recurrencia del tumor primario mientras que simultáneamente inhibe la metástasis. La patente enseña el desarrollo de anticuerpos monoclonales que son reactivos con los antígenos de superficie de células tumorales. Como se establece en la col. 4, líneas 45 y siguientes, los titulares de la patente utilizan células tumorales autóctonas en el desarrollo de anticuerpos monoclonales que expresan inmunoterapia específica activa en neoplasias humanas.

40 La Patente EE.UU. N° 5.693.763 muestra que un antígeno de glicoproteína característico de carcinomas humanos no depende del tejido epitelial de origen.

45 La Patente EE.UU. N° 5.783.186 señala a anticuerpos anti-Her2 que inducen apoptosis en células que expresan Her2, líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos, métodos de tratamiento del cáncer usando los anticuerpos y las composiciones farmacéuticas que incluyen dichos anticuerpos.

La Patente EE.UU. N° 5.849.876 describe nuevas líneas celulares de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales contra antígenos murinos purificados a partir de fuentes tumorales y de tejidos no tumorales.

50 La Patente EE.UU. N° 5.869.268 señala un método para generar un linfocito humano que produce un anticuerpo específico para un antígeno deseado, un método para producir un anticuerpo monoclonal, así como los anticuerpos monoclonales producidos por el método. La patente está particularmente dirigida a la producción de un anticuerpo monoclonal anti-HD humano útil para el diagnóstico y tratamiento de cánceres.

55 La Patente EE.UU. N° 5.869.045 está relacionada con anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, conjugados de anticuerpos e inmunotoxinas de cadena única que reaccionan con células de carcinoma humano. El mecanismo por el cual la función de estos anticuerpos es el doble, en que las moléculas son reactivas con antígenos de la membrana celular presentes en la superficie de los carcinomas humanos, y además en la que los anticuerpos tienen la capacidad de internalizar dentro de las células de carcinoma, con posterioridad a la unión, los hace especialmente útiles para formar conjugados anticuerpo-fármaco y anticuerpo-toxina. En su forma sin modificar los anticuerpos también manifiestan propiedades citotóxicas a concentraciones específicas.

60 La Patente EE.UU. N° 5.780.033 describe el uso de autoanticuerpos para terapia tumoral y profilaxis. Sin embargo, este anticuerpo es un autoanticuerpo antinuclear de un mamífero de edad avanzada. En este caso, el autoanticuerpo se dice que es un tipo de anticuerpo natural encontrado en el sistema inmune. Debido a que el autoanticuerpo procede de "un mamífero de edad avanzada", no hay ningún requisito de que el autoanticuerpo

realmente provenga del paciente a tratar. Además la patente describe autoanticuerpos naturales y monoclonales anti-nuclear de un mamífero de edad avanzada, y una línea de células de hibridoma que produce un autoanticuerpo monoclonal anti-nuclear.

## 5 Resumen

La invención está relacionada con las realizaciones tal como se define en las reivindicaciones.

10 Los presentes inventores han depositado previamente la patente de EE.UU. 6.180.357, titulada "Anticuerpos anti-cáncer individualizados específicos de paciente", dirigida a un proceso para seleccionar anticuerpos anticancerígenos personalizados individualmente, que son útiles en el tratamiento de una enfermedad cancerosa. Para el propósito de este documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpo monoclonal" (mAb) se pueden utilizar indistintamente y se refieren a la inmunoglobulina intacta producida por los hibridomas, inmunoconjugados y, según proceda, fragmentos de inmunoglobulina y proteínas recombinantes derivadas de inmunoglobulinas, tales como 15 inmunoglobulinas quiméricas y humanizadas, fragmentos F (ab') y F (ab')<sub>2</sub>, anticuerpos de cadena simple, regiones variables de inmunoglobulina recombinantes (Fv), etc. Además, está dentro del alcance de esta descripción conjugar modalidades quimioterapéuticas estándares, por ejemplo, radionucleidos, con el CDMAB descrito en este documento y concentrar el uso de dichos agentes quimioterapéuticos. El CDMAB también puede conjugarse a 20 toxinas, restos citotóxicos o enzimas, por ejemplo, enzimas conjugadas a biotina.

Esta solicitud utiliza el método para producir anticuerpos anti-cancerígenos específicas de pacientes como se enseña en la patente '357 para aislar líneas celulares de hibridoma que codifican anticuerpos monoclonales que 25 modifican la enfermedad cancerosa. Estos anticuerpos pueden hacerse específicamente para un tumor y hacer posible la personalización de la terapia del cáncer. Dentro del contexto de esta solicitud, los anticuerpos anticancerígenos que tienen las propiedades de matar las células (citotóxicos) o de inhibir el crecimiento celular (citostáticos) de aquí en adelante se refiere como citotóxicos. Estos anticuerpos se pueden utilizar para ayudar en la estadificación y el diagnóstico de un cáncer, y se pueden utilizar para tratar la metástasis del tumor.

La perspectiva de un tratamiento individualizado contra el cáncer provocará un cambio en la forma de tratar a un 30 paciente. Un escenario clínico probable es que se obtenga una muestra de tumor en el momento de la presentación, y almacenarla. De esta muestra, el tumor puede tipificarse dentro un panel de anticuerpos de modificación enfermedad cancerosa pre-existentes. El paciente será convencionalmente tratado, pero los anticuerpos disponibles pueden utilizarse además en el tratamiento del paciente. El paciente puede ser tratado inmediatamente con los anticuerpos existentes y / o puede producirse un panel de anticuerpos específicos para el tumor ya sea utilizando los 35 métodos descritos en el presente documento o mediante el uso de bibliotecas de presentación de fagos junto con los métodos de selección descritos en este documento. Todos los anticuerpos generados se añadirán a la biblioteca de anticuerpos anticancerígenos ya que existe una posibilidad de que otros tumores sean portadores de los mismos epítopos como el que está siendo tratado. Los anticuerpos producidos según este método pueden ser útiles para tratar la enfermedad cancerosa en cualquier número de pacientes que tienen cánceres que se unen a estos anticuerpos. 40

Usando sustancialmente el proceso de US 6.180.370, el anticuerpo monoclonal de ratón H460-16-2 se obtuvo siguiendo la inmunización de ratones con células de biopsia de tumor de pulmón de un paciente. El antígeno H460- 45 16-2 se expresa en la superficie celular de una amplia gama de líneas celulares humanas con orígenes de diferentes. La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (MB-231) fue sólo 1 de las 2 líneas celulares de cáncer analizadas que era susceptible a los efectos citotóxicos de H460-16-2.

El resultado de la citotoxicidad de H460-16-2 contra células MB-231 en cultivo se extendió además por su actividad anti-tumoral hacia estas células cuando se trasplantaron a ratones. En un modelo in vivo de cáncer de mama, las 50 células MB-231 humanas fueron implantadas bajo la piel del cuello de ratones inmunodeficientes, ya que son incapaces de rechazar las células de tumores humanos debido a la ausencia de ciertas células inmunes. Modelos preclínicos de tumores de xenoinjertos son considerados predictores válidos de la eficacia terapéutica. Los xenoinjertos en ratones crecen como tumores sólidos que desarrollan estroma, necrosis central y neovascularización. La línea celular de tumor mamario MB-231 ha sido analizada como modelo de xenoinjerto in vivo en ratones inmunodeficientes. La buena aceptación del injerto o "tasa de incorporación" de los tumores MB-231 y la sensibilidad de los tumores a los agentes quimioterapéuticos estándar lo han caracterizado como un modelo adecuado. La línea celular parental y las variantes de la línea celular han sido utilizados en modelos de tumores de xenoinjertos para evaluar una amplia gama de agentes terapéuticos. 55

60 En el modelo preventivo in vivo de cáncer de mama humano, se dio a los ratones H460-16-2 un día antes de la implantación de las células tumorales, seguido de inyecciones semanales durante un período de 7 semanas. El tratamiento con H460-16-2 fue significativamente ( $p < 0,0001$ ) más eficaz en la supresión del crecimiento tumoral durante el período de tratamiento de un anticuerpo control de isotipo, que era idéntico a H460-16-2 en tamaño y estructura, pero incapaz de unirse a células MB-231. Al final de la fase de tratamiento, los ratones que recibieron 65 H460-16-2 tenían tumores que crecieron tan sólo un 1,3 por ciento del grupo control. Durante el período de seguimiento tras el tratamiento, los efectos del tratamiento con H460-16-2 se mantuvieron y el volumen medio del

tumor en los grupos tratados siguió siendo significativamente menor que en los controles hasta el final de la fase de medición. Utilizando la supervivencia como medida de la eficacia de anticuerpos, se estimó que el riesgo de muerte en el grupo de tratamiento con H460-16-2 era alrededor del 71 por ciento del grupo de control con tampón de anticuerpo ( $p = 0,028$ ) a los 70 días después del tratamiento. Estos datos demostraron que el tratamiento con H40-16-2 confiere un beneficio de supervivencia en comparación con los grupos de control tratados. El tratamiento con H460-16-2 parece seguro, ya que no induce ningún signo de toxicidad, incluida la reducción del peso corporal y malestar clínico. Así, el tratamiento con H460-16-2 fue eficaz ya que retrasó el crecimiento tumoral y aumentó la supervivencia en comparación con los grupos control en un modelo bien establecido de cáncer de mama humano. Estos resultados también fueron reproducibles ya que se observaron hallazgos similares en otro estudio de este tipo que sugiere su beneficio y relevancia para el tratamiento de gente con cáncer.

Además de la prevención en el modelo tumoral in vivo de cáncer de mama, H460-16-2 demostró actividad antitumoral contra las células MB-231 en un modelo de tumor in vivo establecido. En este modelo de tumor de xenoinjerto, se trasplantaron células de cáncer de mama MB-231 por vía subcutánea en ratones inmunodeficientes de forma que el tumor alcanzó un tamaño crítico antes del tratamiento con anticuerpos. El tratamiento con H460-16-2 se comparó con el fármaco quimioterapéutico estándar cisplatino, y se demostró que los grupos de tratamiento con cisplatino y con H460-16-2 tuvieron significativamente ( $p < 0,001$ ) menores volúmenes tumorales medios en comparación con grupos tratados con tampón de dilución de anticuerpo o el anticuerpo control de isotipo. El tratamiento con H460-16-2 medió la supresión tumoral que era de aproximadamente dos tercios de la quimioterapia con cisplatino, pero sin la pérdida de peso significativa ( $p < 0,003$ ) y malestar clínico observado con cisplatino. La actividad antitumoral de H460-16-2 y su toxicidad mínima hacen de él un atractivo agente terapéutico anticancerígeno.

En el período post-tratamiento, H460-16-2 mostró un beneficio significativo en la supervivencia ( $p < 0,02$ ) en el que el riesgo de muerte en el grupo H460-16-2 era aproximadamente la mitad que en el grupo control de isotipo de anticuerpos a  $> 70$  días después del tratamiento. El beneficio de supervivencia observada continuó a los 120 días post-tratamiento donde el 100 por cien de los ratones tratados con control de isotipo y con cisplatino habían muerto en comparación con el 67 por ciento del grupo de tratamiento con H460-16-2. H460-16-2 mantiene la supresión de tumores, retrasando el crecimiento del tumor en un 26 por ciento en comparación con el grupo de anticuerpo de control de isotipo. A los 31 días después del tratamiento, H460-16-2 limitó el tamaño del tumor reduciendo el crecimiento del tumor en un 48 por ciento en comparación con el grupo de control de isotipo, que es comparable con el 49 por ciento de reducción observada al final del tratamiento. En el modelo tumoral establecido de cáncer de mama, estos resultados indican el potencial de la H460-16-2 para mantener la supresión del tumor más allá de la fase de tratamiento y demuestran la capacidad del anticuerpo para reducir la carga tumoral y mejorar la supervivencia en un mamífero.

Mediante tinción inmunohistoquímica (IHC), las secciones de tejidos de ratón de múltiples órganos se tiñeron con H460-16-2 para localizar el antígeno H460-16-2 dentro de los tipos de células de diversos tejidos del individuo. Consistente con los efectos supresores tumorales de H460-16-2 contra células MB-231 in vivo, el antígeno H460-16-2 se expresó fuertemente en secciones de tejido de tumor recogidas de ratones no tratados implantados subcutáneamente con células MB-231. La expresión del antígeno H460-16-2 en tejidos de ratón normales se requiere para dar soporte al ratón como modelo apropiado de toxicidad para H460-16-2. Se observó que el antígeno H460-16-2 tenía un patrón de expresión limitada en el ratón, ya que sólo se expresaba en el ovario y el riñón. Con el fin de validar el ratón como un modelo adecuado para la toxicidad, es necesario que haya expresión del antígeno similar en el tejido humano normal.

Para los ensayos clínicos y para validar un modelo animal apropiado para la toxicidad, se determinó la especificidad de H460-16-2 hacia los tejidos humanos normales. Mediante tinción IHC con H460-16-2, la mayoría de los tejidos no expresan el antígeno de H460-16-2, incluyendo los órganos vitales, tales como el hígado, riñón, corazón, y pulmón. H460-16-2 tiñó la piel, uréter, estómago y próstata, y se tiñó fuertemente la glándula salival. Los resultados de la tinción de tejidos indicaron que H460-16-2 mostró una unión restringida a diversos tipos de células, pero se unía a macrófagos infiltrantes, linfocitos y fibroblastos. Por lo tanto, los datos indican que el ratón no es probablemente el mejor modelo para la toxicidad ya que "aunque tanto el ratón y humano mostraron una expresión limitada de H460-16-2 en tejidos, los tejidos positivos para la tinción no son iguales entre las dos especies.

La localización del antígeno de H460-16-2 y su prevalencia dentro de pacientes con cáncer de mama son importantes para evaluar los beneficios de la inmunoterapia de H460-16-2 en pacientes y diseñar de ensayos clínicos eficaces. Para abordar la expresión del antígeno de H460-16-2 en tumores de mama de pacientes con cáncer, fueron examinadas muestras de tejido tumoral de 50 pacientes de cáncer de mama para la expresión del antígeno de H460-16-2. Los resultados del estudio mostraron que el 64 por ciento de las muestras de tejido se tiñeron positivamente para el antígeno de H460-16-2. La expresión de H460-16-2 en muestras de pacientes fue específica para células cancerígenas ya que la tinción se limitó a las células malignas. En contraste, H460-16-2 tiñó 2 de 9 muestras de tejido normal de pacientes con cáncer de mama. La expresión del antígeno H460-16-2 por el tumor de mama parecía estar principalmente localizado en la membrana celular de las células malignas, por lo que es un objetivo atractivo para la terapia. Se evaluó además la expresión de H460-16-2 basado en la expresión en el tumor de mama de los receptores de las hormonas progesterona y estrógeno, que juegan un papel importante en el

desarrollo, el tratamiento, el pronóstico y de tumores de mama. No hubo correlación aparente entre la expresión del antígeno de H460-16-2 y la expresión de los receptores de estrógeno o progesterona. Cuando los tumores se analizaron en función de su estadio o grado en que el cáncer había avanzado, los resultados sugieren una tendencia hacia una mayor expresión positiva cuanto mayor es el estadio del tumor, pero los resultados fueron limitados por el tamaño pequeño de la muestra.

Para extender el potencial beneficio terapéutico de H460-16-2, se determinó la frecuencia y localización del antígeno en varios tejidos de cáncer humano. Varios tipos de cáncer, además del de mama, fueron positivos para el antígeno H460-16-2. Los tipos de cáncer humano positivos incluyen el cáncer de piel (1/2), pulmón (4.4), hígado (2/3), estómago (4/5) y riñón (3.3). Algunos cánceres no expresan el antígeno; estos incluyen el de ovario (0/3), glándula adrenal (0/2) y de intestino delgado (0/1). Tal como pasa con el tejido del tumor de mama humano, la localización ocurre predominantemente en la membrana de las células tumorales. Así, además de la unión del anticuerpo H460-16-2 a líneas celulares de cáncer in vitro, hay pruebas de que el antígeno se expresa en seres humanos, y en varios tipos de cánceres. En su totalidad, estos datos demuestran que el antígeno H460-16-2 es un antígeno asociado al cáncer y se expresa en seres humanos, y es una diana de cáncer patológicamente relevante. Además, estos datos también demuestran la unión del anticuerpo H460-16-2 a tejidos de cáncer humanos, y pueden utilizarse adecuadamente para ensayos que pueden ser de diagnóstico, predicciones de la terapia, o pronóstico. Además, la localización en la membrana de la célula de este antígeno es indicativo de la condición del cáncer de la célula debido a la falta de expresión del antígeno en la mayoría de las células no malignas, y esta observación permite el uso de este antígeno, su gen o derivados, su proteína o sus variantes para ensayos que pueden ser de diagnóstico, predicción de la terapia, o pronóstico.

Los datos preliminares indican que el antígeno reconocido por H460-16-2 podría ser una variante del antígeno de rechazo tumoral conocida como la proteína de choque térmico de 96 kDa (gp96). Esto está apoyado por estudios bioquímicos que muestran que los anticuerpos monoclonales reactivos contra gp96 identifican las proteínas que están unidas a H460-16-2. Mediante análisis IHC de tejidos de ratón utilizando anticuerpos H460-16-2 y anti-gp96, el antígeno gp96 parecía estar más ampliamente expresado que el antígeno H460-16-2. Estos resultados fueron similares a aquellos para la tinción IHC de tejidos humanos normales ya que el antígeno H460-16-2 se expresó en un subconjunto más pequeño de células en comparación con el antígeno gp96. El análisis IHC de tejidos de tumores de mama humanos indicó que el antígeno gp96 era el más prevalente con aproximadamente el 84 por ciento de las muestras de tinción positiva con el anticuerpo anti-gp96. El antígeno gp96 se expresó también de forma diferente que H460-16-2, ya que mostró una alta localización tanto en el citoplasma como en la membrana celular. Estos resultados sugieren que H460-16-2 puede ser una variante de gp96.

En total, esta descripción enseña el uso del antígeno H460-16-2 como diana para un agente terapéutico, que cuando se administra puede reducir la carga tumoral de un cáncer que expresa el antígeno en un mamífero, y también puede conducir a una prolongación de la supervivencia de los mamíferos tratados. Esta descripción también enseña el uso de un CDMAB (H460-16-2), y sus derivados, para dirigirse a su antígeno para reducir la carga tumoral de un cáncer que expresa el antígeno en un mamífero, y para prolongar la supervivencia de un mamífero con tumores que expresan este antígeno. Además, esta descripción también enseña el uso de la detección del antígeno H460-16-2 en las células cancerosas que pueden ser útiles para el diagnóstico, predicción de la terapia, pronóstico y de los mamíferos que tienen tumores que expresan este antígeno.

Si el paciente es refractario al curso inicial de la terapia o desarrolla metástasis, el proceso de generación de anticuerpos específicos para el tumor puede repetirse para repetir el tratamiento. Además, los anticuerpos anticancerígenos pueden conjugarse a los glóbulos rojos de la sangre obtenidos de ese paciente y volver a infundir, para el tratamiento de la metástasis. Ha habido pocos tratamientos efectivos contra el cáncer metastásico y la metástasis generalmente presagia un mal resultado con resultado de muerte. Sin embargo, los cánceres metastásicos están generalmente bien vascularizados y el suministro de anticuerpos anti-cancerígenos mediante glóbulos rojos de la sangre puede tener el efecto de concentrar los anticuerpos en el sitio del tumor. Incluso antes de las metástasis, la mayoría de las células cancerosas dependen del suministro sanguíneo del huésped para su supervivencia y el anticuerpo anticancerígeno conjugado a los glóbulos rojos de la sangre puede ser eficaz también contra tumores in situ. Alternativamente, los anticuerpos pueden conjugarse con otras células hematógenas, por ejemplo, linfocitos, macrófagos, monocitos, células asesinas naturales, etc

Existen cinco clases de anticuerpos y cada uno está asociado con una función que le confiere su cadena pesada. En general se cree que la matanza de células de cáncer por anticuerpos desnudos está mediada a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) o de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por ejemplo los anticuerpos murinos IgM e IgG2a pueden activar el complemento humano mediante la unión del componente C-1 del sistema del complemento lo que activa la vía clásica del complemento que puede conducir a la lisis tumoral. Para los anticuerpos humanos, los anticuerpos activadores del complemento más eficaces generalmente son IgM e IgG1. Los anticuerpos murinos del isotipo IgG2a e IgG3 son eficaces en el reclutamiento de células citotóxicas que tienen receptores Fc que conducen a la muerte celular mediante monocitos, macrófagos, granulocitos y ciertos linfocitos. Los anticuerpos humanos, tanto del isotipo IgG1 y IgG3 son mediadores de la CCDA.

Otro posible mecanismo para combatir el cáncer mediante anticuerpos podría ser mediante el uso de anticuerpos que funcionan para catalizar la hidrólisis de los enlaces químicos diferentes en la membrana celular y sus glucoproteínas o glucolípidos asociados, denominados anticuerpos catalíticos.

5 Existen dos mecanismos adicionales de muerte de células cancerosas mediada por anticuerpos que están más ampliamente aceptados. El primero es el uso de anticuerpos como una vacuna para inducir al cuerpo a producir una respuesta inmune contra el antígeno putativo que reside en la célula cancerosa. El segundo es el uso de anticuerpos para dirigir los receptores de crecimiento e interferir con su función o para regular negativamente el receptor de modo que pierde de forma eficaz su función.

10 En consecuencia, se describe aquí un método para producir anticuerpos que modifican la enfermedad cancerosa a partir de células derivadas de un Individuo particular que son citotóxicos con respecto a las células cancerosas mientras que simultáneamente son relativamente no tóxicos para las células no cancerosas, para poder aislar líneas celulares de hibridoma y los correspondientes anticuerpos monoclonales aislados y aumento de la unión a antígeno del mismo para las que dichas líneas celulares de hibridoma se codifican.

15 Además se describen CDMAB y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

20 También se describe la producción de CDMAB cuya citotoxicidad está mediada a través de CCDA.

También se describe la producción de CDMAB cuya citotoxicidad está mediada a través de CDC.

25 También se describe la producción de CDMAB cuya citotoxicidad es una función de su capacidad para catalizar la hidrólisis de enlaces químicos celulares.

Es otro objetivo de la presente invención la producción de CDMAB, que son útiles en un ensayo de unión para el diagnóstico, pronóstico y monitorización del cáncer.

30 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Histograma que muestra el peso corporal medio de los diferentes grupos de tratamiento durante la duración del estudio. Los datos se presentan como la media + / - EEM para cada grupo en cada punto de tiempo.

35 Figura 2. Efecto de la H460-16-2 sobre el crecimiento tumoral en un modelo preventivo del cáncer de mama MB-231. La línea discontinua indica el período durante el que se administró el anticuerpo. Los puntos de datos representan la media + / - EEM.

40 Figura 3. Supervivencia de ratones portadores de tumor después de tratamiento con H460-16-2, tampón y anticuerpo de control de isotipo. Los ratones se monitorizaron para la supervivencia durante más de 70 días después del tratamiento.

45 Figura 4. Efecto de la H460-16-2 sobre el crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de mama establecido MDA-MB-231. La línea discontinua indica el período durante el que se administró el anticuerpo. Los puntos de datos representan la media + / - EEM.

50 Figura 5. Representación gráfica de la eficacia del tratamiento o el efecto anti-tumoral de H460-16-2, y cisplatino. La inhibición del crecimiento se calculó como una proporción del volumen medio del tumor tratado frente al grupo de control de isotipo tratada en porcentaje:  $T / C \times 100$ , donde T es el volumen tumoral medio del grupo tratado y C el volumen medio del tumor del grupo de control en el día X. La línea discontinua indica el período de tratamiento.

Figura 6: La media de los pesos corporales de los animales en los grupos de estudio antes y después del período de tratamiento.

55 Figura 7. Supervivencia de ratones portadores de tumor después del tratamiento con H460-16-2, anticuerpo de control de isotipo o cisplatino. Los ratones se controlaron para la supervivencia durante más de 60 días después del tratamiento.

60 Figura 8. Cáncer de mama MB-231 humano extirpado de un ratón SCID. A. anti-vimentina. B. H460-16-2. C. Antigp96. La flecha apunta a las células con tinción de citoplasma y punteada. Magnificación de 100X.

Figura 9. Hígado de ratón. A. anti-vimentina. B. H460-16-2. C. Anti-gp96. Nótese la tinción positiva por anti-gp96 de los hepatocitos. Magnificación de 100X.

65 Figura 10. Riñón de ratón A. anti-vimentina. B. H460-16-2. La flecha apunta a la tinción apical de las células tubulares. C. Antigp96. La flecha apunta a la tinción difusa de las células tubulares. Magnificación de 100X.

Figura.11. Ovario de ratón A. anti-vimentina. B. H460-16-2. La flecha apunta a la tinción citoplásmica de los óvulos en los folículos. C. Anti-gp96. La flecha apunta a las células granulosas. Magnificación de 100X.

5 Figura 12. Micrografía representativa de la unión de H460-16-2 a un tumor de cáncer de mama (carcinoma infiltrante del conducto). Las flechas amarilla y naranja, en el panel apuntan a las células del estroma y láminas de células malignas, respectivamente. Magnificación de 100X.

10 Figura 13. Micrografías representativas que muestran el patrón de unión obtenido con H460-16-2 (A) y el anticuerpo anti-gp96 (B) en secciones de muestras de tejido de carcinoma del conducto infiltrante de una matriz de tejido de cáncer de mama. Las flechas azules indican la localización celular del objetivo antigénico. Magnificación de 200X.

#### Descripción detallada

##### Ejemplo 1

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

20 El anticuerpo monoclonal H460-16-2 fue producido mediante el cultivo de los hibridomas en matraces CL-1000 (BD Biosciences, Oakville, ON) con recolecciones y resiembra dos veces por semana y se purificó de acuerdo con los procedimientos estándar de purificación de anticuerpos con Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé. QC).

#### Experimentos tumorales in vivo preventivos

30 Con referencia a los datos que se muestran en las figuras 1 y 2, se implantaron 5 millones de células MB-231 humanas de cáncer de mama a ratones SCID hembra de 4 a 8 semanas de edad en 100 microlitros de solución salina inyectada por vía subcutánea en la piel del cuello. Los ratones se dividieron al azar en 3 grupos de tratamiento de 10. El día antes de la implantación se administró intraperitonealmente 20 mg / kg de anticuerpo de prueba H460-16-2, tampón de anticuerpo o anticuerpo de control de isotipo (se sabe que no se unen a células MB-231) en un volumen de 300 microlitros tras dilución de la Concentración de reserva con un diluyente que contenía KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, 137 mM NaCl y 20 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Los anticuerpos fueron administrados una vez por semana durante un período de 7 semanas de la misma manera.

40 El crecimiento del tumor se midió aproximadamente cada séptimo día con u pie de rey durante un máximo de 10 semanas o hasta que los animales alcanzaran los criterios de valoración del Consejo Canadiense de Protección de los Animales (CCPA) o el día 120. Los pesos corporales de los animales se registraron durante la duración del estudio. Al final del estudio, todos los animales fueron sacrificados de acuerdo con las directrices del CCPA.

45 Los datos presentados en este estudio es un ejemplo típico de un conjunto de datos longitudinal. Por lo general, en estos grupos de datos hay una alta correlación entre los puntos temporales y se observan correlaciones más altas entre los más puntos de tiempo más cercanos. Debido a esto, se utilizaron las medidas repetidas de los análisis de la varianza (ANOVA Rep.) para determinar las diferencias entre los tratamientos y se utilizó el método de análisis de covarianza para determinar los puntos de tiempo cuando hay diferencias. Este último es un método adecuado cuando las diferencias entre los grupos en cada punto de tiempo no puede ser sólo debido a los grupos pero puede ser debido a la los puntos de tiempo anteriores.

50 No se observaron signos clínicos de toxicidad durante el estudio. El peso corporal medido en intervalos de una semana era un indicador para el bienestar y un retraso para el desarrollo. La figura 1 representa el peso corporal medio de los ratones para los 3 grupos durante el periodo de estudio. Los pesos corporales dentro de cada grupo aumentó con el tiempo. La ANOVA Rep. indicó que no había ninguna diferencia significativa entre los grupos y los perfiles medios no difieren durante los puntos temporales para los grupos tratados con control de isotipo, tampón de anticuerpo o H460-16-2.

60 Usando ANOVA Rep. para todo el experimento, los siguientes resultados fueron notables. El método ANOVA Rep. indicó que no sólo las medias de los grupos fueron diferentes ( $p < 0,001$ ), sino que también las formas de los perfiles medios difieren unos de otros. Como puede verse en la figura 2, el grupo de tratamiento H460-16-2 parecía tener un efecto superior en comparación con los otros grupos. Además, la diferencia entre el grupo tratado con control de isotipo y el grupo tratado con tampón de anticuerpo no fue estadísticamente significativa. Del análisis de la covarianza, se encontraron diferencias significativas por primera vez en el día 18, en el que los grupos de tratamiento de isotipo y de tampón difería del grupo de tratamiento con H460-16-2. Al día 53, (la primera medición del volumen del tumor después del cese de tratamiento) el volumen del tumor del grupo tratado con H460-16-2 fue del 1,3% del grupo tratado con anticuerpo de control ( $p < 0,0001$ ) lo que demuestra la eficacia en la prevención de la

carga tumoral. Hay también un beneficio de supervivencia correspondiente (Figura 3) del tratamiento con H460-16-2. La supervivencia mejorada es un valioso indicador de la eficacia. Los 3 grupos fueron seguidos durante más de 70 días después del tratamiento. La prueba de riesgos proporcionales de Cox estima que el riesgo de morir en el grupo H460-16-2 fue alrededor del 71% del grupo de control de tampón ( $p = 0,028$ ). Estos datos demuestran que el tratamiento con el anticuerpo de prueba confiere un beneficio de supervivencia en comparación con los grupos tratados con control. Los grupos de control alcanzaron el 50% de mortalidad entre 74-81 días después de la implantación. En contraste, los grupos tratados no habían alcanzado el 50% de mortalidad en el momento de la terminación del estudio (día 120 después de la implantación). El grupo de tratamiento con el control de isotipo alcanzó el 100% de mortalidad en el día 74 después de la implantación. En contraste, los animales tratados con H460-16-2 mostraron un 60% de supervivencia al final del estudio.

En resumen, el tratamiento con el anticuerpo H460-16-2 previno la carga tumoral y aumentó la supervivencia en comparación con un anticuerpo de control en un modelo bien reconocido de la enfermedad de cáncer humano. Estos resultados sugieren un beneficio potencial farmacológico y farmacéutico de este anticuerpo (H460-16-2) como una terapia en otros mamíferos, incluido el hombre.

#### Ejemplo 2

Experimentos de tumores establecidos in vivo:

Se implantaron 5 millones de células MB-231 de cáncer de mama a ratones SCID hembra de 5 a 6 semanas de edad en 100 microlitros de solución salina inyectada por vía subcutánea en la piel del cuello. El crecimiento del tumor se midió cada semana con un pie de rey. Cuando la mayoría de la cohorte alcanzó un volumen de tumor de 100 mm<sup>3</sup> (intervalo de 70-130 mm<sup>3</sup>) a 34 días después de la implantación, 12 ratones fueron aleatorizados en cada uno de cuatro grupos de tratamiento. Se administró por vía intravenosa H460-16-2 o anticuerpo de control de isotipo (se sabe que no se unen a células MB-231) con 15 mg / kg / dosis en un volumen de 150 microlitros tras dilución de la concentración de reserva con un diluyente que contenía KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, NaCl 137 mM y 20 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; se administró cisplatino a 9 mg / kg / dosis (diluida en solución salina) por vía intraperitoneal en 300 microlitros. Los anticuerpos se administran a continuación, 3 veces por semana durante un total de 10 dosis de la misma manera hasta el día 48 después de la implantación. El cisplatino se administró cada cuatro días para 3 dosis. El crecimiento del tumor se midió alrededor de cada séptimo día con pie de rey durante la duración del estudio o hasta que los animales alcanzaron los criterios de valoración de CCPA. Los pesos corporales de los animales se registraron mientras duró el estudio. Al final del estudio, todos los animales fueron sacrificados de acuerdo con las directrices del CCPA.

En el momento de la aleatorización, los volúmenes tumorales medios y las desviaciones estándar en cada grupo fueron similares: control de isotipo, (97,60 + / -18,33); H460-16-2 (95,25 + / -16,82); cisplatino (98,00 + / -18,93 ). Esto indicó que se había producido una verdadera aleatorización. Como se muestra en la Figura 4 el anticuerpo H460-16-2 fue capaz de suprimir significativamente el crecimiento del tumor al final del período de 3 semanas de tratamiento. Las comparaciones del volumen medio del tumor entre los 3 grupos mostraron que las diferencias entre los grupos fueron altamente significativas (Tabla 1).

Tabla 1: Comparación del volumen tumoral medio al final del tratamiento

Grupo (1)	Grupo (2)	Diferencia media (1-2)	Error estándar	Sig.
Isotipo	H460-16-2	187,58*	41,09	0
	Cisplatino	300,69*	43,1	0
H460-16-2	Isotipo	197,58*	41,09	0
	Cisplatino	113,12*	43,1	0,012
Cisplatino	Isotipo	300,69*	43,1	0
	H460-16-2	113,12*	43,1	0,012

\*La diferencia media es significativa al nivel 0,05.

Además de evaluar la eficacia se evaluó mediante el cálculo de T / C (volumen medio del tumor del grupo de tratados (T) respecto al volumen medio del tumor del grupo de control de isotipo (C) en proporciones de porcentaje que reflejan la inhibición del crecimiento). El anticuerpo H460-16-2 alcanzó un punto final de mediana del volumen del tumor T / C igual al 49% (Figura 5). La Figura 4 muestra además que el tratamiento con H460-16-2 resultó en una marcada supresión del crecimiento del tumor en comparación con el control de isotipo y que la supresión era 2/3 partes de la alcanzada con cisplatino dado en su dosis máxima tolerada (DMT) pero sin la toxicidad acompañante al cisplatino o la muerte.

Los pesos corporales registrados semanalmente durante la duración del experimento, se utilizaron como indicador para la evaluación de la seguridad y toxicidad. Tal como se indica en la Tabla 2 y se muestra en la Figura 6, había una diferencia mínima en peso para los grupos tratados con el control de isotipo o H460-16-2. En contraste, durante

el periodo de tratamiento, se observó una caquexia significativa ( $p = 0,0005$ ) en el grupo de cisplatino. En este grupo, la pérdida de peso alcanzó el 19,2% del peso inicial y aparecieron signos de evidencia adicional de agotamiento clínico como pelaje erizado, persistencia del pliegue cutáneo debido a la deshidratación y letargo. No hubo muertes en el grupo tratado con H460-16-2 en comparación con 2 muertes observadas en el grupo tratado con cisplatino.

Tabla 2: Cambios en el peso corporal y supresión del crecimiento tumoral (%T/C) al final del tratamiento

Agente terapéutico	Nº/Grupo	Dosis	% Cambio en el peso corporal	% supresión del crecimiento tumoral
Control de isotipo	12	15 mg/kg/ dosis *	sin cambios en la media	
H460-16-2	12	15 mg/kg/ dosis *	-2.30%	49
Cisplatino	12 (-2)	9 mg/kg/ dosis **	-19.20%	25

\* Dosis administrada i.v. 3 x por semana durante 3 semanas.  
 \*\* Dosis administrada i.p. 1 x cada 4 días durante 3 dosis.

10 H460-16-2 mostró un beneficio de supervivencia en comparación con el tratamiento con control de isotipo (Figura 7). Al día 170 (alrededor de 120 días tras el tratamiento), el 33 por ciento del grupo de tratamiento con H460-16-2 estaba todavía vivo en comparación con el 0 por ciento, tanto para el grupo con cisplatino como para el de control de isotipo.

15 En resumen, H460-16-2 es significativamente más eficaz que el anticuerpo de control de isotipo en la supresión del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjertos de tumores establecidos de cáncer de mama en ratones SCID. Durante el período de tratamiento de 3 semanas, H460-16-2 alcanzó un punto final de la mediana de los volúmenes de los tumores T / C de menos del 50% respecto al control. Además, H460-16-2 produjo una supresión que era de dos tercios de la de cisplatino administrado en MTD pero sin los signos de toxicidad o muerte observados con el fármaco quimioterapéutico.

20 Por lo tanto el tratamiento con H460-16-2 disminuyó significativamente la carga tumoral de tumores establecidos en comparación con un anticuerpo de control y mostró beneficios de supervivencia en un modelo bien reconocido de la enfermedad de cáncer humano sugiriendo beneficios farmacológicos y farmacéuticos de este anticuerpo para la terapia en otros mamíferos, incluyendo el hombre.

Ejemplo 3

Tinción de tejidos en ratones normales

30 La distribución del antígeno H460-16-2 se estudió en tejidos de ratón y se comparó con el antígeno gp96. Los estudios de optimización de IHC se llevaron a cabo inicialmente con el fin de determinar las condiciones de otros experimentos. El anticuerpo monoclonal H460-16-2 fue producido y purificado como se ha indicado anteriormente.

35 74 días después de la implantación se aplicó la eutanasia a un ratón no tratado al que se le implantaron subcutáneamente células tumorales MB-231. El tejido tumoral y el tejido de los órganos principales fueron disecados y fijados en formalina tamponada neutra al 10% durante 48 horas. Después de la fijación, los tejidos se transfirieron a etanol al 70%, se procesaron, embebieron en parafina, se seccionaron y montaron en portaobjetos de vidrio para su tinción. Los cortes se desparafinaron por secado en un horno a 60 ° C durante 1 hora y se desparafinaron por inmersión en xileno 5 veces durante 4 minutos cada uno en tarros de Coplin. Tras el tratamiento a través de una serie de lavados de etanol de calidad (100% -75%), las secciones se rehidrataron en agua. Los cortes se sumergieron en tampón citrato 10 mM a pH 6 (Dako, Toronto, ON) y luego al microondas, a potencia alta, media, y baja durante 5 minutos cada una y finalmente se sumergieron en PBS frío. Los portaobjetos se sumergieron entonces en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno durante 6 minutos, se lavaron con PBS tres veces durante 45 5 minutos cada vez, se secaron, se incubaron con solución de bloqueo universal (Dako, Toronto, ON) durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se secaron. Se diluyó H460-16-2, anticuerpo monoclonal de ratón anti-vimentina (Dako, Toronto, ON) y anti-grp94, también conocido como anti-gp96, (Biotecnologías Stressgen, Victoria, BC) en tampón de dilución de anticuerpo (Dako, Toronto, ON ) hasta su concentración de funcionamiento (ya sea 2,5 µg/mL, 5 µg/mL o 10 µg/mL para cada anticuerpo) y se incubaron durante la noche en una cámara húmeda a 4 ° C. Los cortes se lavaron con PBS 3 veces durante 5 minutos cada uno. La inmunorreactividad de los anticuerpos primarios se detectaron / visualizaron con anticuerpos secundarios conjugados a HRP tal como se suministra (Dako Envision System, Toronto, ON) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de este paso los portaobjetos se lavaron con PBS 3 veces durante 5 minutos cada uno y se desarrolló una reacción de color por la adición de DAB (3,3 '-diaminobencidina tetrahidrocloruro, Dako, Toronto, ON) solución de sustrato de cromógeno para la tinción de 50 inmunoperoxidasa durante 10 minutos a temperatura ambiente. El lavado de los portaobjetos con agua corriente finalizó la reacción cromogénica. Tras la contratinción con hematoxilina de Meyer (Sigma Diagnostics, Oakville, ON), los portaobjetos se deshidrataron con etanoles de calidad (75-100%) y se aclararon con xileno. Utilizando medio de 55

montaje (Dako Faramount, Toronto, ON) se cubrieron los cortes. Los cortes se examinaron al microscopio utilizando un Axiovert 200 (Zeiss Canadá, Toronto, ON) y se obtuvieron imágenes digitales que se guardaron utilizando un programa de captura de imágenes Northern Eclipse (Mississauga, ON). Los resultados se leyeron, puntuaron e interpretaron por un patólogo.

La concentración óptima fue la que produjo los resultados esperados para los anticuerpos de control positivo (anti-gp96) y negativo (anti-vimentina). El anticuerpo anti-vimentina ha demostrado ser negativo en tejidos de ratón pero positivo sobre el tejido humano. El anticuerpo anti-gp96 ha demostrado previamente ser positivo tanto en tejido de ratón y humano. En estos estudios, tanto las concentraciones bajas y altas no produjeron los resultados esperados con los anticuerpos de control, pero la concentración a 5 µg / ml sí que lo hizo.

Tejido	Anti-vimentina	H460-16-2	Anti-gp96
MB-231	+++ MB-231 (M/C)	+++ MB-231 (M)	++ MB-231 (C/P)
Hígado	-	-	+++ hepatocitos (C)
Páncreas	-	-	++ Islotes de Langerhans (C/P)
Bazo	-	-	-
Corazón	-	-	-
Tejido adiposo	-	-	-
Pulmón	+++ MB-231 Metastásico (C)	+ MB-231 Metastásico (M)	+ MB-231 Metastásico (C)
Riñón	-	+++ TCD+TCP (A)	++ TCD+TCP (C/D/P)
Cerebro	-	-	+ Astrocitos (C/P) (Cerebro)
Ovario	-	++ Óvulo (C/N)	+++ Zona Granulosa (C/P) Óvulo (C/N/D)
Trompas de falopio	-	-	++ Epitelio mucoso (C/A)

Abreviaturas son -M: tinción de membrana; C: tinción de citoplasma M/C: tinción de membrana-citoplasma; N: tinción del núcleo; D: tinción difusa; P: tinción punteada; A: tinción apical; TCD: Túbulo contorneado distal; TCP: Túbulo contorneado proximal.

Los resultados de un estudio IHC de tejido de ratón SCID e injertado con cáncer de mama humano, MB-231 (Tabla 3), muestran que el anticuerpo de control negativo anti-vimentina es negativo para los tejidos de ratón, pero positivo para el tejido humano. Anti-vimentina (Figura 8A) muestra tinción citoplásmica intensa y alguna tinción membranosa; H460-16-2 muestra tinción membranosa intensa (Figura 8B), y anti-gp96 muestra ocasional tinción positiva puntiforme y citoplasmática de las células (Figura 8C). Anti-vimentina (Figura 9A) y H460-16-2 (Figura 9B) no tiñen hígado de ratón pero el anti-gp96 produjo intensa tinción citoplasmática de los hepatocitos (Figura 9C). Anti-vimentina (Figura 10A) no tiñe el riñón de ratón. H460-16-2 (Figura 10B) mostró tinción apical de los túbulo contorneados distales y proximales mientras que el anti-gp96 produjo tinción difusa de las mismas células con un patrón citoplásmico y puntiforme (Figura 10C). Anti-vimentina (Figura 11A) no tiñó ovario de ratón, H460-16-2 (Figura 11B) mostró una tinción citoplasmática y nuclear de sólo los óvulos mientras que el anti-gp96 produjo tinción citoplásmica difusa y nuclear de los óvulos y tinción citoplásmica y puntiforme de las células granulosas (Figura 11C).

El anticuerpo anti-vimentina control negativo proporcionó la tinción esperada de los tejidos humanos y la falta de tinción de los tejidos de ratón (véanse las Figuras 8-11). El anticuerpo anti-gp96 se usó como control positivo debido a la probabilidad de que el antígeno H460-16-2 sea una variante del cáncer de gp96. El anticuerpo anti-gp96 mostró una tinción de células MB-231 (Figura 8), que es consistente con la asociación de la expresión de gp96 con el cáncer de mama. Gp96 se expresó también en el citoplasma de muchos tipos de células involucradas con la síntesis de proteínas, tales como hepatocitos, células de los islotes de Langerhans en el páncreas, células granulosas de ovario y los óvulos, y el epitelio de la mucosa en las trompas de Falopio (Tabla 3). Esto es totalmente coherente con el papel putativo de gp96 como una proteína chaperona reticular endoplasmática.

El anticuerpo H460-16-2 tiñó las células MB-231 que es consistente con su efecto in vivo en el modelo de tumor correspondiente. Además se tiñeron los TCD y TCP en el riñón de ratón (Tabla 3), así como los óvulos de ratón (Figura 11). De esta toma de muestras de tejidos de ratón, parece que el antígeno H460-16-2 no se limita a sólo las células humanas sino que también se expresa en el ratón de tal manera que el anticuerpo puede reconocer el antígeno. Significativamente hay diferencias en la expresión del antígeno H460-16-2 y gp96 como se demostró en la tinción del tejido normal de riñón de ratón; se obtuvo tinción apical con H460-16-2 mientras que la tinción difusa fue vista con anti-gp96 (Figura 10). Otro ejemplo de esto es la tinción adicional de los óvulos con anti-gp96 (Figura 11). Una diferencia clave es que no se produce tinción con H460-16-2 en el hígado, mientras que la tinción de gp96 es bastante extensa (Figura 9).

Además de los experimentos descritos anteriormente, H460-16-2, anti-gp96 (para la comparación con H460-16-2) y anti-vimentina (control negativo) se utiliza para teñir una matriz de tejido normal del ratón (IMGENEX, San Diego ,

- 5 CA). El procedimiento de tinción utilizado fue el mismo que se ha indicado anteriormente. Tal como se resume en la Tabla 4, anti-vimentina no tiñe ninguno de los tejidos analizados; H460-16-2 de nuevo tiñó sólo el riñón y el ovario mientras que el anti-gp96 continuó tiñendo una gama mucho más amplia de tejidos de ratón. Estos resultados son consistentes con los indicados anteriormente y vuelven a demostrar que la expresión de H460-16-2 no se limita a las células humanas y que su expresión está restringida y es específica del tejido normal de ratón. También confirma que H460-16-2 tiñe los mismos tejidos que anti-gp96 pero anti-gp96 continua tiñendo una gama mucho más amplia de los tejidos que apoyan la idea de que el antígeno H460-16-2 puede ser un subgrupo de gp96.

Tabla 4: IHC sobre matriz de tejidos de ratón normal

	Tejido	Anti-vimentina	H460-16-2	Anti-gp96
1	Piel	-	-	-
2	Piel	-	-	-
3	Bazo	-	-	+/(Linfocitos)
4	Bazo	-	+/(Linfocitos)	+/(Linfocitos)
5	Músculo esquelético	-	-	-
6	Pulmón	-	-	-
7	Pulmón	-	-	-
8	Corazón	-	-	-
9	Corazón	-	-	-
10	Glándula salival	-	-	+/(Epit. acinar)
11	Hígado	-	-	++(Hepatocitos)
12	Hígado	-	-	++(Hepatocitos)
13	Vesícula biliar	- (NR)	- (NR)	- (NR)
14	Páncreas	-	-	+(Epit. acinar)
15	Esophagus	-	-	+(Células ganglionales)
16	Estómago	-	-	++(Epitelio gland. gástrica)
17	Estómago	-	-	++(Epitelio gland. gástrica)
18	Intestino delgado	-	-	++(Epitelio mucoso y linfocitos/macrófagos)
19	Intestino delgado	-	-	++(Epitelio mucoso y linfocitos/macrófagos en lamina propia)
20	Colon	-	-	++(Epitelio mucoso y linfocitos/macrófagos en lamina propia)
21	Colon	-	-	++(Epitelio mucoso y linfocitos/macrófagos en lamina propia)
22	Riñón	-	++(Epitelio tubular)	++(Epitelio tubular)
23	Riñón	-	+++ (Epitelio tubular)	++(Epitelio tubular)
24	Útero	-	-	-
25	Útero	-	-	+++ (Epitelio mucoso endometrial y glándulas)
26	Ovario	-	+(óvulo)	+++ (óvulo y zona granulosa)
27	Adrenal	-	-	++(Células endocrinas)
28	Timo	- (NR)	- (NR)	- (NR)
29	Cerebro	-	-	-
30	Cerebro	-	-	-
31	Intestino delgado	-	-	-

Abreviaturas: NR: foto no representativa

- 10 Ejemplo 4
- Tinción de tejido humano normal
- 15 Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron para caracterizar la distribución del antígeno H460-16-2 en seres humanos. Se comparó con un anticuerpo dirigido contra gp96 ya que el antígeno H460-16-2 puede ser una variante de cáncer de gp96 como se ha determinado previamente por métodos bioquímicos. La unión de anticuerpos a 60 tejidos humanos normales se realizó utilizando una matriz de tejido de órganos normales humanos (IMGENEX, San Diego, CA). Todos los anticuerpos primarios (H460-16-2; anti-GRP94 (también conocido como anti-gp96, Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC); y de IgG1 de ratón de control negativo (Dako, Toronto, ON)) se diluyeron en tampón de dilución de anticuerpo (Dako, Toronto, ON) a una concentración de 5 µg / ml (óptima concentración en los pasos de optimización). El anticuerpo de control negativo se ha demostrado que es negativo para todos los tejidos de mamífero por el fabricante. Se siguió el procedimiento para la IHC del ejemplo 3.
- 20
- 25 La Tabla 5 presenta un resumen de los resultados de la tinción con H460-16-2 a una serie de tejidos humanos normales. De la tabla, hay tres categorías de tinción de tejidos. Un grupo de tejidos fue completamente negativo. Estos tejidos incluyen corazón, riñón, cerebro, páncreas, mama, testículo, ovario y placenta normales. Un segundo

5 grupo de tejidos comprende tejidos que demostraron una tinción positiva. Estos incluyen la piel, uréter, estómago y próstata. La glándula salival demostró la mayor tinción con este anticuerpo. Un tercer grupo de tejidos incluidos  
 10 tejidos en los que la tinción fue positiva en la sección de tejido, pero que se limitó a los macrófagos infiltrantes, linfocitos y fibroblastos. Esto incluye macrófagos en el pulmón, hígado, estómago, intestino y colon, así como linfocitos en la vesícula biliar y el bazo. Cabe señalar que el antígeno no está presente en las células de los órganos vitales, incluyendo el hígado, riñón, corazón y pulmón. El anticuerpo se une a macrófagos y linfocitos, y su presencia se observa en algunos de los órganos en estas secciones. En comparación, los tejidos que fueron negativos para anti-gp96 incluye la grasa subcutánea, músculo esquelético, pulmón, corazón, músculo liso del estómago, vejiga urinaria, miometrio, ovario, cordón placentario, cerebro (materia blanca y gris), cerebelo, médula y columna vertebral. Con la excepción del miometrio, todos estos tejidos también fueron negativos para la tinción con H460-16-2. Estos resultados sugieren que H460-16-2 se une a un subconjunto más pequeño de tejidos reconocidos por el anticuerpo anti-gp96. Esto es consistente con el estudio de tejido de ratón, en el que anti-gp96 se unió a hígado, páncreas, cerebro y trompas de Falopio, además de los dos tejidos que también se unieron a H460-16-2, ovario y riñón. Estos resultados sugieren que el antígeno para el H460-16-2 no se expresa ampliamente en los tejidos normales, y que el anticuerpo se une específicamente a un número limitado de tejidos en seres humanos.

Tabla 5: IHC sobre tejido humano normal con H460-16-2

	Negativo	Negativo excepto Macrófagos, Linfocitos, Fibroblastos	Positivo
1.	mama	grasa subcutánea	piel, nalga
2.	músculo esquelético	bazo	glándula salival
3.	bronquio	ganglio linfático, mesentereo	estómago, antro
4.	corazón	mucosa nasal	próstata
5.	páncreas	pulmón	vesícula seminal
6.	músculo liso de estómago	hígado	endometrio, secretor
7.	córtex renal	vesícula biliar	tiroides
8.	médula renal	amígdala	uréter
9.	testículos	esófago	miometrio
10.	epididimo	estómago, cuerpo	
11.	endometrio, proliferativo	duodeno	
12.	ovario	íleo	
13.	placenta, vellosidades	apéndice	
14.	placenta, amniocorion	colon	
15.	cordón de placenta	colon sigmoideo	
16.	córtex adrenal	vejiga urinaria	
17.	médula adrenal	cérvix uterina (endocérvix)	
18.	timo	cérvix uterina (exocérvix)	
19.	cerebro, materia blanca	trompas de Falopio	
20.	cerebro, materia gris		
21.	cerebelo		
22.	médula espinal		

20 Para delinear las diferencias entre la distribución de gp96 y el antígeno H460-16-2, se tabularon los tipos de células en donde los antígenos son expresados en la Tabla 6. De la tabla, es evidente que el anticuerpo anti-gp96 se une a un rango más amplio de tipos de células que H460-16-2. Además, la unión más fuerte de H460-16-2 fue a los fibroblastos, epitelio acinar, y linfocitos. Hubo una unión débil a macrófagos, queratinocitos, músculo liso, epitelio mucoso, y a las células foliculares tiroideas. Anti-gp96 se unió a 15 tipos de células adicionales, y para cada tipo de  
 25 células que expresan el antígeno H460-16-2. Esto sugiere que el antígeno H460-16-2 es un subgrupo de gp96 ya que no había células que expresaron H460-16-2 que no expresaran el antígeno gp96.

Tabla 6: Resumen de IHC sobre tejidos humanos normales

Tipo celular	H460-16-2	Anti-gp96
Fibroblastos	+ / ++	+
Epitelio acinar	+ / ++++	+
Linfocitos	+ / ++	+ / ++
Macrófagos	+	+
Queratinocitos	+	+
Músculo liso	+	+
Epitelio mucoso	+	+
Células foliculares	+	+
Epitelio lobular	-	+
Endotelio	-	+

Tipo celular	H460-16-2	Anti-gp96
Glándulas mucosas	-	+
Epitelio ductal	-	+
Hepatocitos	-	++
Células acinares	-	++
Células ganglionares	-	+
Epitelio veloso	-	+
Asas de Henle	-	+
TCP y TCD	-	+ / ++
Epitelio glandular	-	+ / ++ / +++
Células germinales	-	++
Citotrofoblastos	-	++
Sincitiotrofoblastos	-	++
Células de la granulosa	-	+

Estos estudios en tejidos demostraron que el antígeno H460-16-2 tiene una distribución muy limitada en tejidos normales, incluyendo los órganos vitales. El experimento también demostró que el anticuerpo anti-gp96 se une a una gama más amplia de tejidos en comparación con H460-16-2. H460-16-2 se une a un subconjunto de los tejidos unidos por anti-gp96 y a tipos de células limitados. En los tejidos que fueron H460-16-2 positivo, pero no gp96 positivo, H460-16-2 se unió sólo a macrófagos y fibroblastos, tipos de células que generalmente expresan gp96. La diferencia entre los estudios de tejidos entre ratones y humanos señalan también que el anticuerpo H460-16-2 reconoce un antígeno que es relevante en humanos y de importancia limitada en los ratones normales ya que la expresión también está limitada. El anticuerpo H460-16-2 en sí es aplicable en humanos ya que reconoce la forma humana del antígeno.

#### Ejemplo 5

#### Tinción de tejido tumoral humano

Un estudio inmunohistoquímico se realizó para determinar la asociación con el cáncer del antígeno H460-16-2 con el cáncer humano de mama y si el anticuerpo H460-16-2 era probable que reconociera cánceres humanos. Se hizo una comparación para la tinción con anti-gp96, y un anticuerpo dirigido hacia la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, una enzima que no está presente ni inducida en los tejidos de mamíferos (control negativo). Se utilizó una matriz de tejidos de cáncer de mama de 50 pacientes con cáncer de mama y 9 muestras derivadas de tejido mamario no neoplásico en pacientes oncológicos de mama (IMGEX Corporation, San Diego, CA). La siguiente información fue proporcionada para cada paciente: edad, sexo, estadio del tumor según la American Joint Committee on cancer (AJCC), estado de los ganglios linfáticos, receptor de estrógeno (ER) y receptor de progesterona (PR). Se siguió el procedimiento para la IHC del ejemplo 3. Todos los anticuerpos se utilizaron a una concentración de trabajo de 5 µg / ml.

Las Tablas 7 y 8 proporcionan resúmenes de unión de H460-16-2 y anticuerpo anti-gp96 a una matriz de tejido de cáncer de mama, respectivamente. Cada matriz contiene muestras de tumores de 50 pacientes. En general, el 64 por ciento de los 50 pacientes analizados fueron positivas para el antígeno H460-16-2 en comparación con el 84 por ciento para gp96. Tanto para el antígeno H460-16-2 y gp96, sólo 2 de las 9 muestras de tejido de mama normal de pacientes con cáncer de mama fueron positivos. No hubo una correlación clara entre el nivel de receptores de estrógeno y de progesterona. Además, parecía que había una tendencia a una mayor expresión positiva de antígeno H460-16-2 con un estadio tumoral superior. La tinción de H460-16-2 fue muy específica para las células cancerosas respecto a las células normales como se demuestra en la Figura 12, donde las células del estroma fueron claramente negativas y las láminas de células malignas fueron altamente positivas. El patrón de localización celular visto con el antígeno H460-16-2 se limita a la membrana celular en la mayoría de los casos. El anticuerpo anti-gp96 tiñó más muestras de cáncer de mama pero mostraron consistentemente una sustancial localización membranal, así como citoplasmática (Figura 13). Anti-gp96 tiñó las mismas muestras de tejido normal de pacientes con cáncer de mama que con H460-16-2. Estos resultados sugieren que el antígeno para H460-16-2 puede expresarse en casi dos tercios de pacientes con cáncer de mama. El patrón de tinción mostró que en las muestras de paciente, el anticuerpo es altamente específico para las células malignas y el antígeno H460-16-2 se localiza en la membrana celular lo que hace que sea un blanco atractivo para los fármacos.

Tabla 7: IHC con H460-16-2 en células de mama humanas normales y tumorales

H460-16-2		Nº Total	-	+/-	+	++	+++	Total positivo	% positivo
Muestras de	Tumor	50	18	13	15	2	2	32	64
	Normal	9	7	0	2	0	0	2	22
Estado ER	ER+	21	9	5	7	0	0	12	57

H460-16-2		Nº Total	-	+/-	+	++	+++	Total positivo	% positivo
	ER-	28	8	8	8	2	2	20	71
	Desconocido	1	1	0	0	0	0	0	0
Estado PR	PR+	11	5	2	4	0	0	6	55
	PR-	38	12	11	11	2	2	26	68
	Desconocido	1	1	0	0	0	0	0	0
Estadío tumoral AJCC	T1	7	3	2	2	0	0	4	57
	T2	26	11	5	6	2	2	15	58
	T3	16	4	6	6	0	0	12	75
	T4	1	0	0	1	0	0	1	100

Tabla 8: IHC con Anti-gp96 en células de mama humanas normales y tumorales

Anti-gp96		Nº Total	-	+/-	+	++	+++	Total positivo	% positivo
Muestras de pacientes	Tumor	50	8	9	12	9	12	42	84
	Normal	9	7	0	1	1	0	2	22
Estado ER	ER+	21	6	5	4	3	3	15	71
	ER-	28	1	4	8	6	9	27	96
	Desconocido	1	1	0	0	0	0	0	0
Estado PR	PR+	11	4	1	2	2	2	7	64
	pR-	38	3	8	10	7	10	35	92
	Desconocido	1	1	0	0	0	0	0	0
Estadío tumoral AJCC	T1	7	2	2	0	3	0	5	71
	T2	26	5	5	5	5	6	21	81
	T3	16	1	2	6	1	6	15	94
	T4	1	0	0	1	0	0	1	100

- 5 Para determinar si el antígeno H460-16-2 se expresa en otros tejidos humanos tumorales además del de mama, H460-16-2 fue utilizado en una matriz de tejido tumoral humano múltiple (IMGEX, San Diego, CA). La siguiente información fue proporcionada para cada paciente: edad, sexo, diagnóstico y órgano. El procedimiento de tinción utilizado fue el mismo que el descrito en el ejemplo 3. La vimentina se utilizó como anticuerpo de control positivo y se usó el mismo anticuerpo de control negativo como el descrito para la matriz de tejido de tumor mamario humano.
- 10 Todos los anticuerpos se utilizaron a una concentración de trabajo de 5 µg / ml.

15 Tal como se indica en la Tabla 9, H460-16-2 tiñó un número de diversos cánceres humanos, además del de mama. Los siguientes tipos de tumores fueron siempre positivos para H460-16-2 (aunque en diferentes grados): los ganglios linfáticos (2/2), hueso (2/2), pulmón (4.4), riñón (3.3), el útero (3/3), y tiroides (2/2). El estómago (4/5), hígado (2/3) y glándula parótida (2/3) también mostraron una tinción positiva relativamente consistentemente. Varios otros tipos de tumores ocasionalmente se tiñeron de forma positiva. Tal como se vio en los cánceres de mama, la tinción con H460-16-2 se localiza predominantemente en la membrana de las células cancerosas.

20 Por lo tanto, parece que el antígeno H460-16-2 no sólo se encuentra en las membranas de los cánceres de mama, si no también en la membrana de una gran variedad de tipos de tumores. Estos resultados indican que H460-16-2 tiene un potencial como fármaco terapéutico en una amplia variedad de tipos de tumores además del de mama.

Tabla 9: IHC en matriz tumoral humano múltiple

Nº Sec.	Edad	Sexo	Órgano	Diagnóstico	H460-16-2	Vimentina	Control negativo
1	59	M	Piel	Melanoma maligno	+++ M	+++ M/C	-
2	25	F	Piel	carcinoma de células escamosas de la piel	-	+++ M/C	-
3	50	F	Mama	carcinoma ductal infiltrante de mama	+ Tumor +++ Estroma	++ Estroma	-
4	57	F	Mama	Carcinoma papilar invasivo de mama	+/-	++ fibroblastos estromales, vasos	-

ES 2 394 643 T3

Nº Sec.	Edad	Sexo	Órgano	Diagnóstico	H460-16-2	Vimentina	Control negativo
						sanguíneos	
5	35	F	Mama	carcinoma lobular infiltrante de mama	+/-	CS	-
6	40	M	Ganglio linfático	Linfoma maligno, inmunoplásico	+++ M	+++ M/C	-
7	58	M	Ganglio linfático	adenocarc. metastásico desde el estómago	+/-	+++ Tumor, Lipocitos	-
8	53	F	Hueso	Osteosarcoma	+ M/C	+++ M/C	-
9	26	M	Hueso	tumor de células gigantes	+ M/C	++ M/C	-
10	40	M	Hueso	Condrosarcoma	CS	CS	CS
11	51	F	Tejido blando	Liposarcoma	-	+++ M/C	-
12	47	F	Tejido blando	Neuro fibromatosis	+M/C	+++ M/C	-
13	74	M	Cavidad nasal	papiloma inveretido	++ M	+ Queratina	-
14	57	M	Laringe	Carcinoma de células escamosas	+++ M	+++ Estroma	-
15	60	M	Pulmón	Adenocarcinoma	+/-	++ M/C	-
16	51	F	Pulmón	Carcinoma de células escamosas	+++ M/C	+++ M/C	-
17	68	F	Pulmón	Adenocarcinoma	+/-	+++ M/C	-
18	60	M	Pulmón	Carcinoma de células pequeñas	+/-	+++ M/C	-
19	88	F	Lengua	Carcinoma de células escamosas	+++M	+++ Estroma	-
20	34	F	Glándula parótida	Adenoma pleomórfico	-	++ M/C	-
21	50	F	Glándula parótida	Verruga en tumor	+++M/C	+++ Tumor, Linfocitos	-
22	40	F	Glándula parótida	Adenoma pleomórfico	++M/C	+++ M/C	-
23	56	M	Glándula submandibular	Carcinoma de conducto salival	-	+++ M/C	-
24	69	F	Hígado	Carcinoma de colangio	+/-	+/- Tumor, +++ Vasos sanguíneos	-
25	51	M	Hígado	Carcinoma gástrico metastásico	-	++ Estroma	-
26	64	M	Hígado	Carcinoma Hepatocelular	+/-	+/-	-
27	62	F	Vejiga urinaria	Adenocarcinoma	++Tumor, Linfocitos	+ Estroma	-
28	64	F	Páncreas	Adenocarcinoma	++M/C	++ Estroma	-
29	68	M	Esófago	Carcinoma de células escamosas	+/-	++ Estroma	-
30	73	M	Estómago	Adenocarcinoma, poco diferenciado	+M/C	++ Estroma, Vasos sanguíneos	-
31	63	M	Estómago	Adenocarcinoma, moderadamente diferenciado	++M/C	++ M/C	-
32	59	F	Estómago	Carcinoma de células en anillo de sello	++M/C	++ M/C	-
33	62	M	Estómago	Linfoma maligno	+++M/C	+++ M/C	-
34	51	M	Estómago	Tumor estromal borderline	-	++ M/C	-
35	42	M	Intestino delgado	Tumor estromal maligno	-	+++ M/C	-
36	52	F	Apéndice	Pseuomyxoma peritonia	-	+ Tumor, +++ Linfocitos	-
37	53	M	Colon	Adenocarcinoma	+M/C	++ Estroma	-

ES 2 394 643 T3

Nº Sec.	Edad	Sexo	Órgano	Diagnóstico	H460-16-2	Vimentina	Control negativo
38	67	M	Recto	Adenocarcinoma	++M	++ Lipocitos, Vasos sanguíneos	-
39	75	F	Riñón	Carcinoma de células de transición	+M/C	++ Estroma	-
40	54	F	Riñón	Carcinoma de células renales	+/-	++ M	-
41	75	F	Riñón	Carcinoma de células renales	+/-	+ Tumor, +++ Estroma	-
42	65	M	Vejiga urinaria	Carcinoma, poco diferenciado	++M/C	++ Estroma	-
43	67	M	Vejiga urinaria	Carcinoma de células de transición, alto grado	-	+++ Estroma, Vasos sanguíneos	-
44	62	M	Próstata	Adenocarcinoma	+++ M	+++ Tumor, Estroma, Vasos sanguíneos	-
45	30	M	Testículos	Seminoma	+/-	+++ Vasos sanguíneos	-
46	68	F	Útero	Adenocarcinoma endometrial	++ Estroma	+Tumor, +++Estroma	-
47	57	F	Útero	Leimiosarcoma	+PS	+M/C	-
48	45	F	Útero	Leiomioma	+C	+++ M/C	-
49	63	F	Cérvix uterina	Carcinoma de células escamosas	+++ M	+/- Tumor, ++ Estroma	-
50	12	F	Ovario	Tumor del seno endodérmico	-	++ Tumor, Estroma	-
51	33	F	Ovario	Adenocarcinoma mucinoso	-	++ Estroma	-
52	70	F	Ovario	Fibrotecoma	-	+++ M/C	-
53	67	F	Glándula adrenal	Carcinoma cortical	-	+++ M/C	-
54	61	F	Glándula adrenal	Feocromocitoma	-	+++ M/C	-
55	54	M	Tiroides	Carcinoma papilar	++ M/C	+/- Tumor. ++ Estroma	-
56	58	F	Tiroides	Carcinoma follicular, mínimamente invasivo	++ M	+++ M/C	-
57	74	M	Timo	Timoma	+/-	++ M/C	-
58	66	F	Cerebro	Meningioma	-	+++ M/C	-
59	62	M	Cerebro	Glioblastoma multiforme	+++ M	++ Tumor, Vasos sanguíneos	-

Abreviaturas: M: Tinción de membrana; C: tinción de citoplasma M/C: tinción de membrana-citoplasma;; CS: La sección está completamente desprendida, PS: La sección está parcialmente desprendida; F: La sección está plegada.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un ensayo de unión para determinar la presencia de células cancerosas células en una muestra de tejido de un tumor humano que comprende:
- proporcionar un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo codificado por el clon depositado con la ATCC como PTA-4621;
- 10 poner en contacto dicho anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo con dicha muestra de tejido, en el que dicha muestra de tejido es una muestra de tejido de mama, ganglios linfáticos, huesos, tejidos blandos, cavidad nasal, laringe, pulmón, lengua, glándula parótida, hígado, vesícula biliar, páncreas, esófago, colon, recto, riñón, vejiga urinaria, testículos, útero, cuello uterino, timo o cerebro; y
- 15 determinar la unión de dicho anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo con dicha muestra de tejido;
- por lo que la presencia de dichas células cancerosas en dicha muestra de tejido se indica por dicha unión.
- 20 2. Un proceso de aislamiento o detección de células cancerosas en una muestra de tejido de un tumor humano, que comprende:
- proporcionar un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo codificado por el clon depositado con la ATCC como PTA-4621;
- 25 poner en contacto dicho anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo con dicha muestra de tejido, en el que dicha muestra de tejido es una muestra de tejido de mama, ganglios linfáticos, huesos, tejidos blandos, cavidad nasal, laringe, pulmón, lengua, glándula parótida, hígado, vesícula biliar, páncreas, esófago, colon, recto, riñón, vejiga urinaria, testículos, útero, cuello uterino, timo o cerebro; y
- 30 determinar la unión de dicho anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo con dicha muestra de tejido;
- por el cual dichas células cancerosas están aisladas por dicha unión y su presencia se confirmó en dicho tejido.
- 35 3. El ensayo de unión de la reivindicación 1 o el proceso de la reivindicación 2 en las que la muestra de tejido tumoral humano es de un tumor originado en un tejido seleccionado de entre el grupo que consiste en tejido de colon, pulmón y mama.

Figura 1

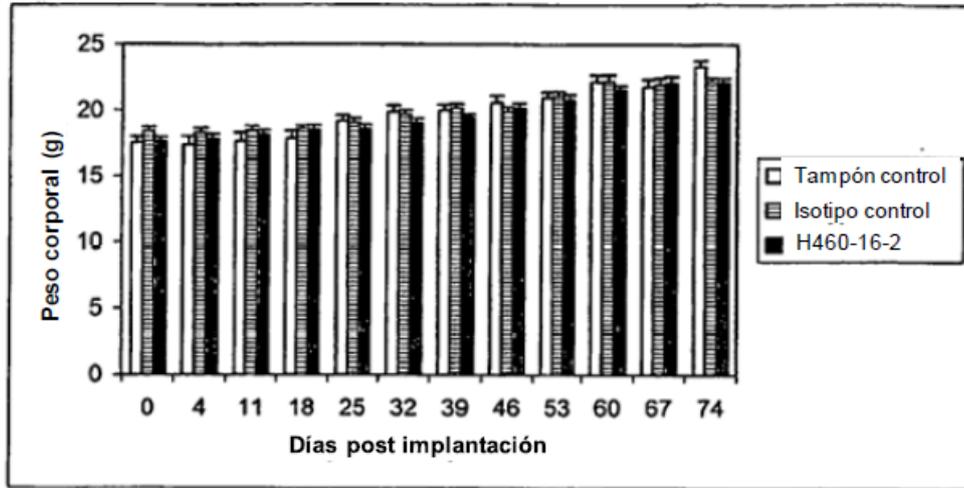


Figura 2

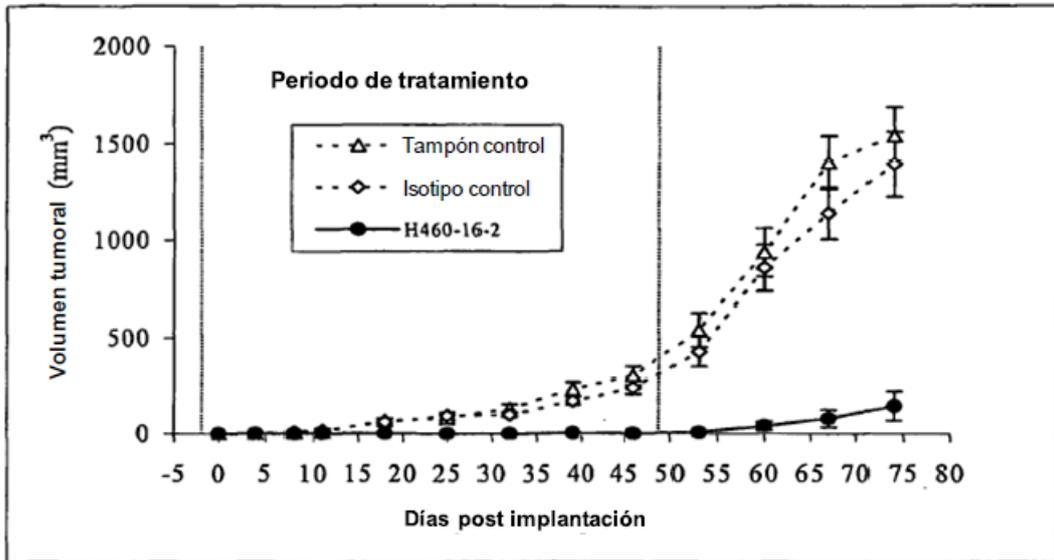


Figura 3

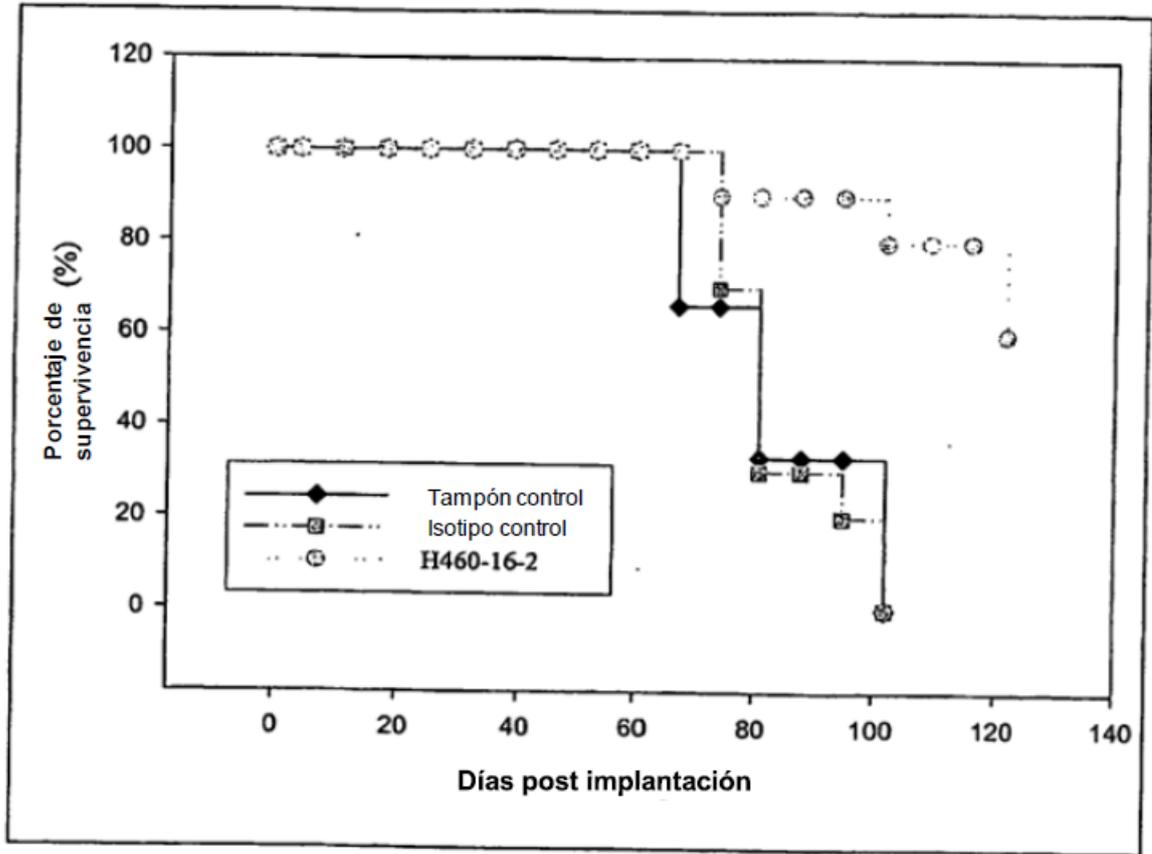


Figura 4

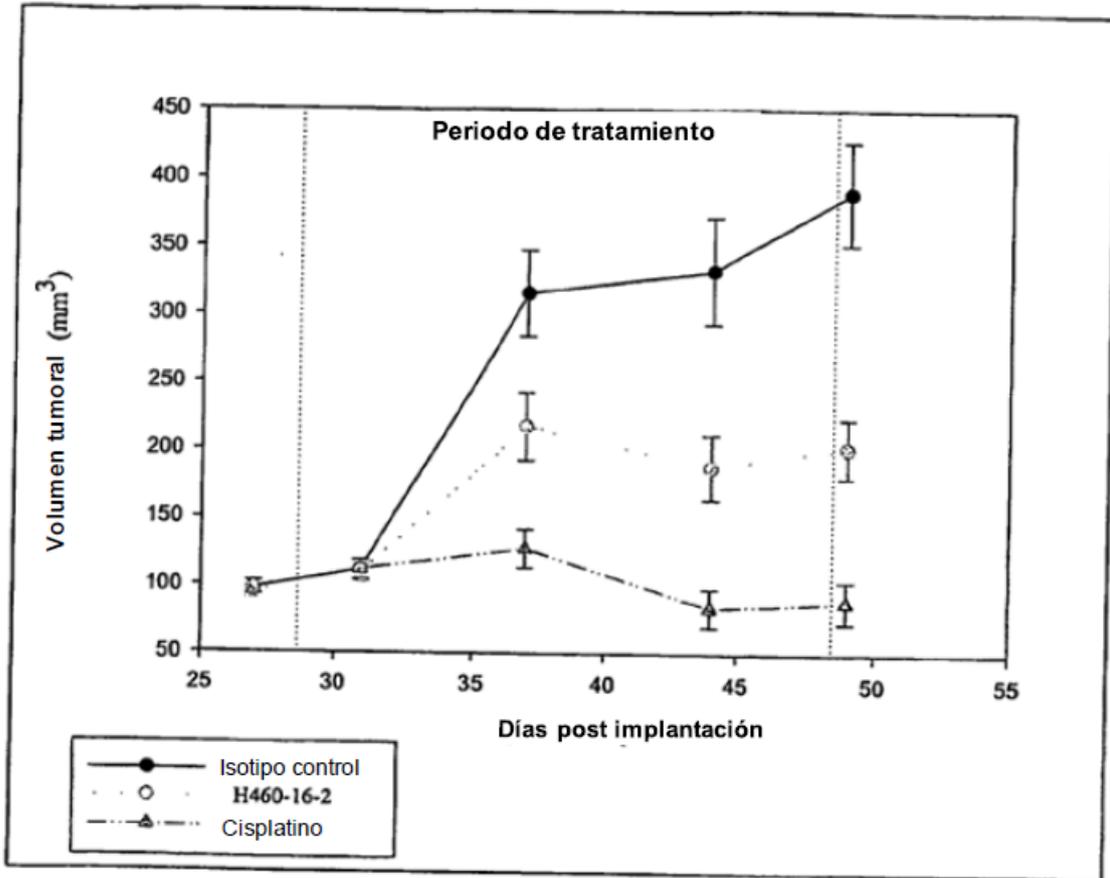
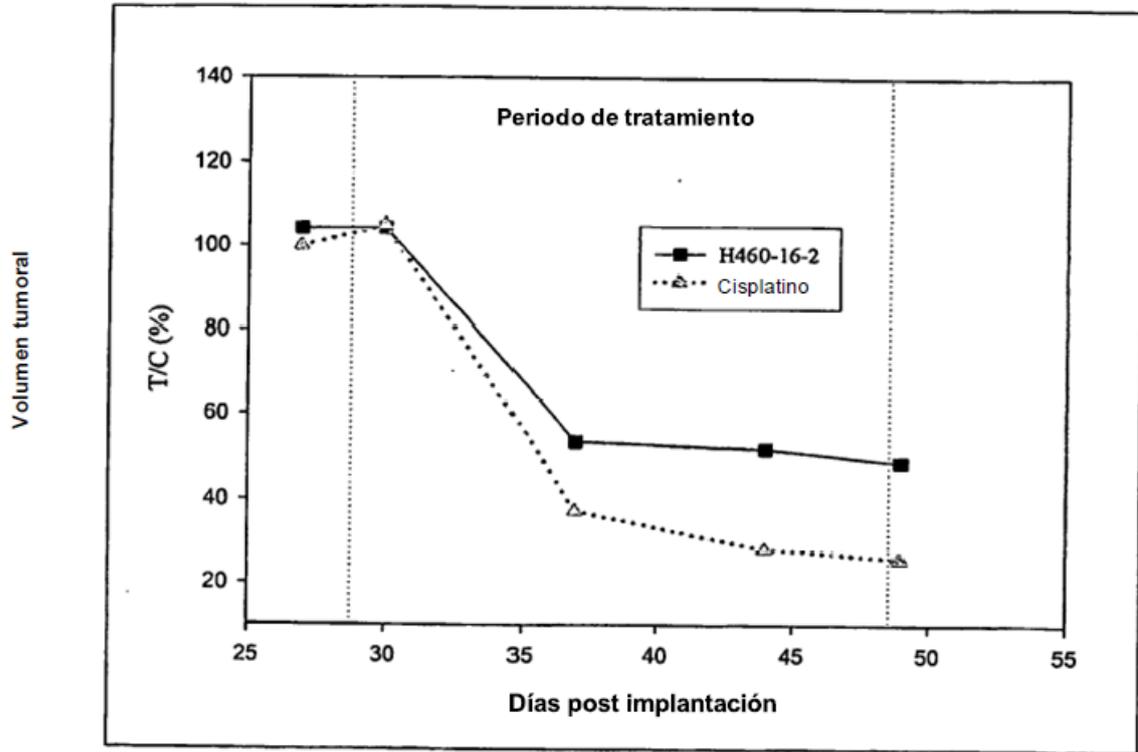


Figura 5



**Figura 6**

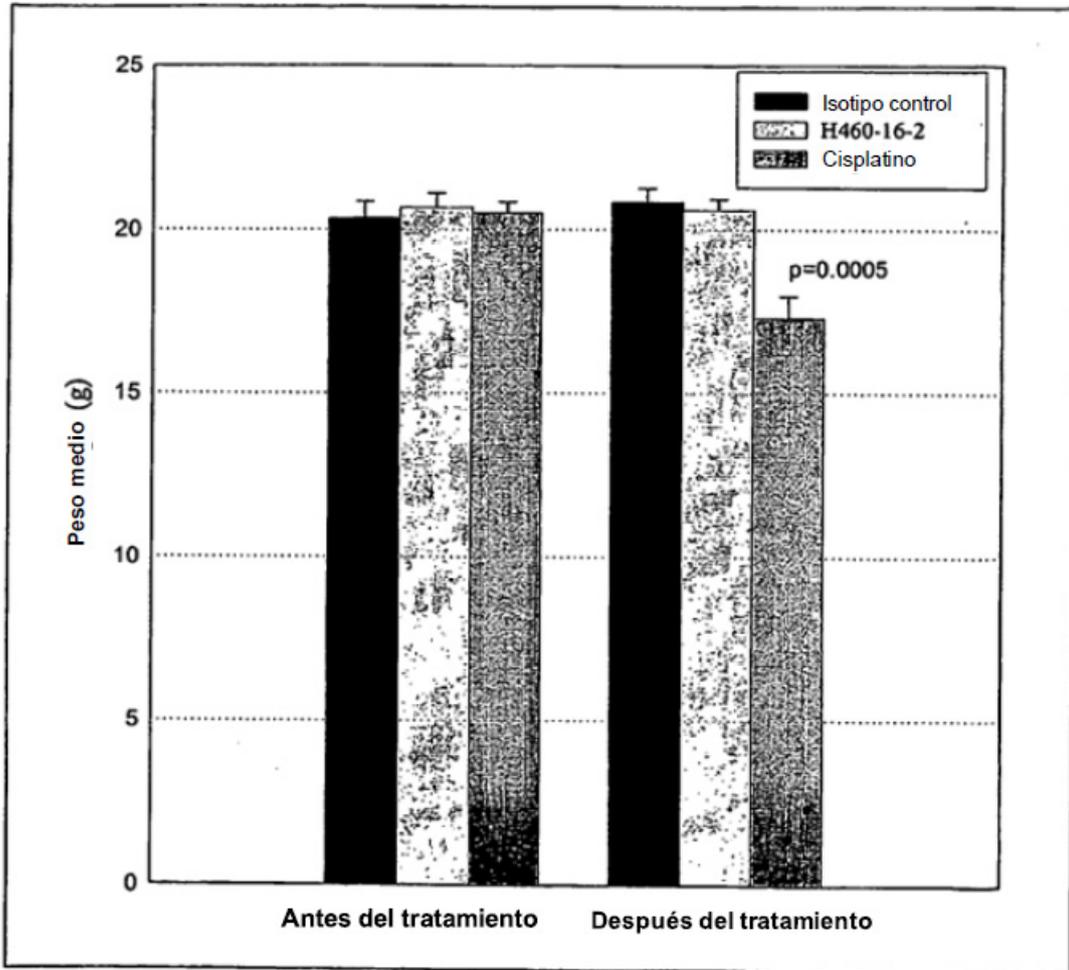
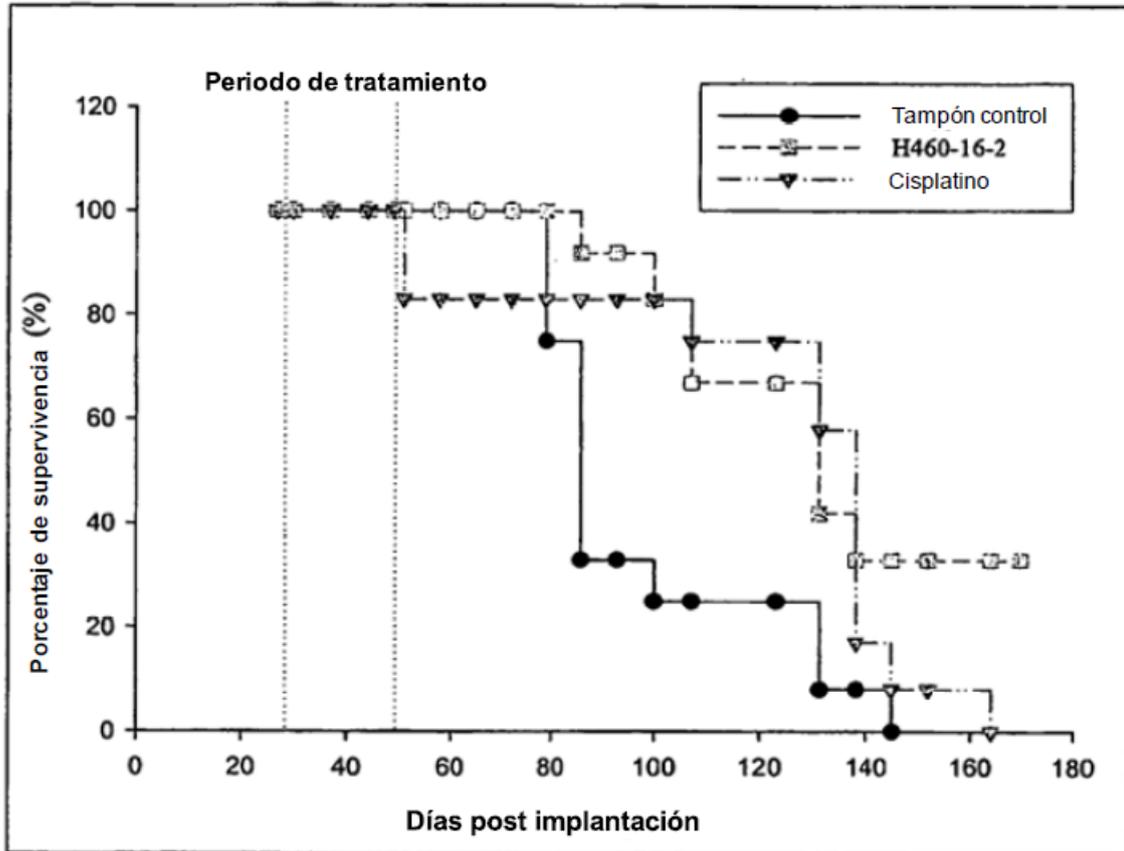
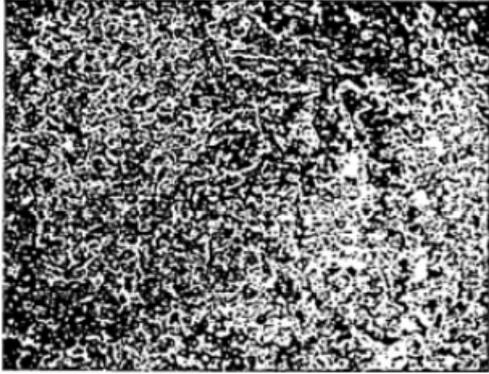


Figura 7

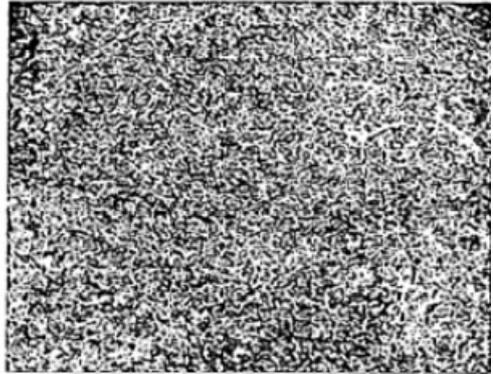


### Figura 8

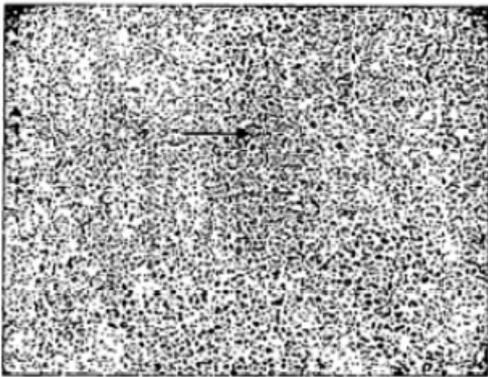
A.



B.

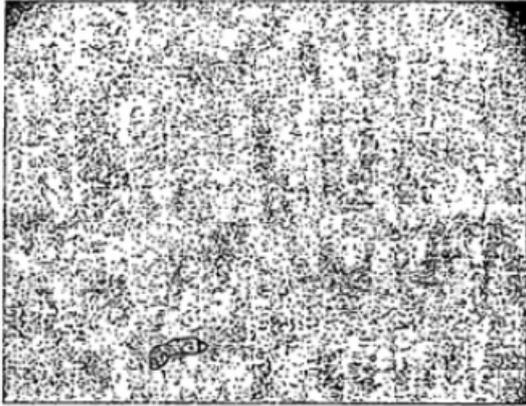


C.

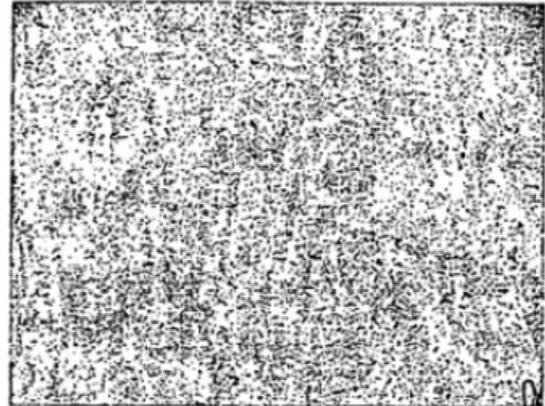


**Figura 9**

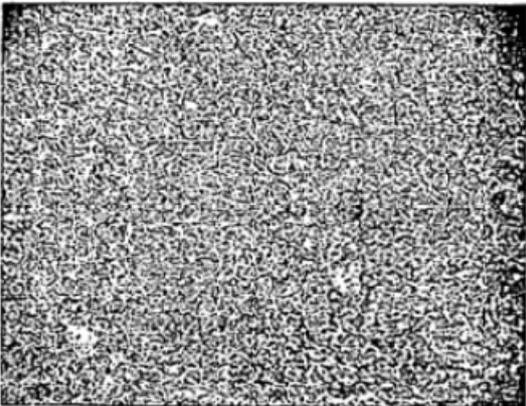
A.



B.



C.

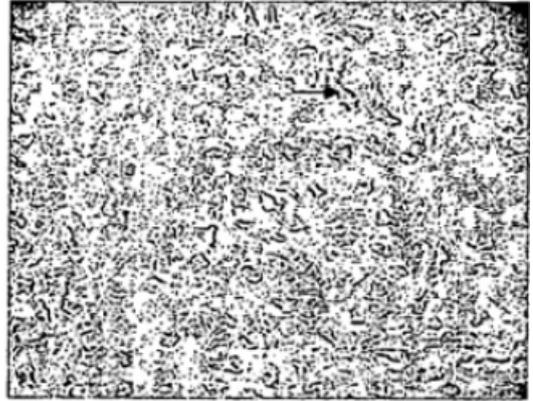


**Figura 10**

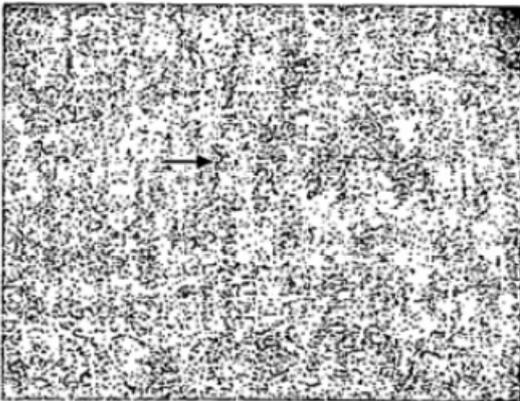
**A.**



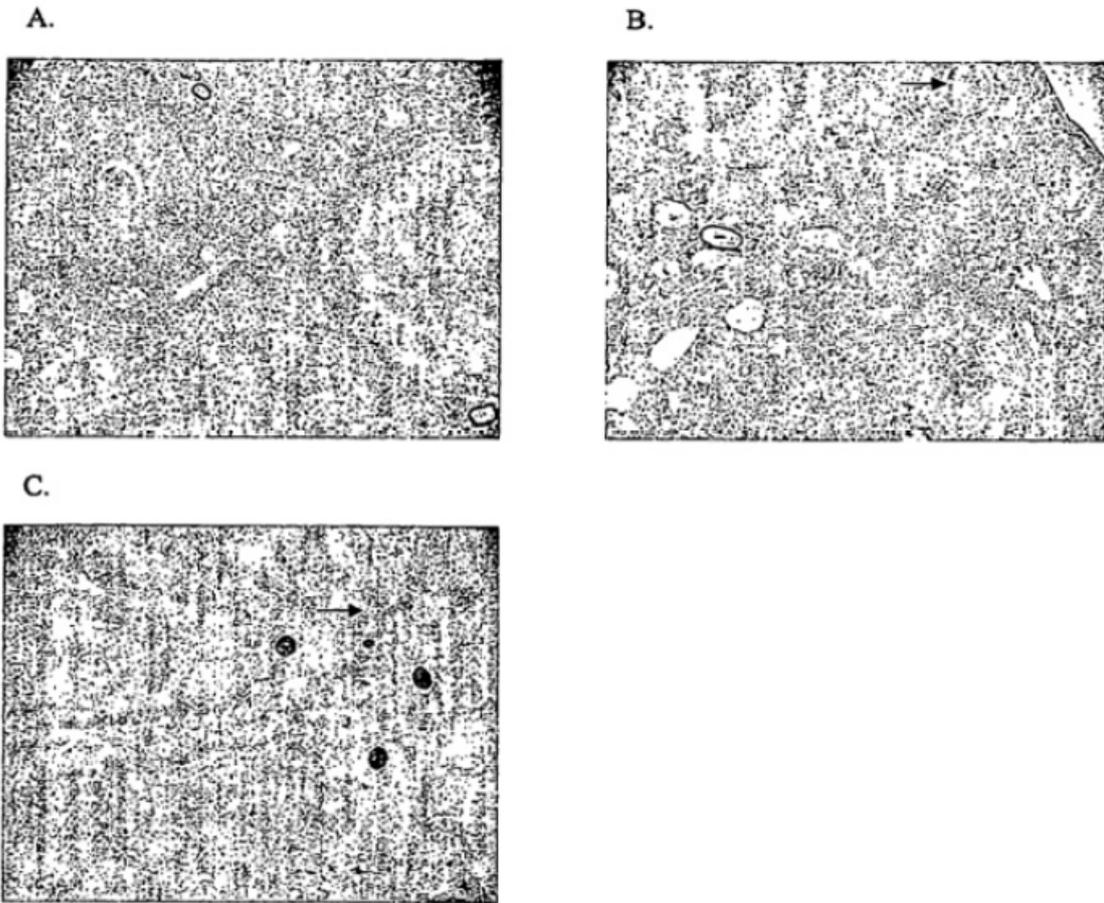
**B.**



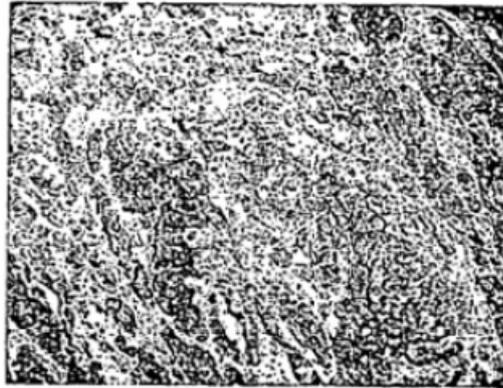
**C.**



**Figura 11**



**Figura 12**



**Figura 13**

